

Zellbio Themen 2

Antikörper-Spezies:

- Wahl des Spezies: - hängt von Faktoren wie gewünschten Antikörpermengen, Spezifität, Affinität sowie Anwendung ab.
- der Homologie des Antigens zum korrespondierenden Protein des Tiers ab
 - Menge an benötigtem Antiserum & verfügbarem Antigen beeinflussen die Auswahl

- Alter und Gesundheit der Tiere
- sollten gesund & nicht gestresst sein
 - zu junge können Immuntoleranz entwickeln, ältere langsam reagieren
 - Optimales Immunisierungsalter variiert nach Spezies (z.B. Kaninchen ab 3 Monaten)

Applikation:

Methoden Subkutan: - Unter die Haut z.B. bei Antikörpern gegen Autoimmunerkrankungen
↳ schonendsten und meist bevorzugt

Intravenös: - Direkt in die Blutbahn z.B. monoklonalen Antikörpern
↳ Krebsimmuntherapie

Intramuskulär: - In den Muskel, bei Impfstoffen mit Antikörper-induzierenden Wirkstoffen

Oral: - Selten, da Antikörper im Magen-Darm-Trakt oft abgebaut werden.

Primär- vs. Boosterinjektion: - Depotwirkung bei Primärijektion wichtig
↳ bei Boostern schnelle Antigenverfügbarkeit entscheidend.

Adjuvantien

Hauptzweck in einer: - Verstärken und verlängern der Immunisierung

- ↳ verlängern die Verfügbarkeit des Antigens im Körper
- ↳ aktivieren Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen)
- ↳ Antigen bleibt länger präsent
- ↳ stärkere Immunreaktion.

- Verlauf:
1. Anlocken von Immunzellen zum Antigen
 2. Depotbildung für verzögerte Freisetzung des Antigens
 3. Stärkere Stimulierung des Immunsystems
 4. Förderung der Produktion spezifischer Antikörper

Unterschied FCA/FIA:

Kompletten Freund'schen Adjuvans (FCA): Enthält Paraffinöl, ein Emulgator (Mannose-Monooleat) & abgetötete Mykobakterien
(kann lokale Entzündungen hervorrufen)

Emulgator (Mannose-Monooleat) & abgetötete Mykobakterien
- Sehr starke stimulierende Wirkung

Inkompletten Freund'schen Adjuvans (FIA): Enthält Paraffinöl, Emulgator

↳ keine abgetöteten Mykobakterien
- Weniger stark stimulierend
↳ Attenuation geeignet

Einschränkung der Anwendung des FCA gemäß Tierschutz: - Nur verwenden, wenn gemäßigte Alternativen keinen Erfolg zeigen

- Nur subkutane Applikation in minimalen Volumina erlaubt
- Andere Applikationsarten verboten
- Hühner von manchen Einschränkungen ausgenommen

Nebenwirkungen von FCA & FIA: - Entzündungen, Fieber

- Abszesse, Reaktionen an Einstichstellen
- Bildung von Granulomen & Myelomen

der Menge

Reduzierung des Antigen bei \pm -verstärkte Immunantwort (durch geeignetes Adjuvans warum? Adjuvantien) reduziert benötigte Antigenmenge.

- Weniger Applikationen erforderlich
- Reduzierung von Belastung & Nebenwirkung

Auswahl des Adjuvans: - Tierschutz & Minimierung von Leid ethischen Überlegung

- Verwendung von Alternativen mit geringeren Nebenwirkungen
- FCA nur als letzte Option nutzen
- Geringe Adjuvans
- Sicherheitsrisiko minimieren

Polyklonale Antikörper

Definition: - Mischpopulationen von Antikörpern, werden von verschiedenen B-Zellen-Kolonien produziert.
↳ sind gegen verschiedene Epitope eines Antigens gerichtet.

- Können als polyklonales Antiserum oder aufgereinigte Form (z.B. reine IgG-Fraktion) vorliegen

Herstellung: 1. Immunisierung: Antigen wird dem Tier verabreicht, um eine Immunantwort auszulösen.

2. Antikörperproduktion: B-Zellen des Wirts produzieren Antikörper gegen das Antigen

3. Blutentnahme: Nach einer bestimmten Zeit vom Tier entnommen.

4. Isolation: Die Antikörper werden aus dem Blut extrahiert und gereinigt.

Herstellung kann 4-6 Wochen bis zu Monaten dauern, abhängig von den Bedingungen & Optimierungen.

Vorteile: Kostengünstiger und schneller als von monoklonalen

- Erkennung mehrerer Epitope
- ↳ nützlich bei Antigenen mit komplexen oder variablen Strukturen.

Nachteile: - durch verschiedene B-Zellen

- ↳ Chargenunterschiede aufweisen
- weniger spezifisch als monoklonale
- ↳ hohe Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen

Monoklonale Antikörper

Definition: Werden von einem einzelnen B-Zellklon produziert und sind spezifisch für ein einziges Epitop

Hybridomatechnologie: Fusion von B-Zellen (Antikörperproduktion) mit Myelomzellen (unbegrenzte Teilungsfähigkeit)

Herstellung: 1. Immunisierung

- ↳ In vivo: Antigen wird in ein Tier injiziert
- ↳ B-Zellen aus Milz oder Lymphknoten

- ↳ In vitro: B-Zellen in Kultur mit Antigen versetzt (zeit- & materialsparend)

2. Fusion

- B-Zellen mit Myelomzellen (3:1) durch Polyethylenglykol (PEG) fusioniert
- PEG zerstört Zellmembran, um Fusion zu ermöglichen, die nach Rückverdünnung des PEG stabilisiert wird.

