

Inhaltsverzeichnis

1	Antikörper	1
1.1	Des Antikörpers Eigenheiten	2
1.1.1	Molekülstruktur von Antikörpern	4
1.1.2	Die Antigen-Antikörper-Bindung	7
1.2	Herstellung von Antikörpern	7
1.2.1	Das Antigen	8
1.2.2	Die Wahl der Spezies	10
1.2.3	Antigenapplikation	11
1.2.4	Polyklonale Antikörper	14
1.2.5	Monoklonale Antikörper	17
1.2.6	Rekombinante Antikörper	21
1.3	Reinigung von Antikörpern	24
1.3.1	»Quick and dirty« – Präzipitationsmethoden	25
1.3.2	Affinitätschromatographie	26
1.3.3	Klassische Methoden der Proteinreinigung	29
1.3.4	Aufreinigung von IgY aus Eigelb	31
1.3.5	Aufreinigung rekombinanter Antikörper	32
1.3.6	Wichtige analytische Techniken	33
1.4	Chemische Kopplung und Markierung von Antikörpern	35
1.4.1	Chemische Kopplung von Antikörpern an feste Phasen	35
1.4.2	Kopplung von Markerenzymen an Antikörper	38
1.4.3	Kopplung von Fluorochromen an Antikörper	39
1.4.4	Kopplung von Biotin	42
1.4.5	Markierung mit Gold	43
1.4.6	Markierung mit radioaktiven Isotopen	45
1.5	Antikörper-Mikroarray	46
	Weiterführende Literatur	49
2	Zellseparation	51
2.1	Trennung nach Zellgröße und Zelldichte – Zentrifugationstechniken	52
2.1.1	Differenzialzentrifugation	52
2.1.2	Dichthegradienten-Zentrifugation	53
2.1.3	Separationsmedien	55
2.1.4	Gegenstromzentrifugation	63
2.2	Trennung nach zellspezifischen Oberflächenmolekülen	64
2.2.1	Adhäsion an Kunststoffoberflächen	65
2.2.2	Adhäsion an Nylonwatte	66
2.2.3	Erythrocyten-Rosettierung	67
2.2.4	Immunmagnetische Separation	68
2.2.5	Lysierende Antikörper	70
	Weiterführende Literatur	71
3	Durchflusscytometrie	73
3.1	Wie funktioniert das eigentlich?	74
3.2	Fluoreszenzen	78

3.3	Probenvorbereitung	82
3.3.1	Zellmarkierung.....	82
3.4	Inbetriebnahme des Durchflusscytometers.....	87
3.5	Kompensation und Messung	87
3.5.1	Kompensation	89
3.5.2	Messung.....	93
3.6	Auswertung.....	96
3.6.1	Histogramm-Plot.....	96
3.6.2	Dot-Plot	96
3.6.3	Dichteplot	96
3.6.4	Konturplot.....	97
3.6.5	Isometrische Darstellung	98
3.7	Modelle und Ausstattungen.....	98
3.7.1	Autosampler.....	98
3.7.2	Zellsorter	98
3.8	Vergleichbarkeit durchflusscytometrischer Daten	100
	Weiterführende Literatur.....	100
4	Quantitative Immunoassays.....	103
4.1	Assaykonzepte	104
4.1.1	Der kompetitive Assay.....	105
4.1.2	Der Sandwich-Assay.....	105
4.1.3	Welches Assaykonzept für welche Anwendung?.....	107
4.2	Radioimmunoassay (RIA).....	108
4.2.1	Historisches.....	108
4.2.2	Praktisches.....	108
4.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	111
4.3.1	Coaten, Blocken, Waschen	111
4.3.2	Enzyme und Substrate.....	112
4.3.3	ELISA in der Praxis	113
4.4	ELISPOT-Assay.....	117
4.4.1	Anwendung und Vergleich mit anderen Methoden.....	117
4.4.2	Prinzip und Praxis	118
4.5	Partikel-Immunoassay (PIA)	120
4.5.1	Prinzip der Mini-Kugeln.....	120
4.5.2	Trapping-Assay.....	121
4.5.3	Multiplex-Assay	121
4.5.4	Vergleich mit anderen Immunoassays	124
4.6	Verstärkersysteme	124
4.6.1	Erhöhung der Markerdichte.....	125
4.6.2	Multi-Enzym-Kaskaden	125
4.6.3	Immuno-PCR.....	127
	Weiterführende Literatur.....	130
5	Western-Blot	133
5.1	Probenvorbereitung	134
5.2	Auftrennung eines Proteingemisches mittels Gelelektrophorese	135
5.2.1	Die diskontinuierliche SDS-PAGE	135
5.2.2	Native Gelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung	139

