

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Des Antikörpers Eigenheiten</b> .....	<b>2</b>
1.1.1	Molekülstruktur von Antikörpern.....	4
1.1.2	Die Antigen-Antikörper-Bindung.....	7
1.2	<b>Herstellung von Antikörpern</b> .....	<b>7</b>
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	<b>Reinigung von Antikörpern</b> .....	<b>24</b>
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	<b>Chemische Kopplung und Markierung von Antikörpern</b> .....	<b>35</b>
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	<b>Antikörper-Mikroarray</b> .....	<b>46</b>
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>Zellseparation</b> .....	<b>51</b>
2.1	<b>Trennung nach Zellgröße und Zelldichte – Zentrifugationstechniken</b> .....	<b>52</b>
2.1.1	Differenzialzentrifugation.....	52
2.1.2	Dichtegradienten-Zentrifugation.....	53
2.1.3	Separationsmedien.....	55
2.1.4	Gegenstromzentrifugation.....	63
2.2	<b>Trennung nach zellspezifischen Oberflächenmolekülen</b> .....	<b>64</b>
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
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	<b>71</b>
<b>3</b>	<b>Durchflusscytometrie</b> .....	<b>73</b>
3.1	<b>Wie funktioniert das eigentlich?</b> .....	<b>74</b>
3.2	<b>Fluoreszenzen</b> .....	<b>78</b>

3.3	<b>Probenvorbereitung</b> .....	82
3.3.1	Zellmarkierung.....	82
3.4	<b>Inbetriebnahme des Durchflusscytometers</b> .....	87
3.5	<b>Kompensation und Messung</b> .....	87
3.5.1	Kompensation .....	89
3.5.2	Messung .....	93
3.6	<b>Auswertung</b> .....	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	<b>Modelle und Ausstattungen</b> .....	98
3.7.1	Autosampler .....	98
3.7.2	Zellsorter .....	98
3.8	<b>Vergleichbarkeit durchflusscytometrischer Daten</b> .....	100
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	100
4	<b>Quantitative Immunoassays</b> .....	103
4.1	<b>Assaykonzepte</b> .....	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	<b>Radioimmunoassay (RIA)</b> .....	108
4.2.1	Historisches .....	108
4.2.2	Praktisches .....	108
4.3	<b>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</b> .....	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	<b>ELISPOT-Assay</b> .....	117
4.4.1	Anwendung und Vergleich mit anderen Methoden .....	117
4.4.2	Prinzip und Praxis .....	118
4.5	<b>Partikel-Immunoassay (PIA)</b> .....	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	<b>Verstärkersysteme</b> .....	124
4.6.1	Erhöhung der Markerdichte .....	125
4.6.2	Multi-Enzym-Kaskaden .....	125
4.6.3	Immuno-PCR .....	127
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	130
5	<b>Western-Blot</b> .....	133
5.1	<b>Probenvorbereitung</b> .....	134
5.2	<b>Auftrennung eines Proteingemisches mittels Gelelektrophorese</b> .....	135
5.2.1	Die diskontinuierliche SDS-PAGE .....	135
5.2.2	Native Gelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung .....	139

5.3	<b>Transfer der Proteine auf eine Membran (Blot)</b> .....	141
5.3.1	Wet-Blot .....	142
5.3.2	Semi-Dry-Blot .....	143
5.3.3	Fehlerquellen .....	143
5.4	<b>Proteindetektion</b> .....	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	<b>Dot- und Slot-Blot</b> .....	149
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	149
6	<b>in situ-Immunlokalisation</b> .....	151
6.1	<b>Untersuchung von Zellsuspensionen</b> .....	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	<b>Untersuchung von Geweben</b> .....	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	<b>Immunelektronenmikroskopische Untersuchung von Geweben</b> .....	176
6.3.1	Fixierung .....	176
6.3.2	Einbettung .....	177
6.3.3	Mikrotomie .....	177
6.3.4	Immundetektion .....	178
6.4	<b>Tissue Microarrays</b> .....	178
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	179
7	<b>Immunpräzipitation</b> .....	181
7.1	<b>Die Klassiker</b> .....	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	<b>Immunpräzipitation »heute«</b> .....	192
7.2.1	Die Präzipitationsmatrix .....	192
7.2.2	Reduktion unspezifisch präzipitierender Proteine .....	192
7.2.3	Analyse der Immunpräzipitate .....	193
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	194

8	<b>Die Zelle: leben, fressen, sterben</b> .....	197
8.1	<b>Zellviabilitätsbestimmung</b> .....	198
8.1.1	Farbstoff-Exklusion .....	198
8.1.2	Tetrazoliumsalz-Reduktion .....	199
8.1.3	ATP-Assay .....	199
8.2	<b>Zellproliferation</b> .....	201
8.2.1	DNA-Markierung mit [ <sup>3</sup> 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	<b>Phagocytose-Assays</b> .....	203
8.3.1	Die Testpartikel – Futter für die Phagozyten .....	205
8.3.2	Methoden der Partikelvisualisierung .....	206
8.4	<b>Zellvermittelte Cytotoxizität</b> .....	209
8.4.1	Chrom[ <sup>51</sup> Cr]-release-Assay .....	210
8.4.2	Lactat-Dehydrogenase(LDH)-release-Assay .....	211
8.4.3	Durchflusscytometrischer Cytotoxizitätsnachweis .....	212
8.5	<b>Apoptose-Assays</b> .....	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
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	219
9	<b>Immunologie in der klinischen Anwendung</b> .....	223
9.1	<b>Blutgruppenbestimmung</b> .....	224
9.2	<b>HLA-Typisierung</b> .....	227
9.2.1	Lymphocytotoxizitätstest .....	228
9.3	<b>Lymphoblastentransformation</b> .....	230
9.4	<b>Immunzellen in der Therapie</b> .....	231
9.4.1	Dendritische Zellen .....	232
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	236
10	<b>Ein kurzer Ausflug in die ungeliebte Welt der Statistik</b> .....	237
10.1	<b>Deskriptive Statistik</b> .....	240
10.1.1	Lokationsmaße .....	240
10.1.2	Streuungsmaße .....	242
10.1.3	Korrelationsmaße .....	244
10.2	<b>Prüfstatistik</b> .....	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
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	254

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