



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



5. Praktikum: Immunhistochemie, Fluoreszenzmikroskopie

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2024.

- Das Ziel der Lymphozytenreifung ist die Exprimierung von Antigenrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität und die Herausbildung des **B- und T-Zell-Repertoires** = Anzahl der Antigenerkennungsmoleküle: 10^9 - 10^{11} BcR, 10^{15} - 10^{16} TcR
- Das Immunsystem produziert viele verschiedene Antigenrezeptor-Moleküle im voraus, dann „wählt“ das Antigen den entsprechenden Rezeptor aus. Deshalb ist das Immunsystem auf alle möglichen Antigene vorbereitet.
- Der genetische Hintergrund der B- und T-Zell-Rezeptorproduktion ist **die Umordnung der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene in den Vorläuferzellen**.
- Ablauf der Ig-genumlagerung: 1. H-Kette D-J, 2. H-Kette V-DJ, 3. L-Kette V-J 4. Verknüpfung der H- und L-Kette
- Teilnehmende Enzyme: RAG1/2, TdT
- Allelische- und Isotype Exklusion

- **Allgemeine Eigenschaften der Lymphozytendifferenzierung:** 1. Proliferation; 2. Rezeptor-Genumordnung, Expressierung von funktionellen Antigenrezeptoren auf der Zelloberfläche; 3. Wanderung (Migration); 4. Selektion der potenziellen autoreaktiven Zellen; 5. Apoptose
- **Schritte der lymphozytenreifung:** 1. HSC; 2. Gemeinsame Lymphatische Vorläuferzelle; 3. Progenitor B/T Zelle; 4. Präkursor B/T Zelle; 5. Unreife B/T Zelle; 6. Reife B/T Zelle;
- B Zell Reifung – Rotes Knochenmark; T Zell Reifung - Rotes Knochenmark+Thymus
- Vergleich der B1, B2 und MZ B Zellen
- **Positive Selektion** im Thymus: DP-Zellen, die Selbst-MHC-Moleküle erkennen können, werden überleben → **MHC-RESTRIKTION**
- **Negative Selektion** im Thymus: Apoptose von Zellen mit hoher TcR-Affinität gegen Selbst-Antigene → **TOLERANZ**

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 waschen. (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 für 3x2 Minuten waschen.
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.



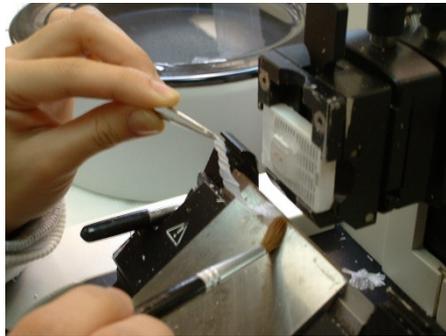
**HANDSCHUHE
TRAGEN!**

Immunhistochemie 1.

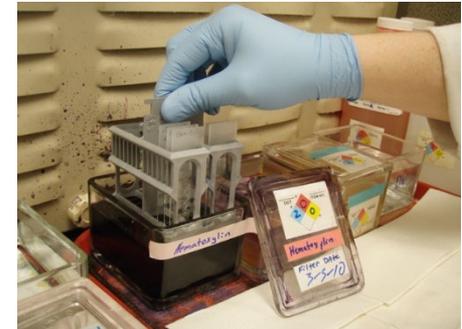
1. Warum „histo“? → **Histologie** (Sie haben solche Gewebsschnitte schon gesehen)



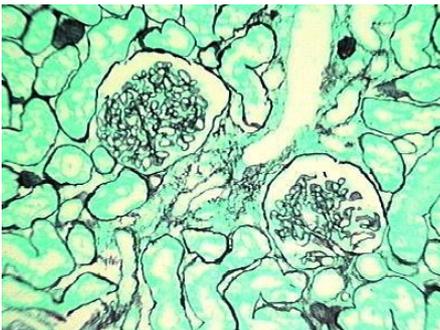
1. Probe gewinnen



2. Gewebsschnitte herstellen



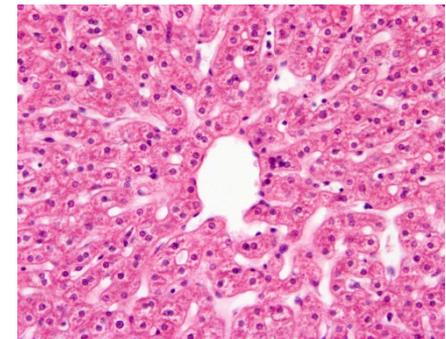
3. Färben der Schnitte



Glomeruli (Gömöri-Silberimprägnation)



4. Untersuchen des Schnitts im Mikroskop



Leber (H&E-Färbung)

Immunhistochemie 2.

