

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung in Immunoassays	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Biologische Grundlagen der Immunoassays	2
1.2.1	Grundlagen der Immunabwehr	2
1.2.2	Die adaptive Immunabwehr	3
1.2.3	Struktur und biologische Funktion der Antikörper	5
1.3	Antikörper in der Analytik	8
1.3.1	Antikörper als Analysewerkzeug	8
1.3.2	Erzeugung von Antikörpern für Immunoassays	9
1.4	Immunoassays – die Qual der Wahl	11
1.4.1	Auswahl eines geeigneten Immunoassays	11
1.4.2	Überblick über die gängigsten Immunoassays	13
2	Antikörper	19
2.1	Einleitung	19
2.2	Struktur und Funktion	20
2.2.1	Enzymverdau	22
2.2.2	Isotypen – Fc-Region	24
2.2.3	Allotypen, Rheumafaktoren, Idiotypen, HAMA	27
2.2.4	Die hypervariable Region – CDR	28
2.2.5	Fc-Rezeptoren	29
2.3	Affinität, Avidität und KD-Wert	30
2.4	Immunisierung	32
2.4.1	Das Antigen	32
2.4.2	Wahl der Tierspezies und Art der Immunisierung	33
2.4.3	Austestung der Immunantwort	35
2.5	Monoklonale Antikörper	35
2.5.1	Hinweise	37
2.6	Humane monoklonale Antikörper, rekombinante, gentechnisch hergestellte Antikörper und Varianten	38

2.7	Produktion	40
2.8	Aufreinigung/Extraktion	43
2.9	Konjugation	47
2.10	Ende gut, alles gut	49
3	Labormethoden	51
3.1	ELISA/EIA/FIA	51
3.1.1	Historisches	51
3.1.2	ELISA-Systeme	52
3.1.2.1	Direkte und indirekte Assays	52
3.1.2.2	Kompetitive und nichtkompetitive Assays	53
3.1.3	Bindung an die Oberfläche	54
3.1.4	Kopplung des Markerenzym/Signalverstärkung	56
3.1.5	Einsatz von Antikörperfragmenten	57
3.1.6	Etablierung und Durchführung von ELISAs	57
3.1.6.1	Beschichtung der ELISA-Platte	59
3.1.6.2	Blockierung von Oberflächen	60
3.1.6.3	Inkubation mit Sekundär-Antikörper	61
3.1.6.4	Detektion über die Farbreaktion	62
3.1.6.5	Bestimmung der Funktionalität des Fängerantikörpers	62
3.1.6.6	Inkubation mit Detektorantikörper	63
3.1.6.7	Quantifizierung	65
3.1.7	Fluoreszenzimmunoassay	66
3.1.8	Rezepte	67
3.1.8.1	Musterprotokoll (Sandwich-ELISA)	67
3.1.8.2	Biotinylierung von Antikörpern	68
3.2	Immuno-PCR: Hochsensitive Protein-Analytik mit Antikörper-DNA-Konjugaten	70
3.2.1	Die Methode der Immuno-PCR	70
3.2.1.1	Die Verknüpfung von Antikörpern und DNA	72
3.2.1.2	Der Nachweis des IPCR-Produktes	73
3.2.1.3	Die Optimierung der IPCR	73
3.2.2	Musterprotokoll eines Imperacer®-Nachweises für PSA	76
3.2.3	Einsatzgebiete der Immuno-PCR	78
3.3	Die Detektion von Proteinen auf Membranen: Dot-Blot- und Western-Blot-Verfahren	81
3.3.1	Das Western-Blot-Verfahren	81
3.3.1.1	Proteintrennung durch Gelelektrophorese	81
3.3.1.2	Transfer der Proteinmuster auf eine Membran	84
3.3.2	Das Dot-Blot-Verfahren	85
3.3.3	Die Proteindetektion	85
3.3.4	Dot-Blot-Verfahren versus Western-Blot-Technik	88

