

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung in Immunoassays	1
	Arnold Maria Raem, Claudia Goldman, Fabio Rizzo, Uwe Schedler, Fridtjof Lechhart und Enrico Pelz	
1.1	Biologische Grundlagen der Immunoassays	2
1.2	Die adaptive Immunabwehr	4
1.3	Struktur und biologische Funktion der Antikörper	6
1.4	Antikörper in der Analytik	8
1.5	Immunoassays – die Qual der Wahl	11
2	Antikörper	21
	Rudolf Gruber	
2.1	Struktur und Funktion	22
2.2	Affinität, Avidität und KD-Wert	32
2.3	Immunisierung	34
2.4	Monoklonale Antikörper	37
2.5	Humane monoklonale Antikörper, rekombinante, gentechnisch hergestellte Antikörper und Varianten	39
2.6	Produktion	42
2.7	Aufreinigung/Extraktion	44
2.8	Konjugation	48
2.9	Ende gut, Alles gut	51
	Weiterführende Literatur	51
3	ELISA/EIA/FIA	53
	Göran Key	
3.1	Historisches	53
3.2	ELISA-Systeme	54
3.3	Bindung an die Oberfläche	56
3.4	Kopplung des Markerenzymes/Signalverstärkung	58
3.5	Einsatz von Antikörperfragmenten	59
3.6	Etablierung und Durchführung von ELISAs	59

XVII

3.7	Fluoreszenzimmunoassay	68
3.8	Rezepte	69
	Weiterführende Literatur	70
4	Probenvorbereitung für Immunoassays	73
	Verena Blättel-Born und Peter Sander	
4.1	Probenaufarbeitung	73
4.2	Die qualitative Bestimmung am Beispiel der Infektionsdiagnostik	76
4.3	Die quantitative Bestimmung am Beispiel der Darmkrebsvorsorge	79
	Weiterführende Literatur	82
5	Lateral-Flow-Immunoassays	83
	Matthias Lehmann	
5.1	Lateral-Flow-Immunoassays – wie alles begann	83
5.2	Grundprinzip und Assayformate	85
5.3	Produktentwicklung und regulatorische Anforderungen – ein Überblick	89
5.4	Antikörper – der Schlüssel für einen robusten Assay	95
5.5	Label und Konjugat	98
5.6	Nichtbiologische Assaykomponenten	101
5.7	Assayoptimierung – die nächsten Schritte	107
5.8	Interpretation der Ergebnisse	109
5.9	Lateral-Flow-Immunoassay-Markt	113
5.10	Fazit	115
	Literatur	116
6	Immuno-PCR: Anwendungsorientierte hochsensitive Protein-Analytik mit Antikörper-DNA-Konjugaten	119
	Michael Adler	
6.1	Was ist Immuno-PCR?	119
6.2	Wie funktioniert Immuno-PCR?	122
6.3	Anwendungsbeispiel und praktische Überlegungen zum Assayeinsatz: Cytokin IL-6	128
6.4	Ausblick	137
	Literatur	138
7	Evolution der PCR – von der klassischen PCR zur digitalen PCR	141
	Patrick Gürtler und Sven Pecoraro	
7.1	Evolution der Polymerasekettenreaktion	141
7.2	Digitale PCR	153
7.3	Unterschiede der digitalen PCR zur konventionellen PCR und Real-time PCR	160
	Literatur	161

