



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



7. Praktikum: Immunhistochemie, Fluoreszenzmikroskopie

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2023.

Direkte Immunhistochemie

Schritte des Praktikums:

1. Isolierung der Mausmilz, Gewebsschnitt und Fixierung. (Schon erledigt)
2. Inhibition der **endogenen Peroxidase** Enzymaktivität mit Phenylhydrazin (**GIFTIG**), gelöst in PBS, für 10 Minuten.
3. Mit PBS für 2x2 Minuten auswaschen. (PBS: Phosphate buffered saline)
4. **Blocken der nicht spezifischen Protein Bindungsstellen** mit einer 5% BSA-PBS Lösung für 10 Minuten. (BSA: bovine serum albumin)
5. Markieren des **Antigens** (Maus Thy-1, T Zell Marker) mit HRP-konjugierten anti-Maus Thy-1 **monoklonalen Antikörpern** für 30 Minuten.
6. Mit PBS for 3x2 Minuten auswaschen.
7. **Chromogen** (AEC: Amino-Ethylcarbazol, **GIFTIG**) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Substrat), gelöst in 0,1 M Na-Acetat-Puffer, **hinzufügen**. (pH 5.2)
8. Die histologischen Präparate im Mikroskop betrachten.



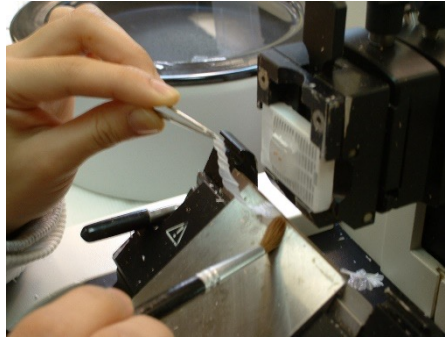
**HANDSCHUHE
TRAGEN!**

Immunhistochemie 1.

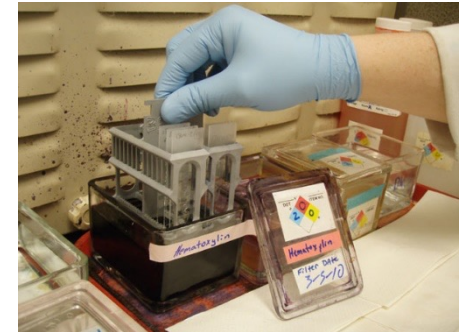
1. Warum „histo“? → **Histologie** (Ihr habt solche Gewebsschnitte schon gesehen)



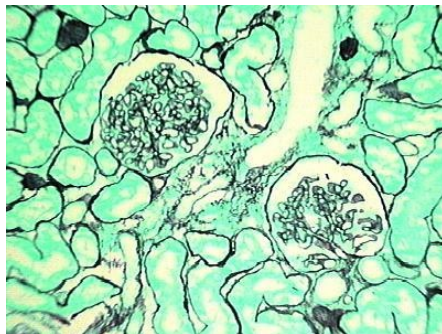
1. Probe
Gewinnen



2. Gewebsschnitte
herstellen



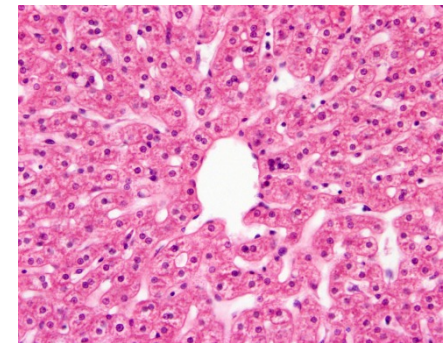
3. Färben
der Schnitte



Glomeruli (Gömöri
Silberimprägnation)



4. Untersuchen des
Schnitts im Mikroskop



Leber (H&E Färbung)

Immunhistochemie 2.

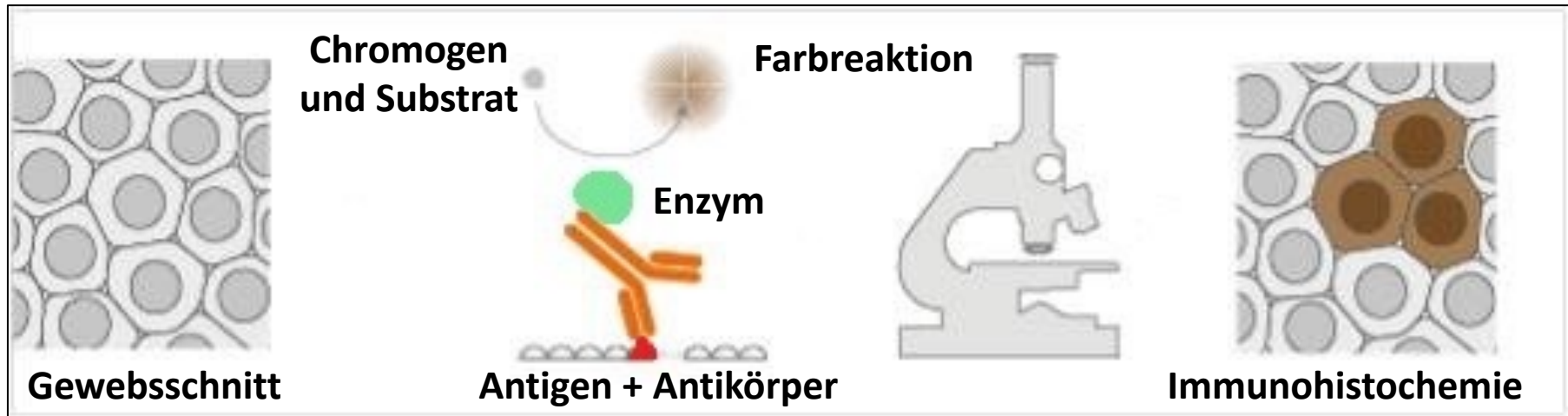
2. Warum „histochemie“?

- Analyziert die chemische Zusammensetzung des Gewebes.^[1.]
- Z.B. im Fall von H&E Färbung:
 - Hämatoxylin → Bindet saure Moleküle („basophile“ z.B. DNA im Zell-kern)
 - Eosin → Bindet basische Moleküle („eosinophile“ z.B. Proteine im Zytoplasma, Kollagen in der extrazellulären Matrix, usw.)

3. Warum „Immunhistochemie“ (IHC)?

- Es basiert auf einer **Antikörper-Antigen Reaktion**.
- Ziel: Detektieren eines **Antigens** im Gewebe durch Verwendung eines **Antigen-spezifischen Antikörpers**. (Auf der Zelloberfläche, in der Zelle oder im extrazellulären Raum)
- Die Antikörper-Antigen Reaktion ist **für sich genommen nicht detektierbar**, aber kann durch Konjugation der Antikörper mit **Reportermolekülen** visualisiert werden. (siehe vorheriges Praktikum)
- Im Fall der Enzym-Immunhistochemie ist das Reportermolekül ein **Enzym**, das das Chromogen in ein **unlösliches und farbiges Endprodukt** umwandelt das unter dem Mikroskop visualisiert werden kann sobald das Chromogen und das Substrat hinzugefügt wurden.
- Im Fall der fluoreszenz (IF, Immunfluoreszenz) ist das Reportermolekül ein Fluorochrom. (siehe später)

Enzym Immunhistochemie



Häufig genutzte Enzyme:

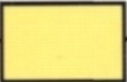


1. **HRP** = Horseradish peroxidase (Meerrettich PO)
2. **ALP** = Alkalische Phosphatase



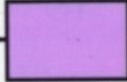
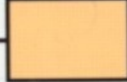






Die häufigst genutzten Chromogene:

- **DAB (Diaminobenzidin)**
- **AEC (Amino Ethylcarbazol)**

- **NBT (Nitro blau Tetrazolium)**

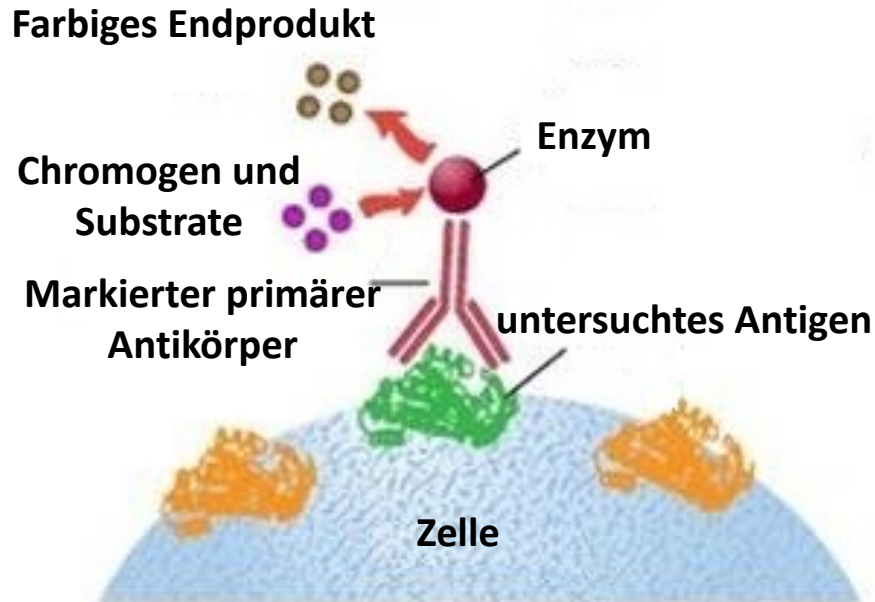
ALP	p-nitrophenyl phosphate (pNPP)		soluble	ELISA
	Nitro blau Tetrazolium (NBT)		insoluble	histochemie, immunoblotting
	Fast Red		insoluble	histochemie, immunoblotting