3.3.5	Kurzes Ablaufschema des Western-Blot-Verfahrens	89
3.3.6	Hinweise und Tipps	90
3.4	Protein-Arrays	92
3.4.1	Einführung	92
3.4.2	Anwendungen von Protein-Arrays	92
3.4.2.1	Analytische Protein-Arrays	95
3.4.2.2	Funktionale Protein-Chips	95
3.4.2.3	Anforderungsprofile an Protein-Arrays	95
3.4.3	Technologie	98
3.4.3.1	Chipaufbau	98
3.4.3.2	Herstellung	100
3.4.3.2.1	Die Proteine	101
3.4.3.2.2	Peptide	101
3.4.3.2.3	Die Trägersoberfläche	101
3.4.3.2.4	Die Detektion	102
3.4.4	Ausblick	105
3.4.4.1	Was bringt die Zukunft?	105
3.4.4.2	Ein Beispiel: Die IMPACT-Technologie	106
3.5	Oberflächenplasmonen-Resonanz	110
3.5.1	Grundlagen der SPR	110
3.5.1.1	Registrierung der SPR	118
3.5.1.2	Verschiebung der SPR durch eine aufliegende Schicht	118
3.5.1.3	Auswahl der Prismen	120
3.5.2	SPR-Imaging	121
3.5.2.1	Anwendungen	124
3.5.2.2	Ausblicke	124
3.6	Zytometrie	127
3.6.1	Einführung	127
3.6.1.1	Durchflusszytometrie	130
3.6.1.2	Objektträgerbasierte Zytometrie	131
3.6.1.3	Die Bestimmung der Expression von Leukocytenaktivierungs- markern durch FCM	133
3.6.1.4	Quantifizierung von Endothelvorläuferzellen mithilfe der SBC	134
3.6.2	Beschreibung der Methoden und Anwendung in der Praxis ...	136
3.6.2.1	Standardisierung und Kalibrierung	136
3.6.2.2	Titration von Antikörpern und Farbstoffen	138
3.6.2.3	Negativkontrolle	138
3.6.2.4	Beispiel: Kalibrierung	139
3.6.3	FCM-Analyse und Leukocytenaktivierungsmarker	140
3.6.3.1	Entnahme und Aufbereitung von Blutproben	140
3.6.3.2	Monoklonale Antikörper (mab)	140
3.6.3.3	Messung durch FCM	141

3.6.3.4	Analyse und Darstellung der Daten von FCM-Messungen	141
3.6.3.5	Beispiel: FCM-Analyse der Antigenexpression	142
3.6.4	LSC-Analyse von EPCs	143
3.6.4.1	Entnahme von Blutproben	143
3.6.4.2	Kurzzeitzellkulturen und Färbung	144
3.6.4.3	Analyse von EPC-Proben	144
3.6.4.4	Analyse der EPC-Daten	146
3.6.4.5	Beispiel: LSC-Analyse von EPCs	147
3.6.5	Fehlersuche	148
3.6.5.1	FCM	148
3.6.5.2	LSC	150
3.6.6	Danksagung	151
3.7	Immunhistochemie für Forschung und diagnostische Pathologie	155
3.7.1	Fixierung	155
3.7.2	Antigendemaskierungstechniken	157
3.7.3	Signalamplifikation	158
3.7.4	Multiple Immunfluoreszenzmarkierung	160
3.7.4.1	Protokolle für multiple Immunfärbungen durch Gebrauch monoklonaler Primär-Antikörper von verschiedenen Ig-Isotypen	165
3.7.5	Multiple Immunenzymmarkierung	166
3.7.5.1	Protokoll für die gleichzeitige Immunenzymdoppelfärbung unter Benutzung von Primär-Antikörpern, die in zwei verschiedenen Spezies hergestellt wurden	167
3.7.5.2	Protokoll für die sequenzielle Immunenzymdoppelfärbung . . .	169
3.7.6	Automatisierung in der Immunhistochemie	170
3.8	Immunochemilumineszenzverfahren: Anwendung für die semiquantitative Genexpressionsanalyse des gesamten menschlichen Genoms	178
3.8.1	Die Aufklärung des genetischen Codes und neue Ansätze zur Untersuchung polygener Krankheiten	178
3.8.2	Prinzip der Methode	179
3.8.2.1	Mikroarraybasierte Genexpressionsanalyse	179
3.8.2.2	Probennahme und Probenvorbereitung	179
3.8.2.3	Hybridisierung und Detektion	180
3.8.2.4	Vergleichende Datenauswertung und Bestimmung differenziell regulierter Gene	183
3.8.3	Anwendungen in der Medizin	185
3.8.3.1	Tumorbiologische Taxonomien	185
3.9	Fluoreszenzmikroskopie in der Immunoassayanwendung – eine Einführung	187
3.9.1	Was ist Fluoreszenz?	187