8 Die Detektion von Proteinen auf Membranen: Western-Blot- und Dot-Blot-Verfahren	165
Thorsten Kuczus	
8.1 Das Western-Blot-Verfahren	165
8.2 Das Dot-Blot-Verfahren	169
Literatur	174
9 Beschleunigung des Western-Blotting	177
Sabine Glöggler und Carina Vogt	
9.1 Beschleunigung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	177
9.2 Beschleunigung des Blottens	179
9.3 Beschleunigung der Immundetektion	180
9.4 Die Ein-Schritt-Reaktion	180
9.5 Markierung des Primärantikörpers	183
9.6 Multiplex-Assays	184
9.7 Verwendung von alternativen Geräten	185
Weiterführende Literatur	186
10 Proteinarrays	189
Johanna Sonntag und Matthias Griessner	
10.1 Proteinarray-Formate	190
10.2 Oberflächenfunktionalisierung	197
10.3 Layout von Proteinarrays	199
10.4 Detektionsverfahren und Auswertung	201
10.5 Anwendungen in Forschung und Diagnostik	204
Literatur	208
11 Lab-on-a-Chip – Miniaturisierung von Assays für vor-Ort-diagnostische Anwendungen mittels Mikrofluidik	211
Jörg Nestler, Jenny Frank und Frank Bier	
11.1 Mikrofluidik	212
11.2 Materialien und Herstellungstechnologien für Chiplabore	218
11.3 Reagenzien-Vorrägerung	220
11.4 Detektion des Analyten – Biosensoren	222
11.5 Mikro-Makro-Schnittstelle und Probenvorbereitung	226
11.6 Anwendungsgebiete	228
Literatur	229
12 Zuverlässige Proteinquantifizierung durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	231
Patrick Opdensteinen und Johannes F. Buyel	
12.1 Prinzipien der SPR-Spektroskopie zur Quantifizierung spezifischer Proteine	232

12.2	Verwendung von SPR zur Proteinquantifizierung und Bindungsanalyse	234
12.3	Quantifizierung von Proteintargets mittels spezifisch funktionalisierter Oberflächen	235
12.4	Multiplex-Probenvorbereitung mit minimalem Aufwand	237
12.5	Reproduzierbare Zielquantifizierung durch SPR auch ohne Standards	239
12.6	Assayeeinschränkungen und Fehlerbehebung	246
12.7	Schlussfolgerung	248
	Literatur	248
13	Grundlagen moderner Methoden in der Durchflusszytometrie	251
	Malte Paulsen, Diana Rueda-Ordonez und Michelle Paulsen	
13.1	Technische Voraussetzungen für hochparametrische Durchflusszytometrie	251
13.2	Tipps für experimentelles Design von hochparametrischen Assays	268
13.3	Analyseansätze für hochparametrische Durchflusszytometrie	274
13.4	Zytometrie in der Ära der Genomik	280
	Literatur	284
14	Nachweismethoden zur Protein-Interaktion	285
	Tobias Pusterla und Ann-Cathrin Volz	
14.1	Zeitaufgelöste Fluoreszenz	286
14.2	Alpha-Technologie	293
14.3	Ratiometrische Messungen zur Untersuchung der Protein–Protein-Interaktion	300
14.4	Fluoreszenzpolarisation	311
14.5	Zusammenfassung	312
	Literatur	314
15	Immunhistochemie für Forschung und diagnostische Pathologie	317
	Igor B. Buchwalow, Werner Böcker und Markus Tiemann	
15.1	Fixierung	318
15.2	Antigendemaskierungstechniken	319
15.3	Signalamplifikation (Signalverstärkung)	320
15.4	Multiple Immunfluoreszenzmarkierung	323
15.5	Multiple Immunenzymmarkierung	328
15.6	Hintergrundfärbung und Blockierungsschritte	332
	Literatur	334
16	Fluoreszenzmikroskopie in der Immunoassay-anwendung – eine Einführung	339
	Klaus Nettesheim	
16.1	Was ist Fluoreszenz	340