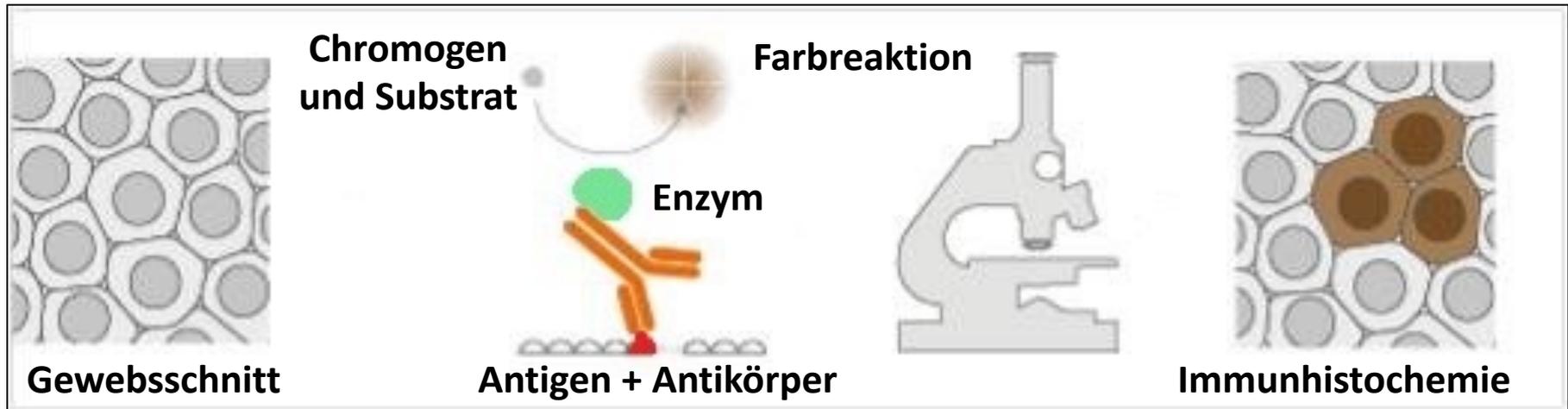
2. Warum „Histochemie“?

- Analysiert die chemische Zusammensetzung des Gewebes.^[1.]
- z.B. im Fall von H&E-Färbung:
 - Hämatoxylin → bindet saure Moleküle („basophil“ z.B. DNA im Zellkern)
 - Eosin → bindet basische Moleküle („eosinophil“ z.B. Proteine im Zytoplasma, Kollagen in der extrazellulären Matrix, usw.)

3. Warum „Immunhistochemie“ (IHC)?

- Sie 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 **an sich 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

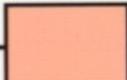
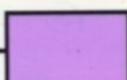
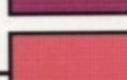


die am häufigsten genutzten Chromogene:

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

- **NBT (Nitroblau-Tetrazolium)**

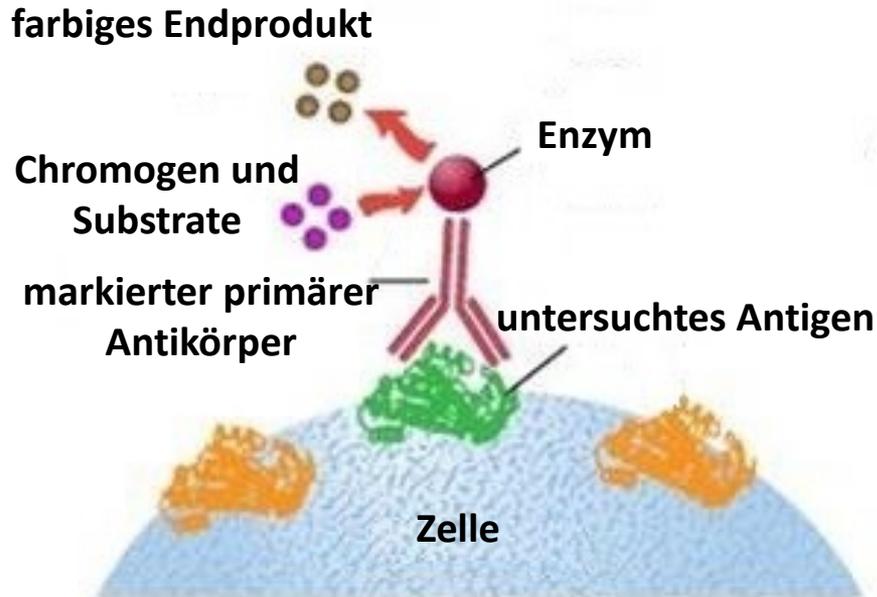
ALP	P-Nitrophenyl-Phosphate (pNPP)		löslich	ELISA
	Nitroblau-Tetrazolium (NBT)		unlöslich	Histochemie, Immunoblotting
	Fast Red		unlöslich	Histochemie, Immunoblotting

Peroxidase	ABTS		löslich	ELISA
	o-Phenilenediamine (OPD)		löslich	ELISA
	Tetramethylbenzidine (TMB)		löslich	ELISA
	o-Dianisidine		löslich	ELISA
	5-Aminosalicylic-Acid (5-ASA)		löslich	ELISA
	Diaminobenzidine (DAB)		unlöslich	Histochemie, Immunoblotting
	3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC)		unlöslich	Histochemie, Immunoblotting
	4-chloro-1-Naphthol (4C1N)		unlöslich	Histochemie, Immunoblotting

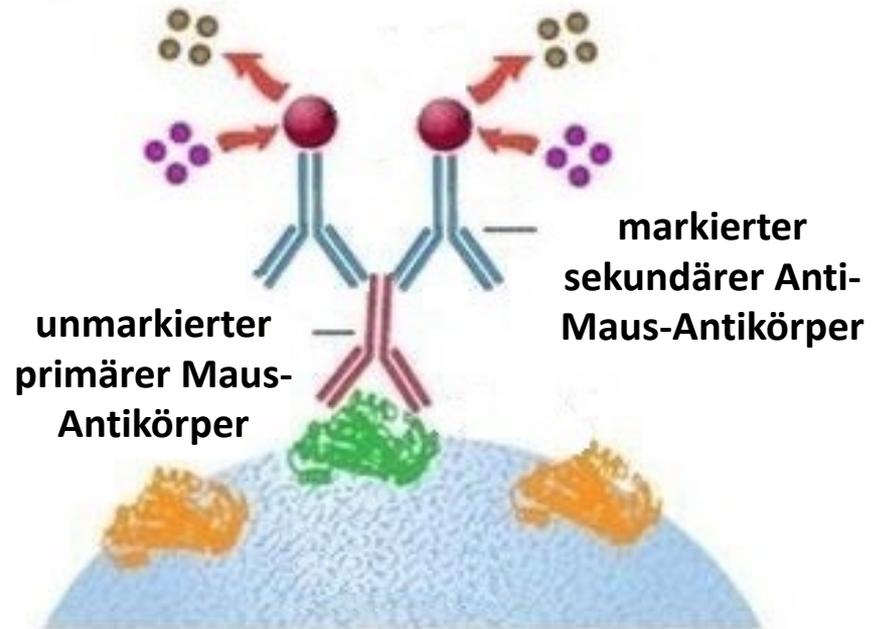
Man muss beachten, ob das **Endprodukt** des Chromogens **löslich** oder **unlöslich** ist :

- Im Fall der Enzym-IHC **muss** das Endprodukt **unlöslich** sein, da es sonst 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