5.3 Transfer der Proteine auf eine Membran (Blot)	141
5.3.1 Wet-Blot	142
5.3.2 Semi-Dry-Blot.....	143
5.3.3 Fehlerquellen	143
5.4 Proteindetektion	144
5.4.1 Blocking	144
5.4.2 Antikörpermarkierung	145
5.4.3 Visualisierung	147
5.4.4 »Strippings« und »Re-probing« von Western-Blot-Membranen	147
5.4.5 Fehlerquellen und Kontrollen	148
5.5 Dot- und Slot-Blot	149
Weiterführende Literatur.....	149
6 in situ-Immunlokalisation	151
6.1 Untersuchung von Zellsuspensionen.....	152
6.1.1 Zellsuspensionen.....	152
6.1.2 Cytospins	152
6.1.3 Zellausstriche	153
6.1.4 Einbettung von Zellen	153
6.1.5 Variationen und Details zur Behandlung von Zellsuspensionen	153
6.2 Untersuchung von Geweben	155
6.2.1 Vorbereitung.....	155
6.2.2 Fixierung	156
6.2.3 Paraffin-Einbettung.....	160
6.2.4 Schneiden	161
6.2.5 Nachbehandlung.....	161
6.2.6 Immundetektion	163
6.2.7 Eindeckung	174
6.3 Immunelektronenmikroskopische Untersuchung von Geweben.....	176
6.3.1 Fixierung	176
6.3.2 Einbettung.....	177
6.3.3 Mikrotomie	177
6.3.4 Immundetektion	178
6.4 Tissue Microarrays	178
Weiterführende Literatur.....	179
7 Immunpräzipitation	181
7.1 Die Klassiker	183
7.1.1 Eindimensionale Immundiffusion	183
7.1.2 Zweidimensionale Immundiffusion nach Ouchterlony.....	185
7.1.3 Radiale Immundiffusion nach Mancini.....	186
7.1.4 Immunelektrophoresen.....	187
7.1.5 Limitierung und aktuelle Bedeutung	190
7.2 Immunpräzipitation »heute«	192
7.2.1 Die Präzipitationsmatrix	192
7.2.2 Reduktion unspezifisch präzipitierender Proteine	192
7.2.3 Analyse der Immunpräzipitate	193
Weiterführende Literatur.....	194

8	Die Zelle: leben, fressen, sterben.....	197
8.1	Zellviabilitätsbestimmung	198
8.1.1	Farbstoff-Exklusion	198
8.1.2	Tetrazoliumsalz-Reduktion	199
8.1.3	ATP-Assay.....	199
8.2	Zellproliferation.....	201
8.2.1	DNA-Markierung mit [³ H]Thymidin	201
8.2.2	DNA-Markierung mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	202
8.2.3	Durchflusscytometrische Bestimmung der Zellproliferation.....	203
8.3	Phagocytose-Assays.....	203
8.3.1	Die Testpartikel – Futter für die Phagocyten.....	205
8.3.2	Methoden der Partikelvisualisierung	206
8.4	Zellvermittelte Cytotoxizität	209
8.4.1	Chrom ^{[51]Cr]-release-Assay}	210
8.4.2	Lactat-Dehydrogenase(LDH)-release-Assay	211
8.4.3	Durchflusscytometrischer Cytotoxizitätsnachweis.....	212
8.5	Apoptose-Assays.....	213
8.5.1	Färbungen des Zellkerns.....	215
8.5.2	DNA-Leiter.....	215
8.5.3	Nucleosomen-Quantifizierungs-ELISA	216
8.5.4	TUNEL-Technik	216
8.5.5	Annexin V.....	217
8.5.6	Messung von Caspase-Aktivität	217
8.5.7	Sonstiges	219
	Weiterführende Literatur.....	219
9	Immunologie in der klinischen Anwendung	223
9.1	Blutgruppenbestimmung	224
9.2	HLA-Typisierung	227
9.2.1	Lymphocytotoxizitätstest	228
9.3	Lymphoblastentransformation	230
9.4	Immunzellen in der Therapie	231
9.4.1	Dendritische Zellen.....	232
	Weiterführende Literatur.....	236
10	Ein kurzer Ausflug in die ungeliebte Welt der Statistik.....	237
10.1	Deskriptive Statistik.....	240
10.1.1	Lokationsmaße.....	240
10.1.2	Streuungsmaße	242
10.1.3	Korrelationsmaße	244
10.2	Prüfstatistik	245
10.2.1	Skalen und ihre Daten	246
10.2.2	Skizze des Ablaufs einer wissenschaftlichen Untersuchung	246
10.2.3	Die Wahl eines geeigneten Signifikanztests	249
	Weiterführende Literatur.....	254

11	Naturwissenschaft vs. Übernatürliches.....	255
	CD-Antigene, Cytokine, Chemokine.....	257
	Glossar.....	281
	Index.....	293