16.2	Prinzip und Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops	343
16.3	Aufbau eines Filterwürfels/Filterblocks.	343
16.4	Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie	346
16.5	Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops	347
16.6	Anwendungen für die Fluoreszenzmikroskopie.	349
16.7	Grenzen der Fluoreszenzmikroskopie	349
17	In-vivo-Immunfärbung und intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie	351
	Marco Gallus und Maria Gabriele Bixel	
17.1	Zwei-Photonen-Mikroskopie	351
17.2	Zwei-Photonen-Absorption – Fluorophore, Autofluoreszenz und SHG/THG.	354
17.3	Intravitale Anwendungen der Zwei-Photonen-Mikroskopie	357
	Literatur.	367
18	Quantitative digitalholografische Phasenkontrastmikroskopie – biophysikalische Charakterisierung von immunologischen Prozessen, Zellen und Geweben	369
	Björn Kemper, Thomas Liedtke und Jürgen Schnakenburger	
18.1	Quantitative digitalholografische Phasenkontrastmikroskopie	370
18.2	Zellidentifizierung und Zellkulturqualitätskontrolle	372
18.3	Markerfreie In-vitro-Toxizitätsanalyse am Beispiel von Makrophagen	373
18.4	Quantifizierung von Entzündung im Gewebe	376
	Literatur.	378
19	Zirkulierende Tumorzellen – Isolation und molekulare Charakterisierung	379
	Caroline Werner und Gabriele Multhoff	
19.1	Methoden der Isolation von CTCs	380
19.2	CTC-Isolierung mittels S-pluriBeads®	383
19.3	Identifizierung von CTCs über immunzytochemische Färbung.	386
	Literatur.	386
20	Automatisierte Isolation zirkulierender Tumorzellen für die Liquid Biopsy	389
	Sabine Alebrand, Christian Freese, Janis Stiefel, Arnold Maria Raem und Michael Baßler	
20.1	Die Liquid Biopsy als Zukunftstechnologie in der Diagnostik	389
20.2	CTCs als Biomarker: Ziele und Herausforderungen	393
20.3	Methoden der Anreicherung seltener Zellen aus Vollblut	393
20.4	Vereinzelung von CTCs	397
20.5	Automatisierung der Anreicherung, Identifikation und Vereinzelung von CTCs	399

20.6	Das CTCelllect-System: Technologie zur vollautomatisierten Isolation zirkulierender Tumorzellen aus Vollblut	404
20.7	Der Weg zur personalisierten Medizin	408
	Literatur	409
21	3D-Zell- und Organoidkultur	411
	Kevin Achberger, Lena Antkowiak und Stefan Liebau	
21.1	Die Möglichkeiten der 3D-Kulturverfahren	412
21.2	Organoide	414
21.3	Vom Organoid zum Organ	429
21.4	Zusammenfassung	433
	Literatur	433
22	Tissue Engineering und Regenerative Medizin	435
	Valentin Kerkfeld und Ulrich Meyer	
22.1	Angeborene Immunität	439
22.2	Adaptive Immunität	441
	Literatur	444
23	Die CRISPR/Cas-Technologie: Klassische und zukünftige Anwendungen in der Molekularbiologie und Medizin	447
	Claudia Rutz und Ralf Schülein	
23.1	Einleitung: Der Ursprung von CRISPR/Cas – vom bakteriellen Immunsystem zur universellen Genmodifizierungsmethode	447
23.2	Die Anwendungen von CRISPR/Cas	450
23.3	CRISPR/Cas: Die Praxis	459
23.4	Schlussbemerkungen	462
	Weiterführende Literatur	462
24	Fluoreszenzfarbstoffe	465
	Lutz Haalck	
24.1	Kleine Farbenlehre	468
24.2	Charakterisierung von Fluoreszenzfarbstoffen	469
24.3	Instrumentelle Voraussetzungen	471
24.4	Neuere Entwicklungen in der Fluoreszenzmikroskopie	474
24.5	Praktischer Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen	475
24.6	Herstellung von Antikörper-Fluorophor-Konjugaten	477
	Weiterführende Literatur	484
25	Oberflächen und Immobilisierung	487
	Peter Esser, Thomas Andersen und Vibeke Rowell	
25.1	Prinzipien der passiven Adsorption an Polystyrol	487
25.2	Die Wahl der richtigen Oberfläche	496