3.9.2	Prinzip und Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops	189
3.9.3	Strahlengang eines Epifluoreszenzmikroskops	193
3.9.4	Anwendungen für die Fluoreszenzmikroskopie	194
3.9.5	Grenzen der Fluoreszenzmikroskopie	194
4	Fluoreszenzfarbstoffe	197
4.1	Einführung	197
4.1.1	Kleine Farbenlehre	199
4.2	Charakterisierung von Fluoreszenzfarbstoffen	201
4.3	Instrumentelle Voraussetzungen	202
4.4	Praktischer Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen	205
4.5	Herstellung von Antikörper-Fluorophor-Konjugaten	207
4.5.1	Kopplung an Aminogruppen der Antikörper	208
4.5.2	Kopplung an Kohlenhydratreste	211
4.5.3	Kopplung an Cysteine	211
5	Oberflächen	215
5.1	Immobilisierung	215
5.1.1	Prinzipien der passiven Adsorption an Polystyrol	215
5.1.1.1	Adsorptionskräfte	215
5.1.1.2	Adsorbierende Oberflächen	217
5.1.2	Die Wahl der richtigen Oberfläche	226
5.1.3	Oberflächen für kovalente Bindung	227
5.1.4	Immobilisierung von DNA	232
5.1.4.1	Festphasen-DNA-ASSAYS	232
5.1.4.2	Festphasen-PCR	233
5.1.4.3	PCR-ELISA	234
5.2	Biochips und Mikrofluidik aus Kunststoffen: Neue Plattformen für diagnostische Anwendungen	235
5.2.1	Kunststoffoberflächen für Biochips	236
5.2.2	Anwendungen in der Praxis	237
5.2.3	Kunststoffe für die Mikrofluidik	238
5.2.4	Fertigungsverfahren für mikrostrukturierte Komponenten	239
5.2.5	Werkstoffe und Formate mikrofluidischer Strukturen	240
5.2.5.1	Anwendungsbeispiel	240
6	Störeffekte bei Immunoassays	243
6.1	Störungen durch Immunoassay-Label	244
6.2	Störungen durch die verwendeten Assay-Antikörper	246
6.3	Störungen durch Matriceffekte	247

6.3.1	Störungen durch Chemikalien und Puffer	247
6.3.2	Störungen durch humane Antikörper, gerichtet gegen Immunglobuline tierischen Ursprungs	248
6.3.3	Störungen durch heterophile Antikörper	250
6.3.4	Störungen durch Proteine und endogene Bestandteile der Probe	250
6.4	Störungen durch Kreuzreaktionen und unspezifische Bindungen	252
6.5	Der Hook-Effekt	253
6.6	Vermeidung von Störeffekten	254
7	Troubleshooting bei der professionellen Entwicklung und Durchführung von ELISAs	257
7.1	Einführung	257
7.2	Durchführung von ELISAs	260
7.3	ELISA-Entwicklung und -Optimierung	260
7.3.1	Testsensitivität	261
7.3.2	Überprüfung der Reagenzien	261
7.3.3	Bedeutung der Haptenkopplung	266
7.3.4	Der Einfluss von Puffersystemen	268
7.3.5	Beschichtung der Mikrotiterplatte	270
7.3.6	Verwendung selbst gewonnener Antikörper	272
7.3.7	Probenvorbereitung	272
7.4	Zusammenfassung	273
8	Auswertung und Validierung	275
8.1	Ausreißertests	275
8.1.1	Der Henning-Test	276
8.2	Validierung von Immunoassays	277
8.2.1	Validierungsparameter	280
8.2.1.1	Richtigkeit oder accuracy oder trueness	280
8.2.1.2	Präzision oder precision	282
8.2.1.3	Spezifität oder specificity	282
8.2.1.4	Nachweisgrenze oder detection limit oder auch level of detection	283
8.2.1.5	Bestimmungsgrenze oder quantitation limit oder auch level of quantitation	284
8.2.1.6	Linearität oder linearity	284
8.2.1.7	Messbereich oder range	285
8.2.1.8	Robustheit oder robustness	285