Peroxidase	ABTS		soluble	ELISA
	o-phenylenediamine (OPD)		soluble	ELISA
	tetramethylbenzidine (TMB)		soluble	ELISA
	o-dianisidine		soluble	ELISA
	5-aminosalicylic acid (5-ASA)		soluble	ELISA
	diaminobenzidine (DAB)		insoluble	histochemie, immunoblotting
	3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)		insoluble	histochemie, immunoblotting
	4-chloro-1-naphthol (4C1N)		insoluble	histochemie, immunoblotting

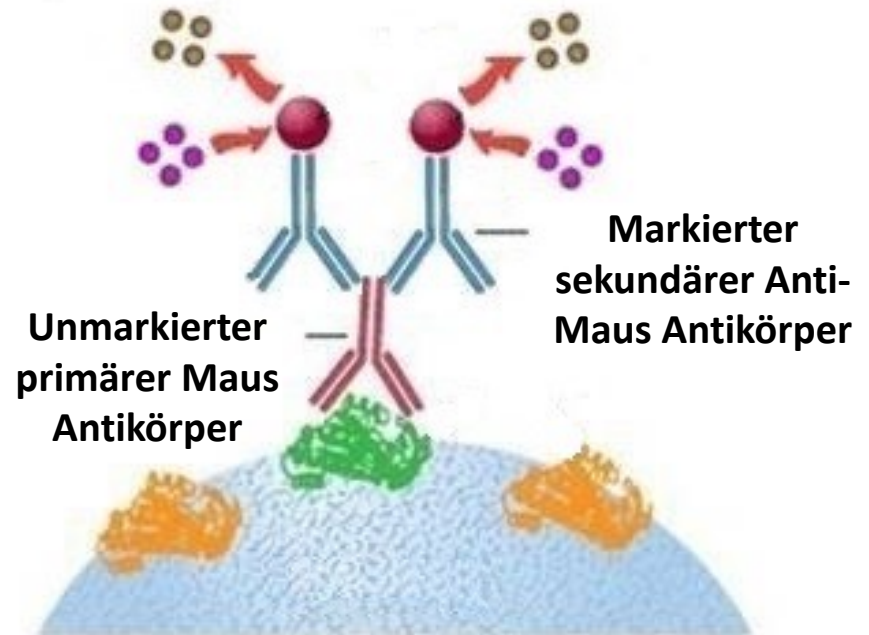
Man muss beachten ob das **Endprodukt** des Chromogens **löslich oder unlöslich** ist :

- Im Fall der Enzym-IHC **muss** das Enprodukt **unlöslich** sein, da es sonst weg-diffundieren würde. Ein unlösliches Endprodukt verbleibt am Reaktionsort und ermöglicht die visualisierung der Antigen-Antikörper Reaktion unter dem Mikroskop.
- Im Fall von **ELISA** muss ein Chromogen mit einem **löslichen** Endprodukt gewählt werden. (siehe Später)

Direkt oder indirekt?



Direkte IHC



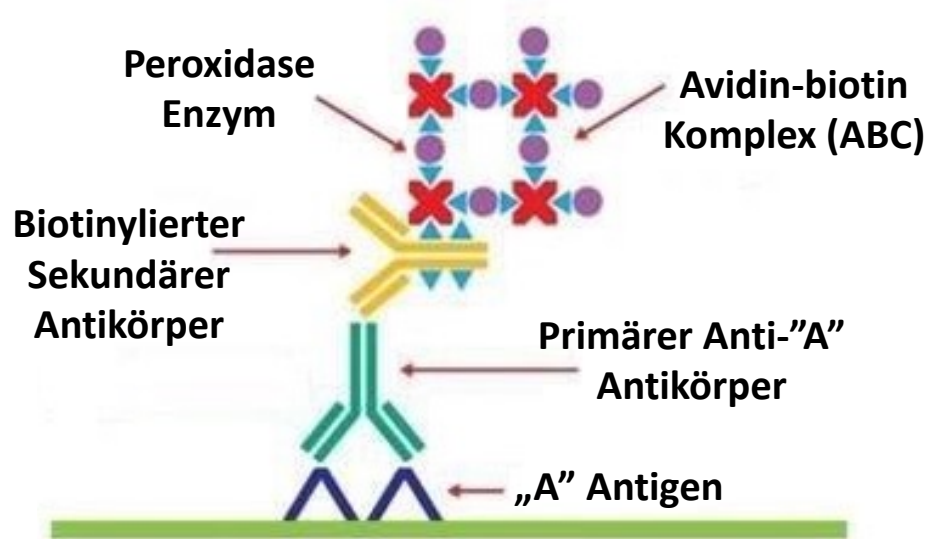
Indirekte IHC

Die **indirekte Methode** wird normalerweise für Enzym-IHC bevorzugt da sie mehrere Vorteile hat (obwohl sie Zeitintensiver ist):^[2.]

- **Das Signal ist stärker.** (Besonders nützlich wenn das Antigen nur in geringer Menge im Gewebe vorhanden ist.)
- Langfristig ist es **billiger.** (Der selbe markierte Antikörper kann zur Detektierung verschiedener primär Antikörper verwendet werden. Markierte Antikörper sind normalerweise teurer.)

Komplexe Detektorsysteme

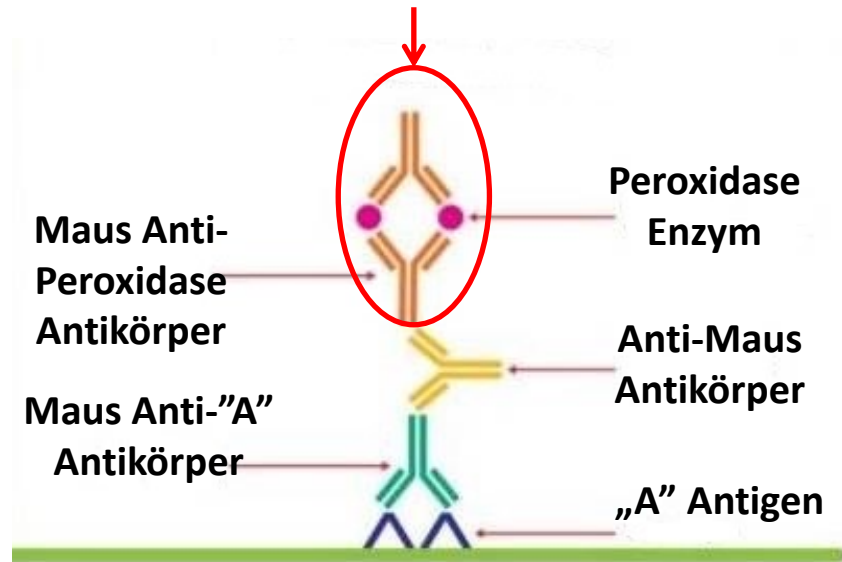
Avidin-Biotin Komplex (ABC)



Die Biotin-Avidin Bindung ist die stärkste bekannte nicht-kovalente Interaktion zwischen einem Protein und seinem Liganden. Das Enzym ist an Biotin gebunden und das Avidin vernetzt den biotinilierten Antikörper und die biotinilierten Enzyme und bildet große Enzymkomplexe.^[3.]

Vorteil: **Signalverstärkung**

PAP (Peroxidase Anti-Peroxidase Komplex)

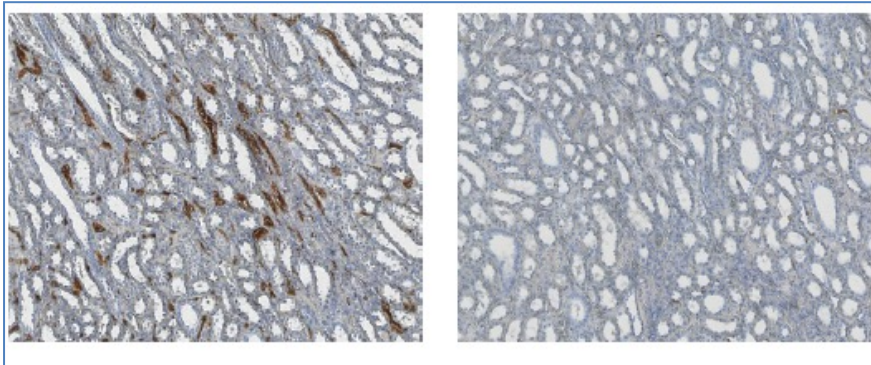


Tiere werden mit Peroxidase immunisiert und dann werden Anti-Peroxidase Antikörper aus dem Tierserum isoliert. Sowohl Peroxidase als auch Anti-Peroxidase Antikörper werden hinzugefügt und bilden Komplexe (PAP) ^[4.]