25.3	Oberflächen für kovalente Bindung	499
25.4	Immobilisierung von DNA	504
26	Stabilisierung von Assaykomponenten	507
	Angela Zellmer, Manuel Hecht und Peter Rauch	
26.1	Stabilisierung immobilisierter Fängerantikörper	508
26.2	Stabilisierung der Standards und Kontrollen	513
26.3	Stabilisierung der Detektorantikörper	515
	Weiterführende Literatur	519
27	Störeffekte bei Immunoassays	521
	Peter Rauch und Tobias Polifke	
27.1	Störungen durch Oberflächeneffekte	522
27.2	Störungen durch Immunoassay-Label	524
27.3	Störungen durch Assayantikörper	525
27.4	Störungen durch Kreuzreaktionen und unspezifische Bindungen	532
27.5	Der High-Dose-Hook-Effekt	534
27.6	Vermeidung von Störeffekten	534
	Weiterführende Literatur	537
28	Troubleshooting und Hilfestellungen bei der Entwicklung, Validierung und Durchführung von ELISAs	539
	Peter Schneider und Anna Funk	
28.1	Das ELISA-Test-Format	540
28.2	Schlüsselreagenzien und Hilfsreagenzien	541
28.3	Die Bedeutung der Antikörperqualität	542
28.4	Herstellung eigener Antikörper	543
28.5	Haptenkonjugate mit Enzymen und Trägerproteinen sowie Haptenmodifikationen	544
28.6	Kriterien zur Einstellung von ELISA-Tests	546
28.7	Einfluss spezieller Puffersysteme	548
28.8	Beschichtung und Stabilisierung der beschichteten Oberflächen von Mikrotiterplatten	550
28.9	Probenmatrix und Probenvorbereitung	551
28.10	Häufige Fehler und deren mögliche Ursachen	552
28.11	Weitere Interferenzen insbesondere bei der Bestimmung klinischer Proben	552
28.12	Zusammenfassung	554
	Literatur	555
29	Auswertung und Validierung	557
	Tobias Polifke und Peter Rauch	
29.1	Ausreißertests	558
29.2	Validierung von Immunoassays	560

29.3	Fazit	570
Literatur.....		571
30 Lebensmittel- und Futtermittelanalytik		573
Markus Lacorn und Thomas Hektor		
30.1	Probenahme	576
30.2	Probenaufarbeitung	577
30.3	Kalibration	579
30.4	Ermittlung von Leistungsdaten: Validierung von Immunoassays in der Lebensmittelanalytik	581
30.5	Bewertung eines Ergebnisses	589
30.6	Grenzen eines Messsystems.....	591
Weiterführende Literatur		592
31 Automatisierung von Immunoassays		593
Matthias Herkert und Nikolas Vogel		
31.1	Problemfelder bei der Automatisierung	594
31.2	Zusammenfassung	606
Weiterführende Literatur		607
32 Präanalytische Qualitätssicherung durch zuverlässige Probenstabilisierung und -logistik		609
Kateryna Shreder, Ullrich Stahlschmidt und Georg Klopfer		
32.1	Stabilisierung von zellfreier DNA (cfDNA).....	610
32.2	Stabilisierung von zirkulierenden Tumorzellen	612
32.3	Stabilisierung von zellfreier RNA (cfRNA).....	613
32.4	Stabilisierung von extrazellulären Vesikeln (EVs).....	614
Literatur		614
33 Herausforderungen für ein Next Generation Biobanking – Kryokonservierung für die Weiterentwicklung der personalisierten Medizin		617
Christian Stephan, Günther Winde, Enrico Pelz und Arnold Maria Raem		
33.1	Was ist eine Biobank – Definition und Funktion	617
33.2	Welche Bedeutung haben Biobanken in der modernen Medizin?	619
33.3	Was sind aktuell limitierende Faktoren des Biobankings?.....	623
33.4	Vollautomatisierte Kryokonservierung durch Ultratiefkühl- Lagerung?.....	630
33.5	Was sind wichtige Elemente für eine modern funktionierende Biobank?.....	632
33.6	Ausblick	634
Literatur.....		635