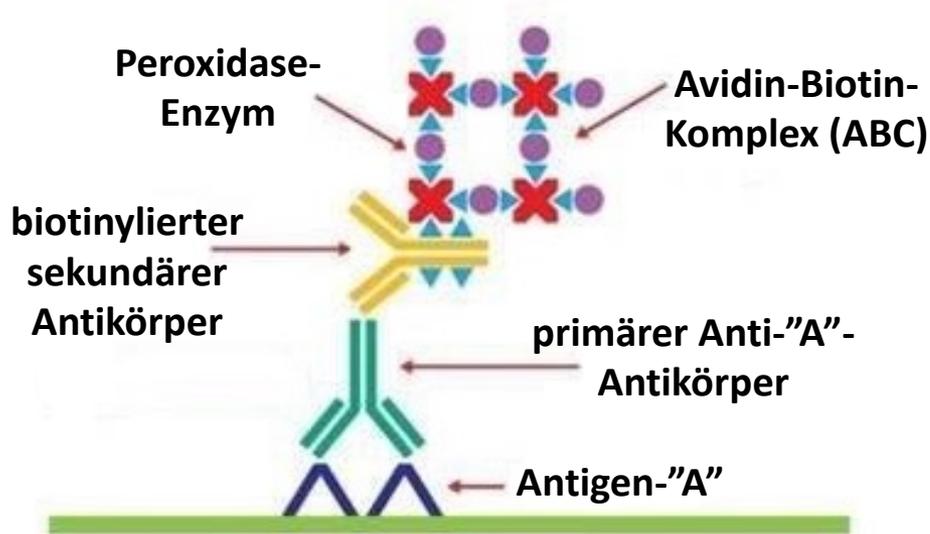
indirekte IHC

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 primärer Antikörper verwendet werden. Markierte Antikörper sind normalerweise teurer.)

Komplexe Detektorsysteme

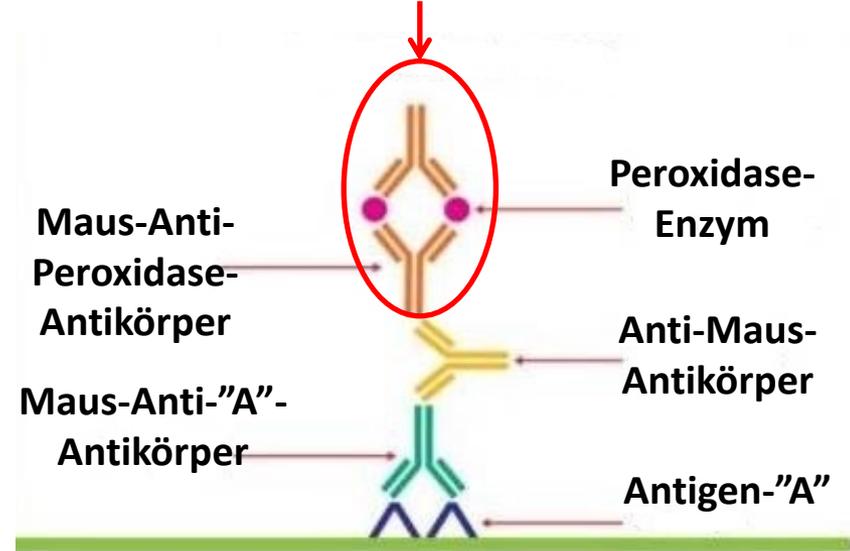
Avidin-Biotin-Komplex (ABC)



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)

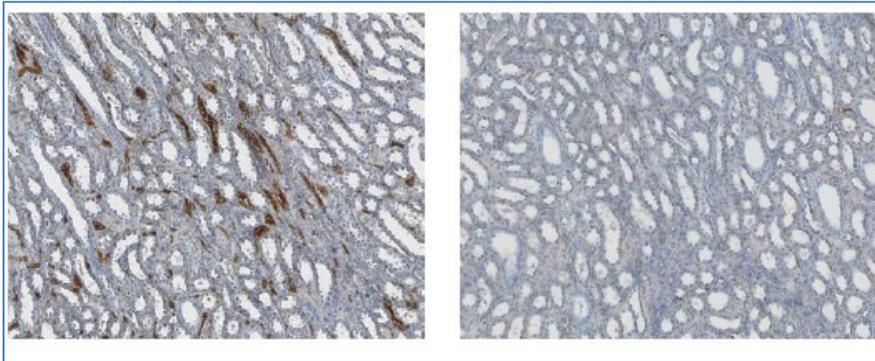


Tiere werden mit Peroxidase immunisiert und dann werden Anti-Peroxidase-Antikörper aus dem Tierserum isoliert. Sowohl Peroxidase als auch Anti-Peroxidase-Antikörper werden hinzugefügt und sie bilden Komplexe (PAP) ^[4.]