8.2.1.9	Sensitivität	285
8.2.2	Die fünf Platten zum Erfolg	286
8.2.3	Störeruntersuchung für Fortgeschrittene	288
9	Regulatorische Anforderungen an die Entwicklung von In vitro-Diagnostika	293
9.1	Einleitung	293
9.2	Definitionen	294
9.2.1	In vitro-Diagnostika	294
9.2.2	Bevollmächtigter des Herstellers	295
9.2.3	Sicherheitsbeauftragter für Medizinprodukte	296
9.2.4	Medizinprodukteberater	296
9.3	Harmonisierte Normen	296
9.4	Good Laboratory Practice (GLP) – nichtklinische Labor- untersuchungen	297
9.4.1	Akkreditierung von Laboratorien	300
9.5	Good Manufacturing Practice – GMP	300
9.6	Good Clinical Practice – GCP	302
9.7	Allgemeine Anzeigepflicht des IVD-Herstellers	303
9.8	Leistungsbewertungsprüfungen von In vitro-Diagnostika	304
9.8.1	Leistungsbewertungsprüfungen anhand geeigneter Daten	304
9.8.2	Leistungsbewertungsprüfungen anhand klinischer Prüfungen	305
9.8.3	Klinische Prüfung von In vitro-Diagnostika	306
9.8.3.1	Prüferbroschüre/-information – Handbuch des klinischen Prüfers	307
9.8.3.2	Nutzen-Risiko-Bewertung von Medizinprodukten	309
9.8.3.3	Prüfplan zur klinischen Prüfung eines IVD-Medizinproduktes	309
9.8.3.4	Beschriftung/Kennzeichnung von IVDs zur Leistungsbewertung	309
9.8.3.5	Prüfleiter und Prüfer	310
9.8.3.6	Probandenversicherung	310
9.8.3.7	Patienteninformation und Patienteneinwilligungserklärung ...	311
9.8.3.8	Registrierte Ethikkommission und Votum der Ethikkommission	312
9.8.3.9	Online-Erfassungssysteme für Anzeigeverfahren von Medizin- produkten	314
9.8.3.10	Monitoring während klinischer Prüfungen	314
9.8.3.11	Meldeverpflichtung von Schäden	315

9.8.3.12	Zeitplan für die Meldung von Vorkommnissen und Beinahe-Vorkommnissen sowie zuständige Behörden	316
9.8.3.13	Überwachung der klinischen Prüfung	317
9.8.3.14	Abschluss und Archivierung von Medizinprodukt-Studien im Device Master File	317
9.8.4	Voraussetzungen klinischer VD-Prüfungen in den USA	320
9.9	Benannte Stellen	322
9.9.1	Zuständige Behörden der Benannten Stellen – ZLG und ZLS	322
9.10	Konformitätsbewertungsverfahren	323
9.10.1	Grundlegende Anforderungen	326
9.11	CE-Kennzeichnung – Communautés Européennes	327
9.12	Qualitätsmanagementsystem – QMS	327
9.12.1	Qualitätshandbuch	328
9.12.2	Standard Operating Procedures – SOPs	329
9.13	Überwachung von IVD-Herstellern	332
9.13.1	Zuständige Bundesoberbehörden	332
9.13.2	Zuständige Behörden in Deutschland	333
9.13.3	Zuständige Behörden in den EWR-Mitgliedsstaaten	333
10	Marktorientiertes Innovationsmanagement	337
10.1	Einleitung	337
10.2	Innovation – Begriff und Erfolgsfaktoren	338
10.3	Forscher und Manager – die Unvereinbarkeit zweier Welten?	340
10.4	Geschäftsplan als Bindeglied zwischen Forschung und Kommerzialisierung	342
10.4.1	Analyse des Zielmarktes	343
10.4.1.1	Informationsgewinnung	344
10.4.1.2	Marktentwicklung und Marktprognose	345
10.4.1.3	Wettbewerbsanalyse	345
10.4.1.4	SWOT-Analyse	348
10.4.2	Ziele und Strategie	349
10.4.2.1	Wettbewerbsstrategie	350
10.4.2.2	Geschäftsfeldstrategie	352
10.4.2.3	Marktsegmentierung und Marktbearbeitungsstrategie	354
10.4.3	Patente und Schutzrechte	356
10.5	Zusammenfassung und Fazit	357
Glossar		361
Index		365