

# 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	Tetrazoliumsaz-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 Phagocyten .....	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

Der Experimentator: Immunologie

Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D.

2014, XVIII, 299 S. 91 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-642-41898-3