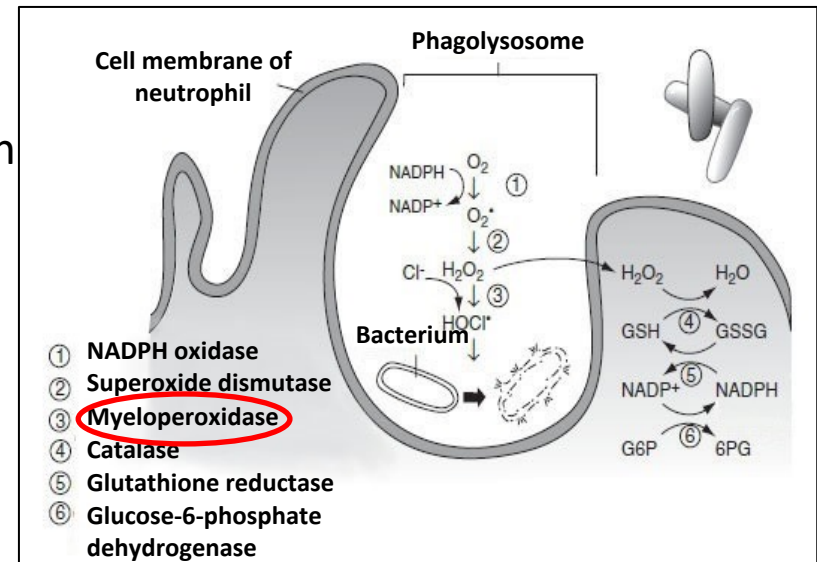
Vorteil: **Signalverstärkung**

Hemmung der endogenen Peroxidase

- Warum ist es notwendig?
 - Einige Zellarten enthalten Peroxidase. erinnern Sie sich? → z.B. **oxidativer Burst** in myeloischen WBCs (z.B. Neutrophile, Monozyten/Makrophagen → 2. Praktikum)
 - Ihre Enzyme transformieren ebenfalls das Substrat → **nicht-spezifischer Hintergrund**
- Die endogene Peroxidase muss gehemmt werden **ehe** die markierten Antikörper hinzugefügt werden.^[5.]



Aktivität der endogenen Peroxidase in der Niere kein nicht-spezifisches Signal



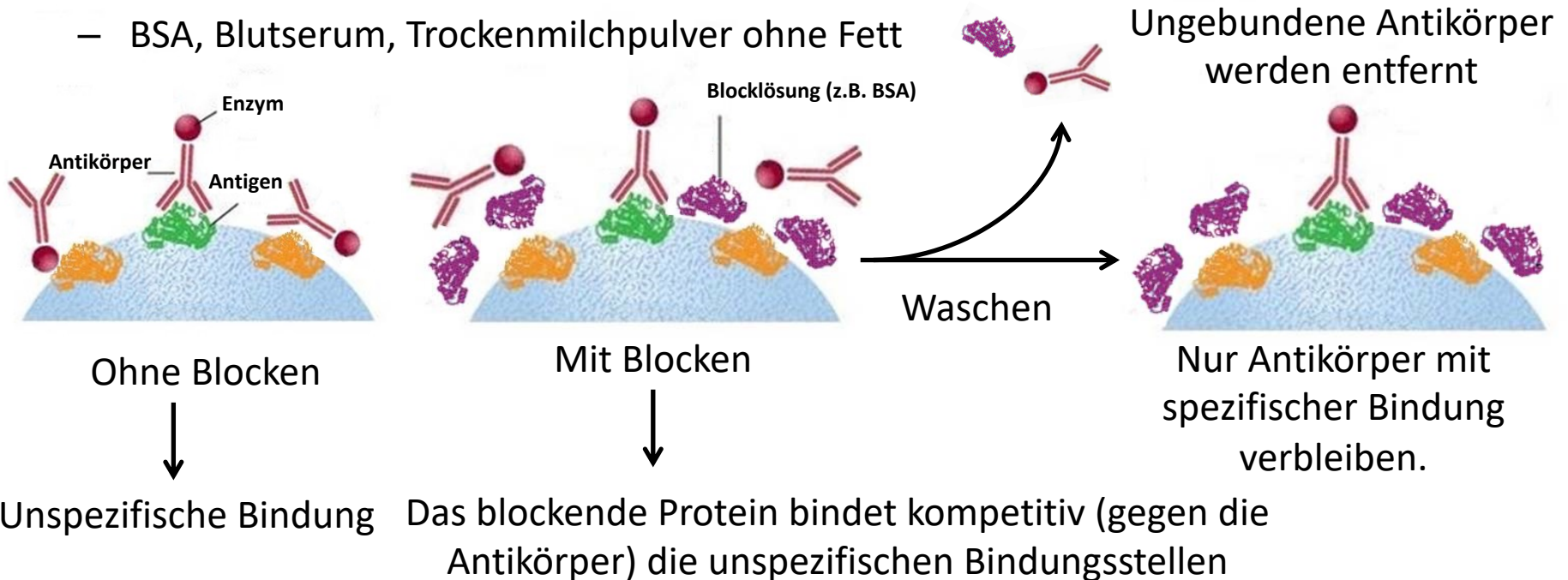
Haupt Inhibitoren:^[6.]

- Phenylhydrazin
- Wasserstoffperoxid
- Azide

Blocken

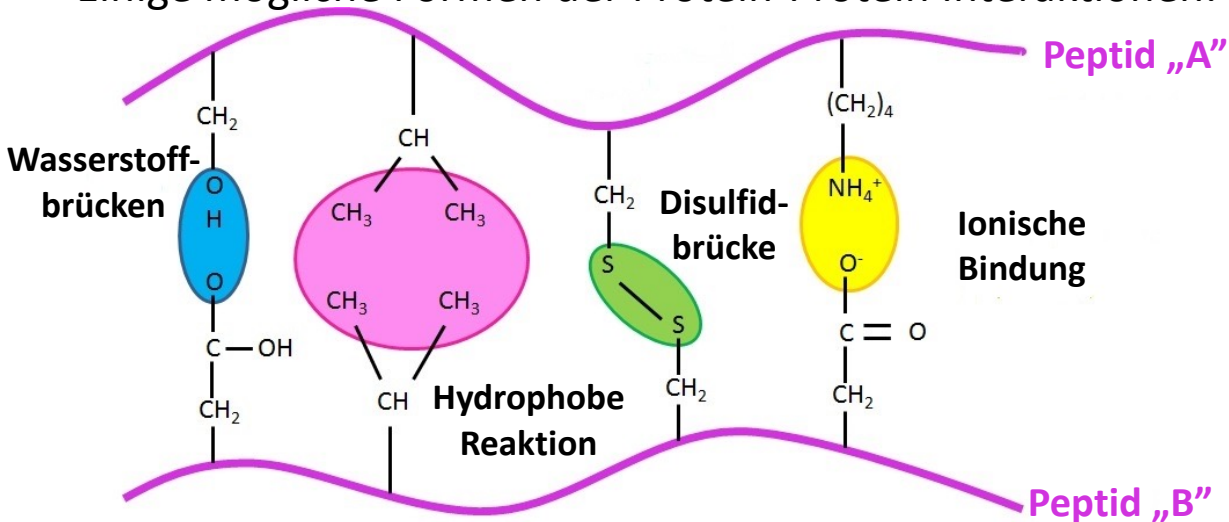
- Warum ist es notwendig?
 - Obwohl die Antigen-Antikörper Reaktion spezifisch ist können **nicht-spezifische Protein-Protein Interaktionen** zwischen Antikörpern und Proteinen in Geweben stattfinden. (Siehe nächste Folie) → **nicht-spezifischer Hintergrund**
- Unspezifische Bindungsstellen sollte vor Hinzufügen des Antikörpers **geblockt** werden. Viele Proteinlösungen können genutzt dafür, abhängig vom Gewebe und dem Antikörper, genutzt werden, z.B.: [7.]

- BSA, Blutserum, Trockenmilchpulver ohne Fett

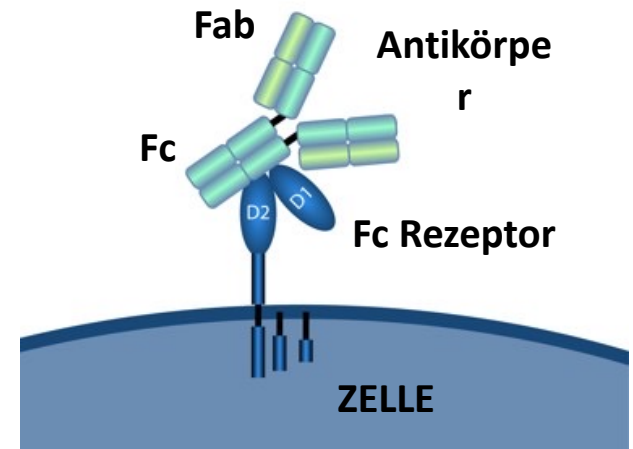


Nicht-Antigen-spezifische Protein-Protein Interaktionen

Einige mögliche Formen der Protein-Protein Interaktionen:

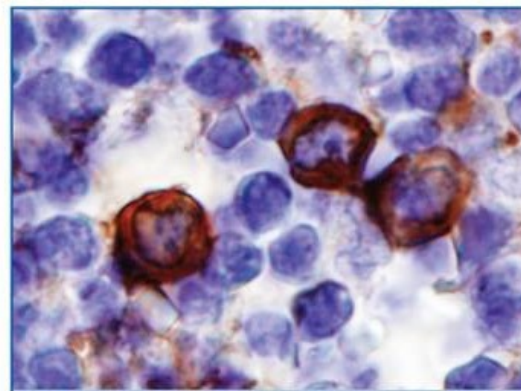
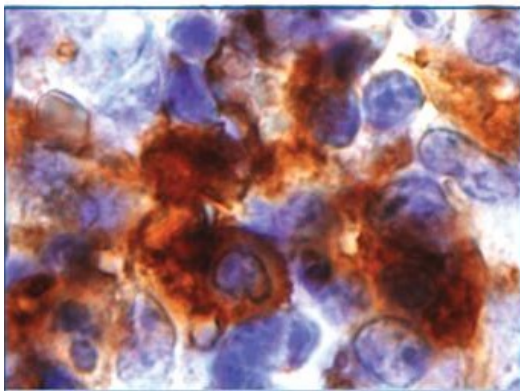


Problem ausschließlich bei Antikörpern:



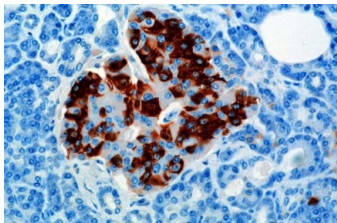
Fc Rezeptoren können durch unmarkierte Antikörper geblockt werden.

Detektion von CD14 (LPS Rezeptor) in einer menschlichen Tonsille ohne (links) oder mit Blocken. (rechts)

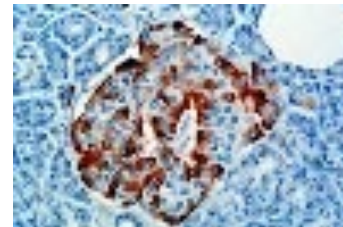


Doppelfärbung

- Nur ein Antigen kann im Gewebe bei Nutzung der klassischen IHC beobachtet werden. Wenn mehr als ein Antigen detektiert werden muss, muss man weitere Schnitte anfertigen und sie mit anderen Antikörpern färben. Z.B.:

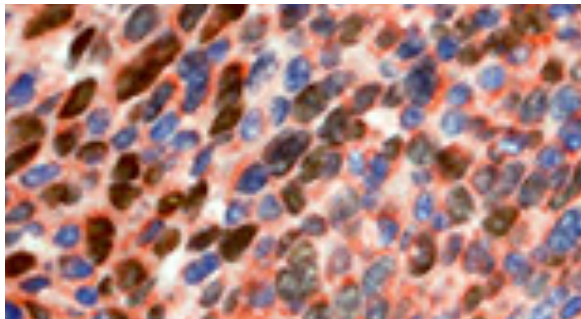


1. Schnitt : Anti-Insulin



2. Schnitt: Anti-Glukagon

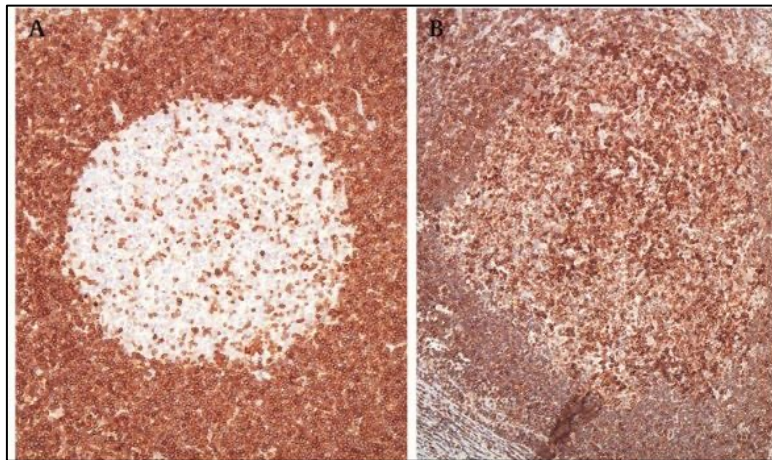
- Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung der Doppelfärbung. → Man fügt 2 Antikörper-Typen die jeweils **mit einem anderen Enzym konjugiert** sind und in einer **anderen Farbreaktion** resultieren die unterschieden werden kann.



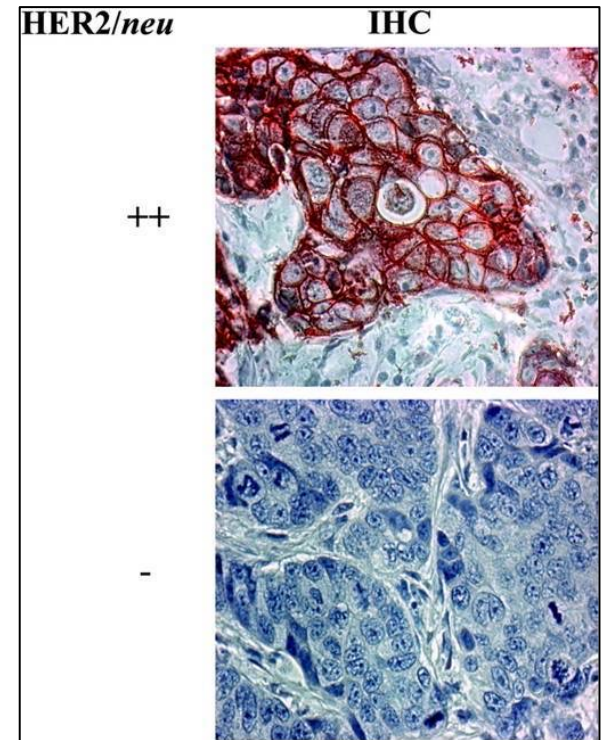
Ein Beispiel einer Doppelfärbung in menschlichem Prostatakarzinom-Gewebe. p53 kann als **braune Farbe** (DAB) beobachtet werden, während AIF (Apoptose-Induzierender Faktor) durch eine **rötliche Farbreaktion** (Fast Red) im gleichen Schnitt markiert ist.^[9.]

Klinische Bedeutung der IHC

1. Einige pathologische Zustände können nicht durch die alleinige Beurteilung des morphologischen Erscheinungsbildes unterschieden werden. Detektionsmarker die für bestimmte Krankheiten spezifisch sind haben große Bedeutung zur **Diagnose** dieser. (Mehr dazu in Pathologie nächstes Jahr)
2. Die An- oder Abwesenheit bestimmter Marker kann **prognostisch** wichtig sein und die Therapie des Patienten beeinflussen.



Detektion des Anti-Apoptotischen Bcl-2 in einem normalen Follikel (links) und in einem follikulärem Lymphom. (rechts)



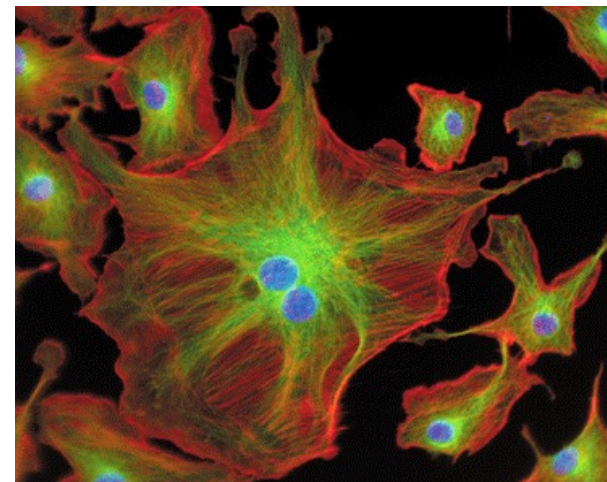
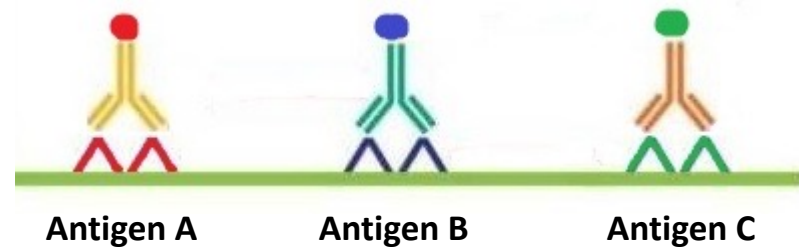
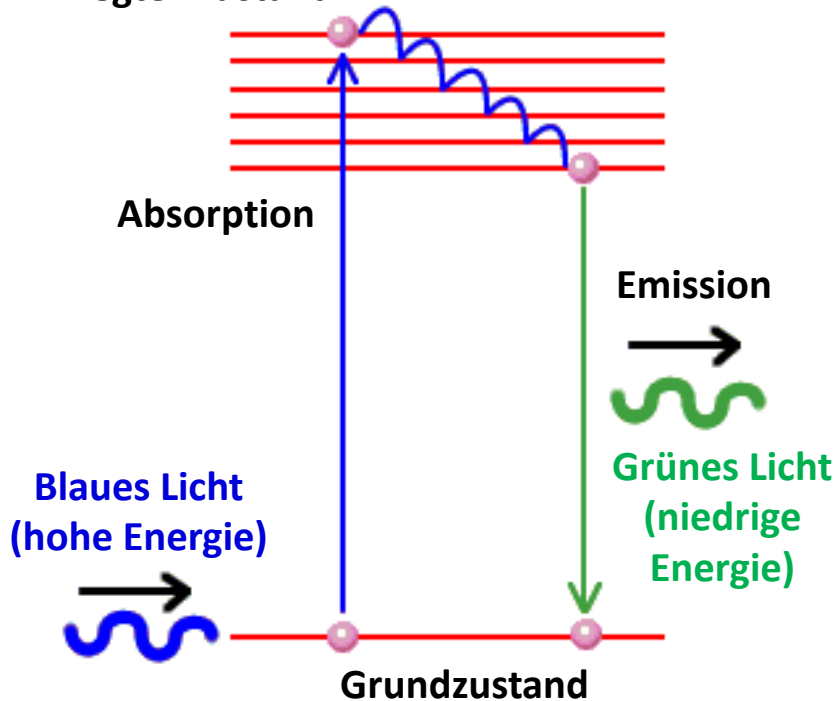
Die Tumorzellen des oberen Patienten haben eine starke HER2 exprimierung, wodurch der Patient mit Herceptin behandelt werden kann.^[8.] Die Zellen des unteren Patienten sind HER2-negativ.