34 Die neue EU-Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika	637
Volker Franzen und Thomas Klütz	
34.1 Was sind In-vitro-Diagnostika?	638
34.2 Der neue Rechtsrahmen	638
34.3 Zweckbestimmung	644
34.4 Klassifizierungsregeln	645
34.5 Konformitätsbewertung	646
34.6 Von den Benannten Stellen zu erfüllende Anforderungen	649
34.7 Allgemeine Sicherheits- und Leistungsanforderungen	650
34.8 Technische Dokumentation	653
34.9 Das neue Konzept der Leistungsbewertung	654
34.10 Harmonisierte Normen, gemeinsame Spezifikationen und Stand der Technik	658
34.11 Das neue europäische elektronische Informationssystem für Medizinprodukte	658
34.12 System für die Überwachung nach dem Inverkehrbringen	659
34.13 Vigilanz	660
34.14 Für die Einhaltung der Regulierungsvorschriften verantwortliche Person	660
34.15 Produkte zur Eigenherstellung in Gesundheitseinrichtungen	661
34.16 Grafische Übersicht über die Anforderungen der IVD-VO	661
34.17 Fazit	662
Weiterführende Literatur	668
35 ISO 13485 – das obligatorische Qualitätssystem für IVD-Hersteller	673
Sven Hoffmann	
35.1 Regulatorischer Hintergrund	673
35.2 Inhaltliche Einführung und Diskussion	675
35.3 Sinn und Zweck einer Zertifizierung	702
Weiterführende Literatur	703
36 Klinische Studien für die In-vitro-Diagnostik	705
Jörg-Michael Hollidt	
36.1 Gesetzliche Grundlagen	707
36.2 Humane Bioproben für die diagnostische Forschung, Entwicklung und Zulassung	711
Literatur	722
37 Dokumentation in klinischen Prüfungen	725
Dietmar Rescheleit und Gabriele Hartwig	
37.1 Trial Master File	725
37.2 Sponsor, CRO, Prüfer – Verantwortung und Aufgaben	727

37.3	TMF-Setup und -Struktur	728
37.4	Elektronischer TMF, Papier-TMF, Hybride	729
37.5	eTMF-Systeme	730
37.6	Management von Dokumenten im eTMF	731
37.7	Archivierung der Studienunterlagen im TMF bzw. eTMF	733
	Literatur	735
38	Patentschutz für diagnostische Verfahren und seine Grenzen	737
	Joseph Straus	
38.1	In-Vitro-Diagnostik – wirtschaftliche und regulatorische Aspekte	737
38.2	Patentschutz und In-Vitro-Diagnostik	740
38.3	Umfang des Schutzes der in IVD integrierten Diagnostizierverfahren	744
38.4	Rechtsfragen im Zusammenhang mit der BGH-Entscheidung Rezeptortyrosinkinase II und ihre Folgen	749
38.5	Abschließende Bemerkungen	752
39	Lernende Laborsysteme: Wie kann künstliche Intelligenz im Labor unterstützen?	755
	Matthieu-P. Schapranow	
39.1	Netzwerke für den grenzübergreifenden Austausch	756
39.2	Künstliche Intelligenz: Der Traum von intelligenten Algorithmen	757
39.3	Lernende Systeme	758
39.4	Training von KI-Verfahren: Eine neue Form der Programmierung	759
39.5	Entwicklung von lernenden Systemen: Ein iterativer Prozess	760
39.6	Zugang zu aktuellen Realdaten	763
39.7	Labore: Quellen der Daten früher wie heute	764
39.8	Lernende Systeme im Labor	765
39.9	Worauf ist bei der Entwicklung von lernenden Systemen zu achten?	765
39.10	Angriffe auf lernende Systeme im Labor	766
39.11	Schutz von Missbrauch	766
39.12	Nachvollziehbarkeit von Prognosen lernender Systeme	767
39.13	Föderierte Lernverfahren	768
39.14	Fallbeispiel I: Lernende Systeme bei der Therapieauswahl	768
39.15	Fallbeispiel II: Lernende Systeme bei der Wirkstoffentwicklung	770
39.16	Fallbeispiel III: Lernende Systeme bei chronischen Erkrankungen	770
39.17	Fallbeispiel IV: Lernende Systeme helfen bei der Analyse der COVID-19-Lage	772
39.18	Ausblick	772
	Literatur	775
	Stichwortverzeichnis	777