

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	Dichtegradienten-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

X	Inhaltsverzeichnis	
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	»Stripping« 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	Tetrazoliumsaz-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