Immunfluoreszenz Färbung

- **Mehrere unterschiedliche Antigene** können in der **gleichen Probe** durch Nutzung von Antikörpern die mit verschiedenen **Fluorochromen** markiert wurden gleichzeitig untersucht werden. ^[10.] (e.g. Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie, siehe später)

Rotes Fluorochrom Blaues Fluorochrom Grünes Fluorochrom

Erregter Zustand

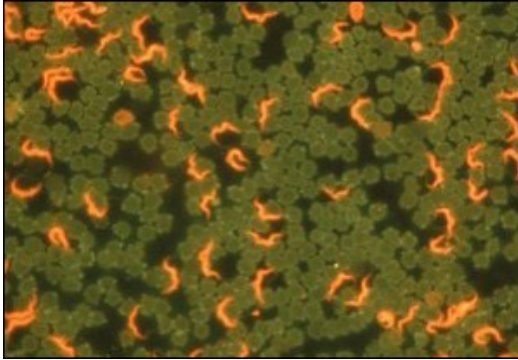


Grün: Tubulin
Rod: Aktin
Blau: Zellkern

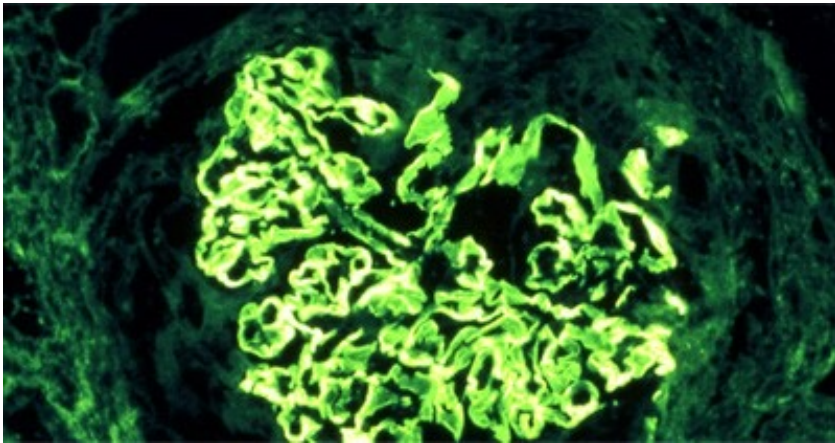
Grundlegendes Prinzip der Fluoreszenz

Fluoreszenzmikroskopisches Bild von Endothelzellen

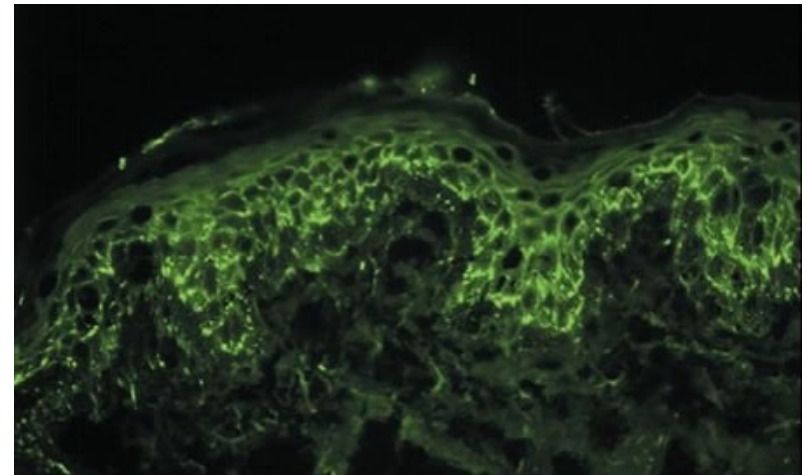
Klinische Bedeutung der Fluoreszenz- mikroskopie



Parasiten (*Trypanosoma*) im peripheren Blut eines Patienten gefärbt mit einem Antikörper der mit einem orangenem Fluorochrom markiert ist. (Acridine Orange)



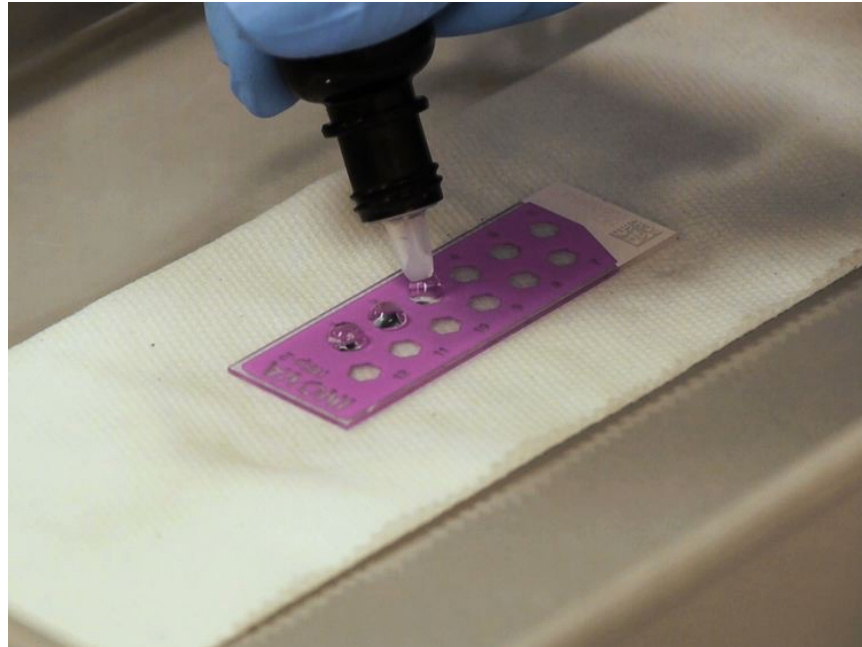
Lineare Ablagerung von IgG entlang der glomerulären Basalmembran eines Patienten mit Goodpasture Syndrom. (siehe später)



Interzelluläre Ablagerung von IgG in Haut-epidermis eines Patienten mit Pemphigus vulgaris. (siehe später)

IMMUNFLUORESCENZ

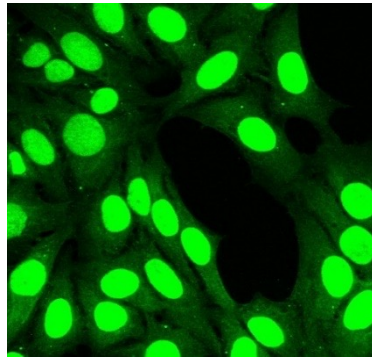
„ Der Goldstandard“



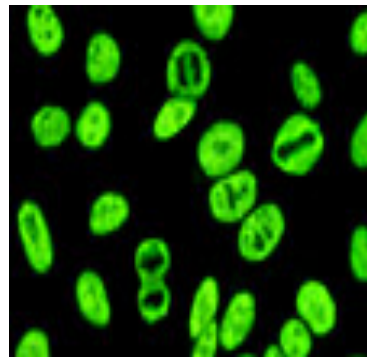
ANA-Screening – Bestimmung antinukleärer Antikörper – IIF

Ein zusammenfassender Name für mehrere verschiedene Autoantikörper.

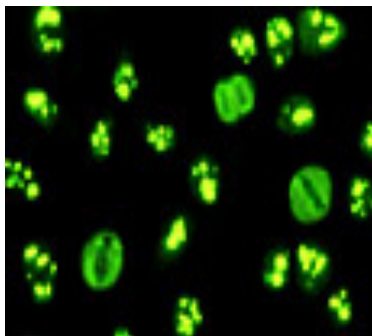
Screening-Test, der am häufigsten angeordnete Test.