3. Selektion

- Hybridome im HAT-Medium kultiviert, nur fusionierte Zellen überleben (Kombination von HGPRT & Unsterblichkeit)

4. Isolierung spezifischer Klone

- Einzelne Hybridomzellen durch Verdünnungsreihen isoliert
- ↳ Produziert spezifische Antikörper

5. Antikörperproduktion

- Hybridomzellen vermehren sich in Kultur
- ↳ Antikörper werden aus dem Medium gewonnen

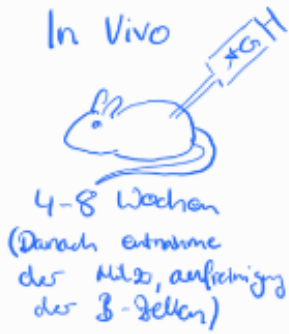
Vorteile: - Hohe Spezifität, konsistente Produktion

Nachteile: Aufwändige & teurerer Herstellung

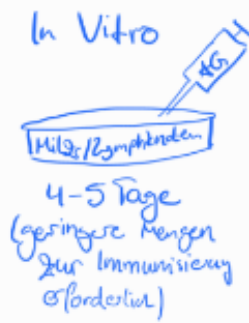
Monoklonale AK Herstellung

Kultivierung von AK

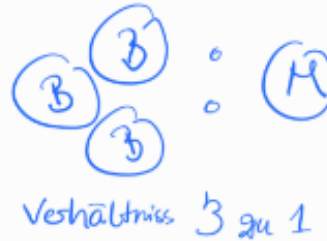
In Vivo



In Vitro

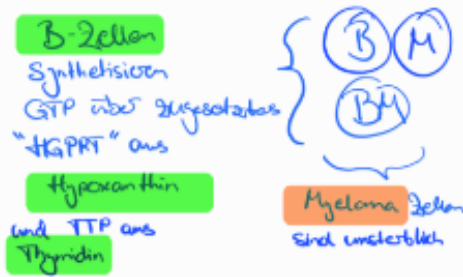


Fusionierung mit Myelomazellen (Klons)



durch Polyethylenglykol (PEG zerstört die Zellmembran)

Selektion



andere Zellen ohne "neo" Synthese sterben ab, oder deren die Synthese von einem anderen Nucleotid fehlt



- B-Zellen sterben nach 40 Tagen ab
- Myeloma Zellen können nichts synthetisieren, d.h. tot nach wenigen Generationen

Spezifischer AK



24 x 100µl pro Verdünnung



Klone werden getestet

"Es kann nur einen geben" - Highlander

evtl. Cryokonservierung vom Rest

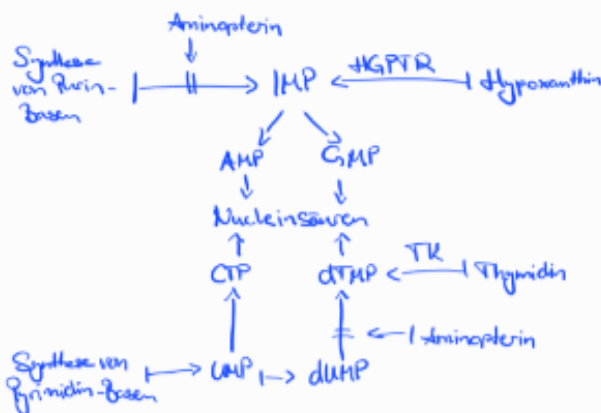
Mono-Highlander-Klon (Hybridoma Zelle)

↓ produziert AK's

↓ anreichern



HAT-Medium (Selektives Medium)



Klassischer (Indirekter) ELISA

Definition: Methode zur quantitativen oder qualitativen Bestimmung von Antikörpern (z. B. Serumprobe)

- es wird ein sekundärer Antikörper verwendet um primäre Antikörper zu detektieren

Ablauf:

1. Beschichtung der Platte
 - Ein spezifisches Antigen wird an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden
2. Blockierung
 - Nicht spezifische Bindungsstelle mit Milch- oder Proteinpuffer blockieren
3. Probe
 - Serumprobe hinzugeben \rightarrow spezifische Antikörper binden an das Antigen
4. Sekundärantikörper
 - Enzym-gekoppelter sekundärer Antikörper bindet an primären Antikörper
5. Substratreaktion
 - Enzym des sekundären Antikörper setzt Substrat um \rightarrow farbiges Reaktionsprodukt entsteht
6. Messung
 - Farbintensität korreliert spektrometrisch mit pri. Antikörpermenge

Sandwich-ELISA

Definition: dient zur Bestimmung von Antigenen und nutzt zwei Antikörper, die spezifisch für verschiedene Epitope desselben Antigens

Ablauf:

1. Beschichtung der Platte
 - Capture-Antikörper (Fang-Antikörper) wird auf die Platte gebunden
2. Blockierung
 - nichtspezifische Bindungsstellen werden blockiert \rightarrow Minimierung unspezifischer Bindungen
3. Probe
 - Probe wird hinzugefügt \rightarrow Antigen bindet spezifisch an Capture-Antikörper
4. Detektionskörper
 - Zugabe zweiter Antikörper (Detektionskörper) erkennt anderes Epitop des Antigens \rightarrow direkt enzym-gekoppelt oder mit einem sekundären, enzym-gekoppelten Antikörper erkannt
5. Substratreaktion
 - Substrat wird hinzugefügt, das vom Enzym umgesetzt wird, \rightarrow farbiges Produkt entsteht
6. Messung
 - Farbintensität korreliert mit Antigenmenge in der Probe