

# 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 |