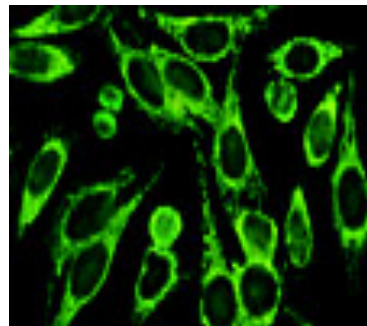
Anti-dsDNA +



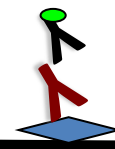
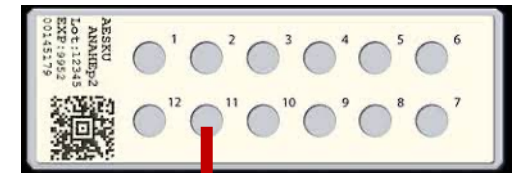
Anti-PMScl+



Anti-SSA/SSB+ ?



AMA-M2 +

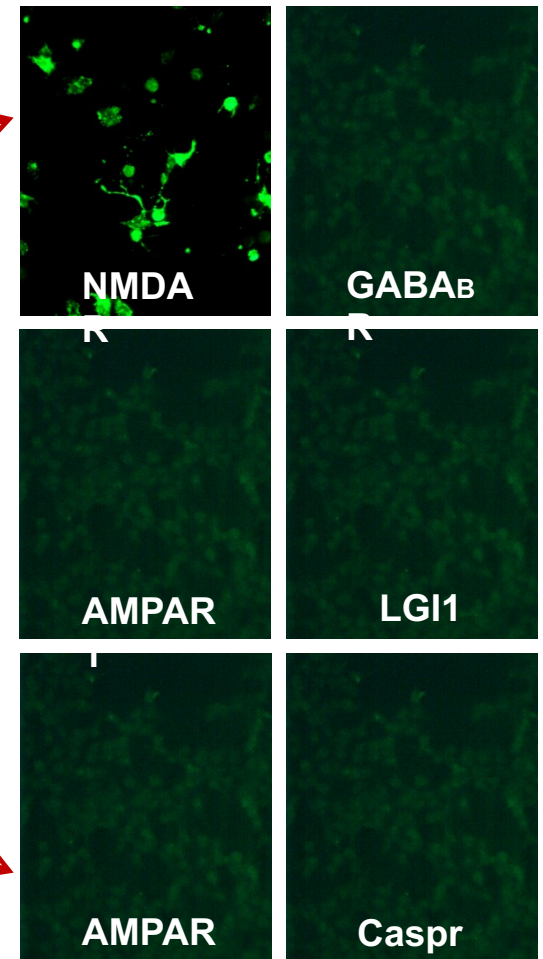
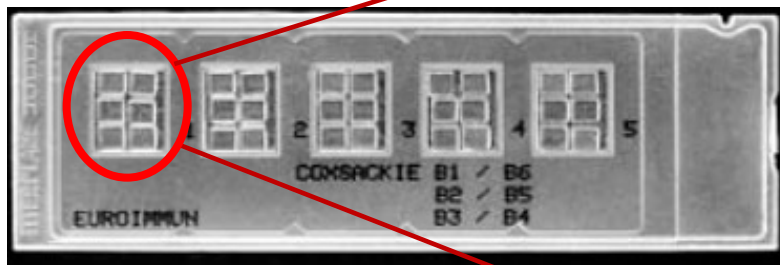


Hep-2-Zelle

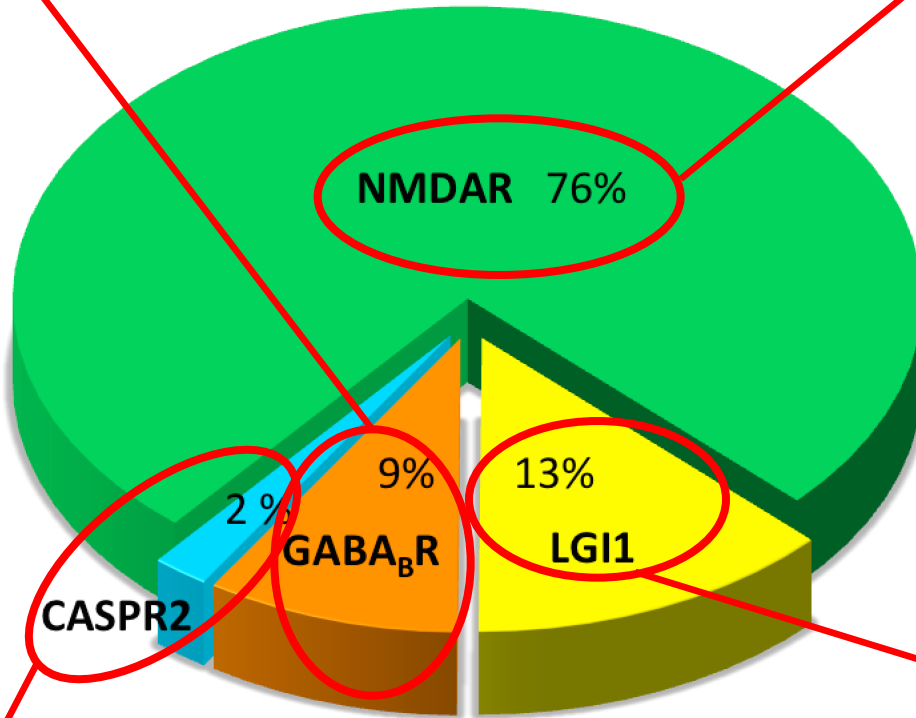
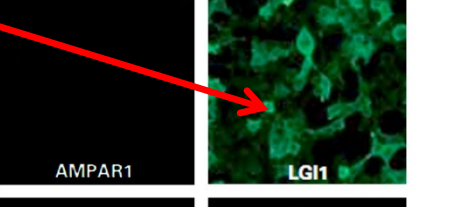
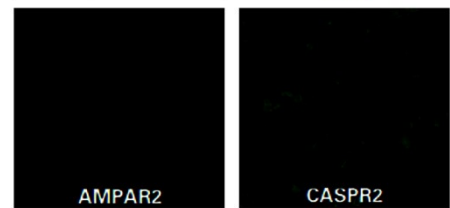
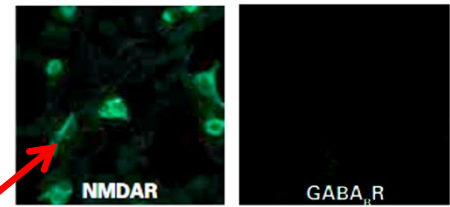
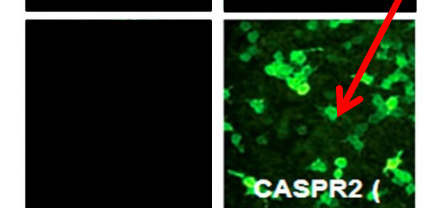
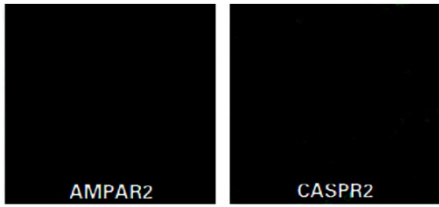
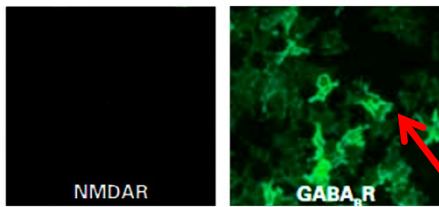
1. Serum-Autoantikörper
2. Anti-human IgG-FITC

Zellbasierter, indirekter Immunfluoreszenz-BIOCHIP

1. Auftragen und Inkubation des Patientenserums-
(1:10x) und der Liquorprobe (1:1) auf dem Biochip auf
dem Objektträger
2. Anwendung von Anti-Human-IgG-FITC
Sekundärantikörper
3. Mikroskopische Analyse



Auf dem Biochip befinden sich HEK293-Zellen, die mit den Genen von 6 Rezeptorproteinen transfiziert wurden und diese hoch exprimieren.

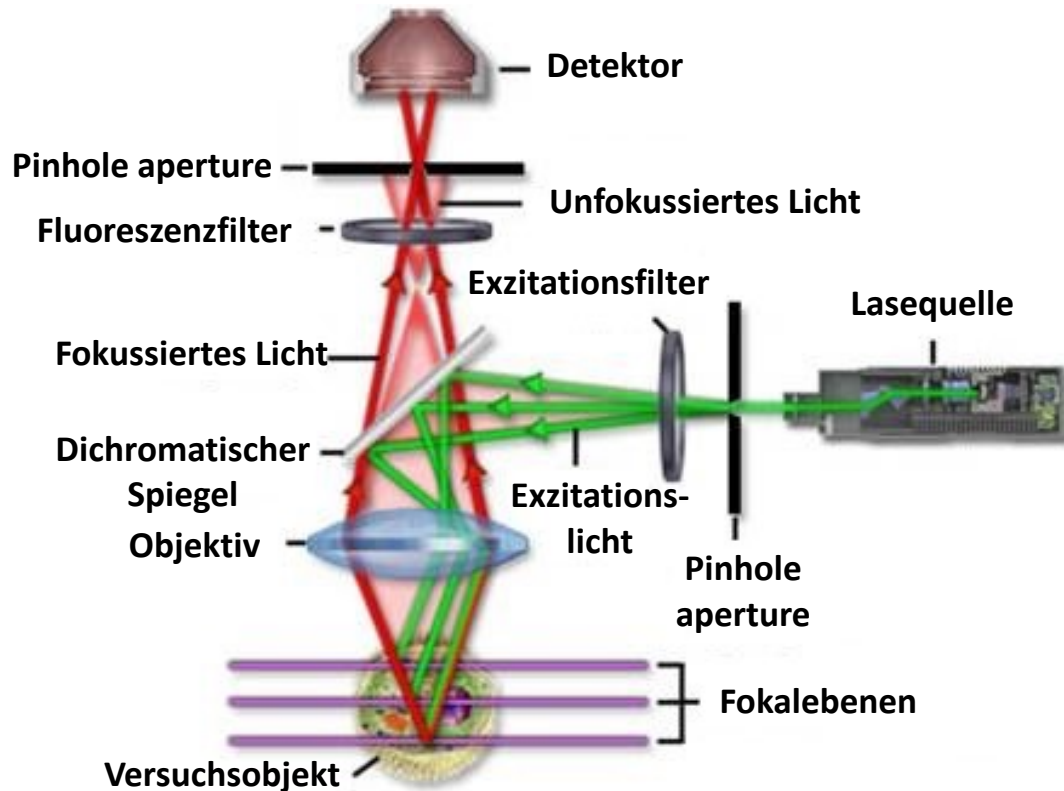


Anzahl der Untersuchungsanfragen (2011.06.30.-2017.08.08.)	836	
Anzahl der untersuchten Patienten	717	100%
Anzahl positiver Fälle	54	7,53%

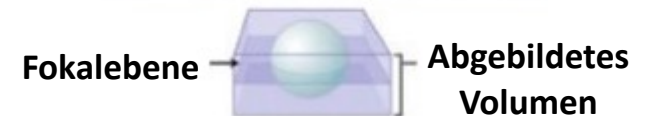
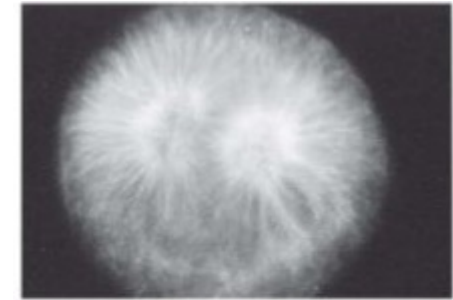
Gegen die anderen Rezeptoren wurden keine positiven Proben gefunden.

Konfokalmikroskopie

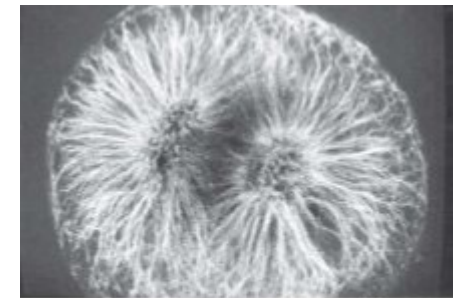
- Normale Mikroskope: Bieten ein summiertes Bild des gesamten Volumens des Schnitts (ähnlich dem klassischen Röntgen)
- Konfokalmikroskope: Schaffen Bilder eines sehr dünnen optischen Schnitts.^[11.] (ähnlich dem CT)



Normal:

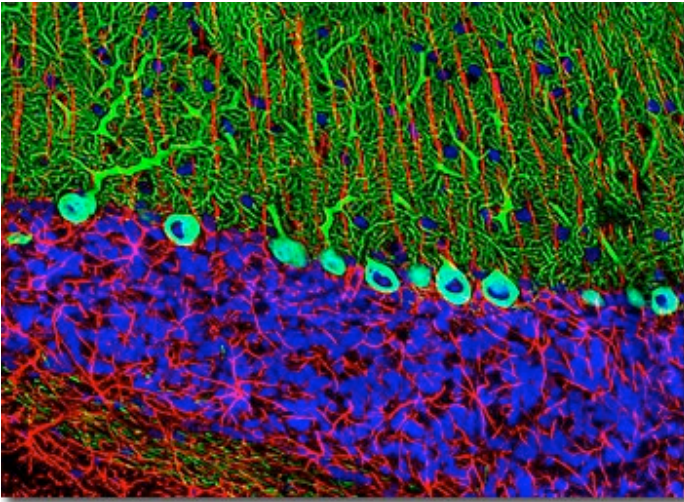


Konfokal:

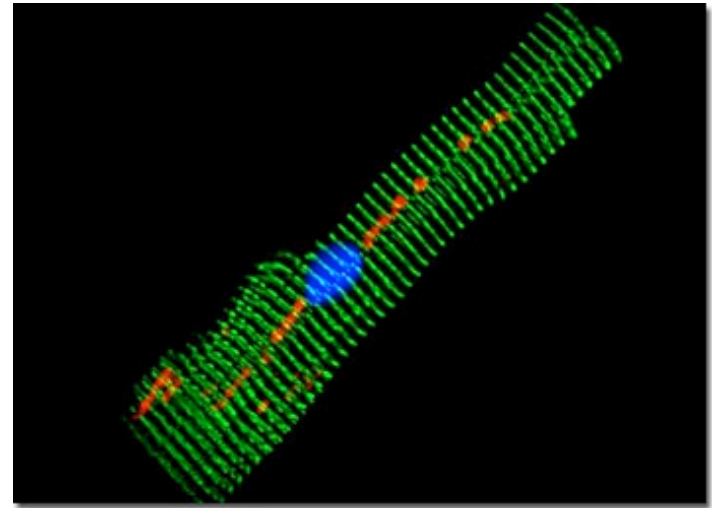


Markierung des Tubulins in mitotischen Zellen mit dem Anti-Tubulin-Antikörper.

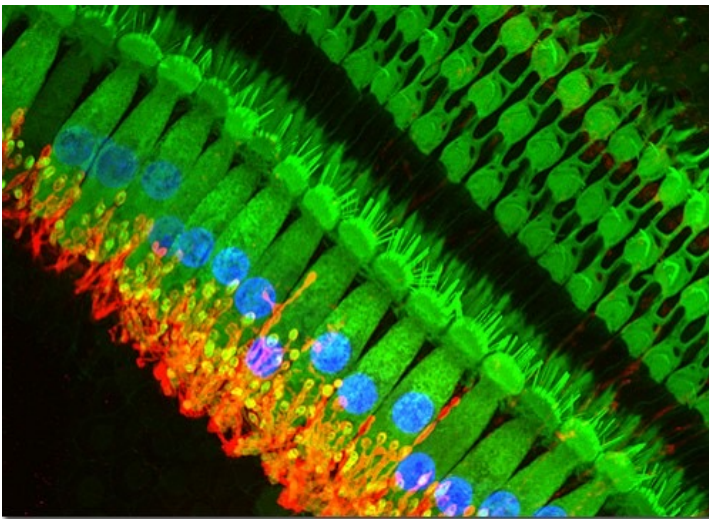
Konfokalmikroskopie



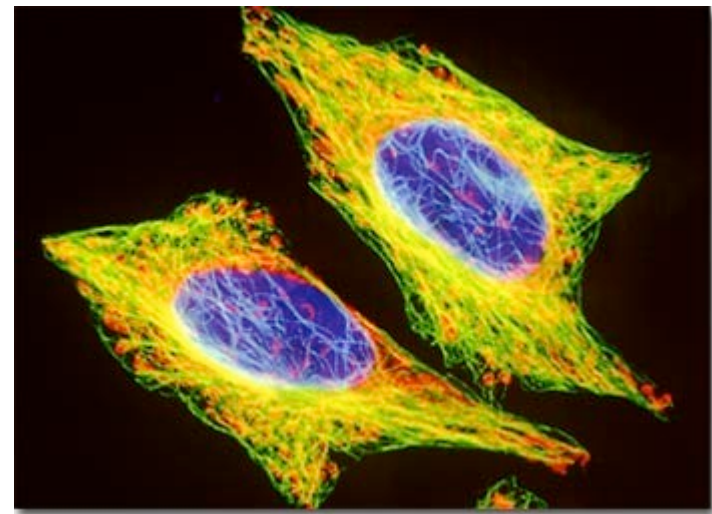
Rattenzerebellum



Herzmuskel



Organ von Corti

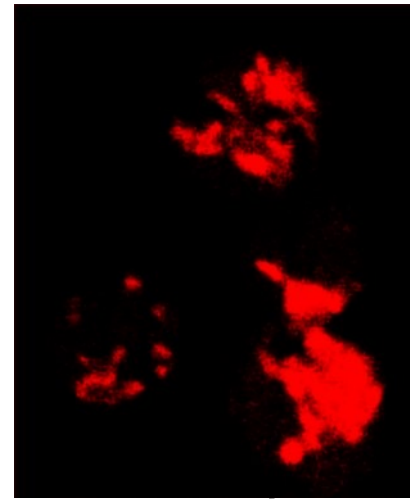
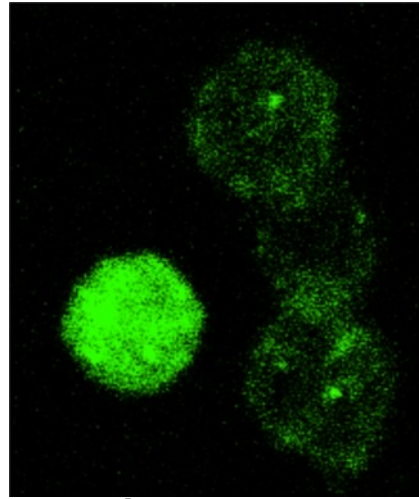
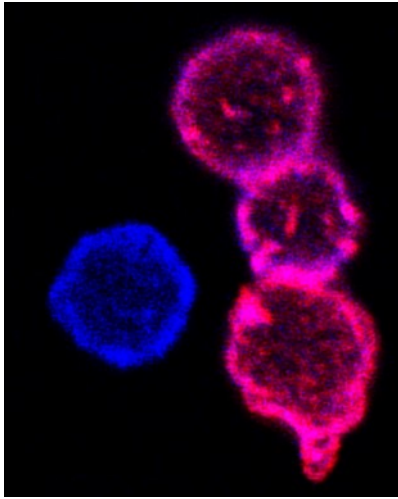


HeLa Zellen

Detektion der Kolo-kal-zi-zation

Grün: Glukokortikoidrezeptor

Rot: Mitochondrion



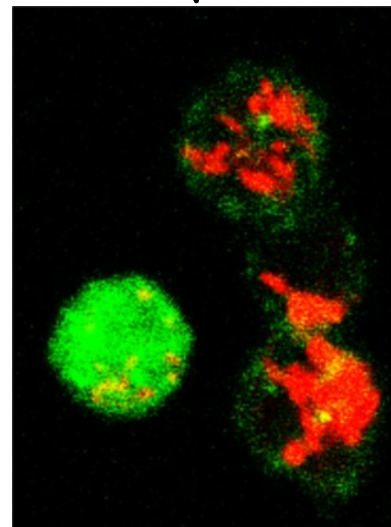
Blau: CD4

Rötlich: CD8

Lila: CD4/CD8 Doppelpositiv



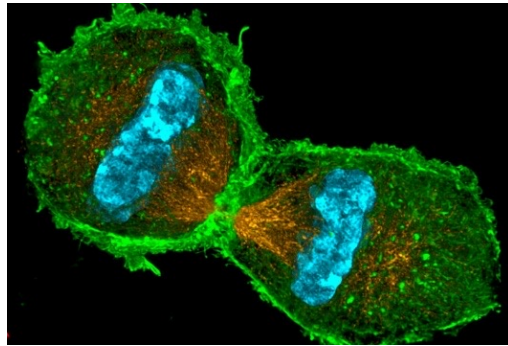
DP (doppelt positiv): Unreife T Zell-Vorläufer exprimieren sowohl CD4 als auch CD8, siehe später.



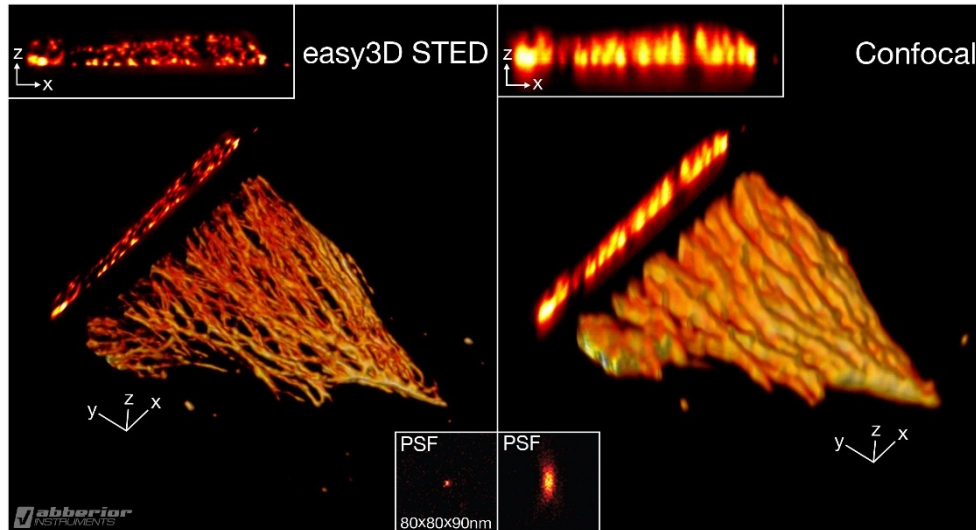
Gelb: GR+mitochondria

Super-resolved (-aufgelöste) Fluoreszenzmikroskopie

Im 20-50 Nanometer Bereich → Proteinkomplexe^[12,13.]



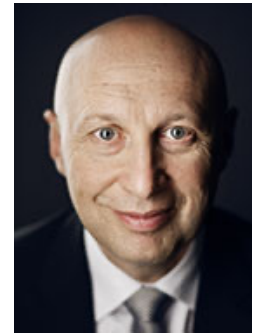
Zwei Mauszellen in der Telophase
Orange: Tubulin
Grün: Aktin
Blau: Chromatin



Vergleich der Auflösung der Konfokal- (rechts) und der Super-resolved-STED-Mikroskopie (links) an Mikrotubuli.



Eric Betzig



Stefan W. Hell

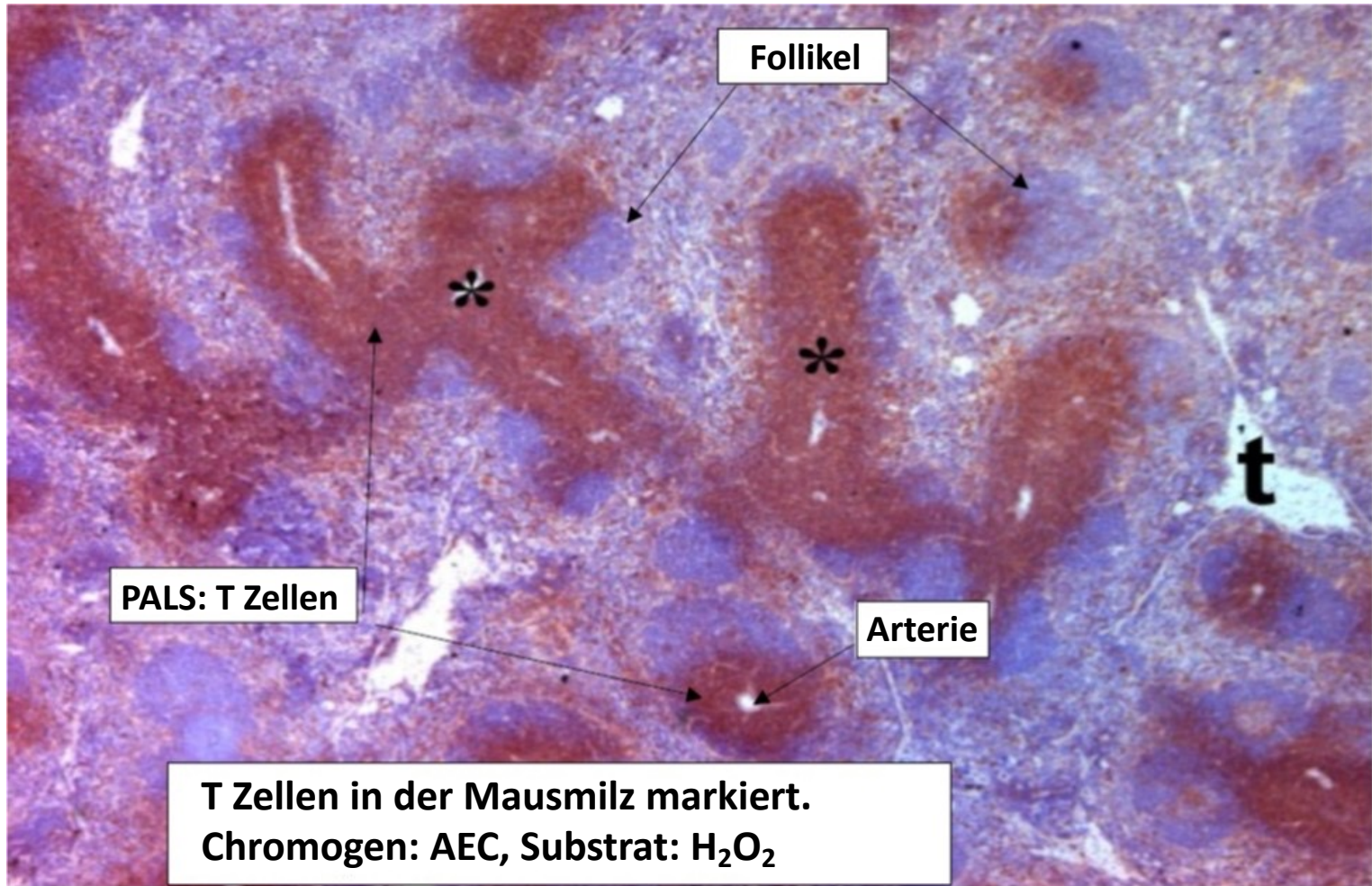


William E. Moerner

Erhielten 2014 den Nobel Preis
für Chemie:

„für die Entwicklung der Super-
Resolved-
Fluoreszenzmikroskopie.“^[14.]

Was Sie in diesem Schnitt sehen sollten:



Gewebsverteilung der Lymphozyten

	Peripheres Blut	Lymphknoten	Milz
Th Zellen	50-60%	50-60%	35-40%
Tc Zellen	20-25%	15-20%	10-15%
B Zellen	10-15%	20-25%	40-45%
NK Zellen	≈10%	Very few	≈10%