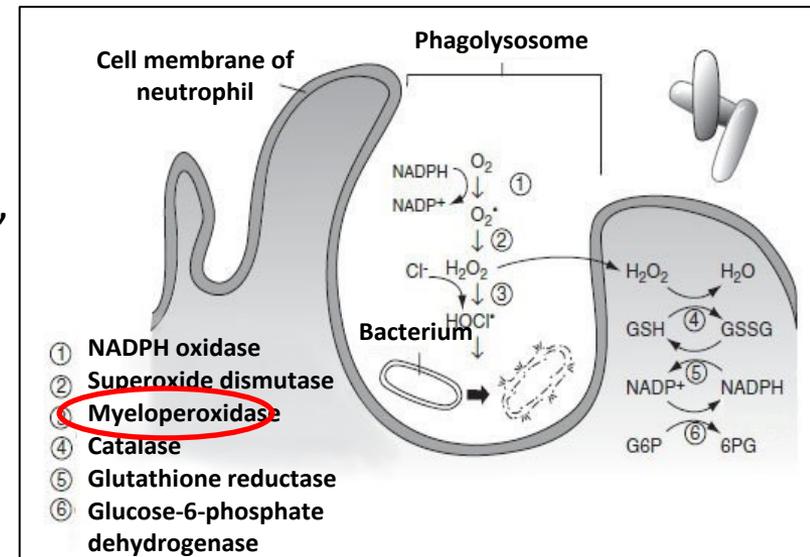
Vorteil: **Signalverstärkung**

Hemmung der endogenen Peroxidase

- Warum ist es notwendig?
 - Einige Zellarten enthalten Peroxidase. erinnern Sie sich daran? → 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

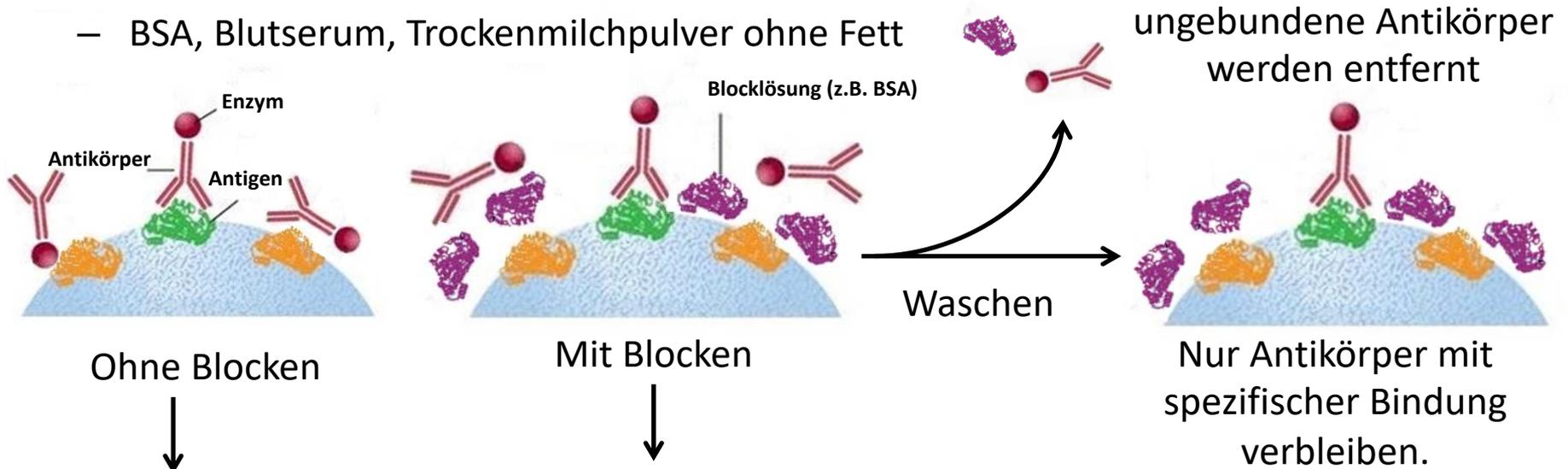


Haupt-Inhibitoren: [6.]

- Phenylhydrazin
- Wasserstoffperoxid
- Azide

Blocken

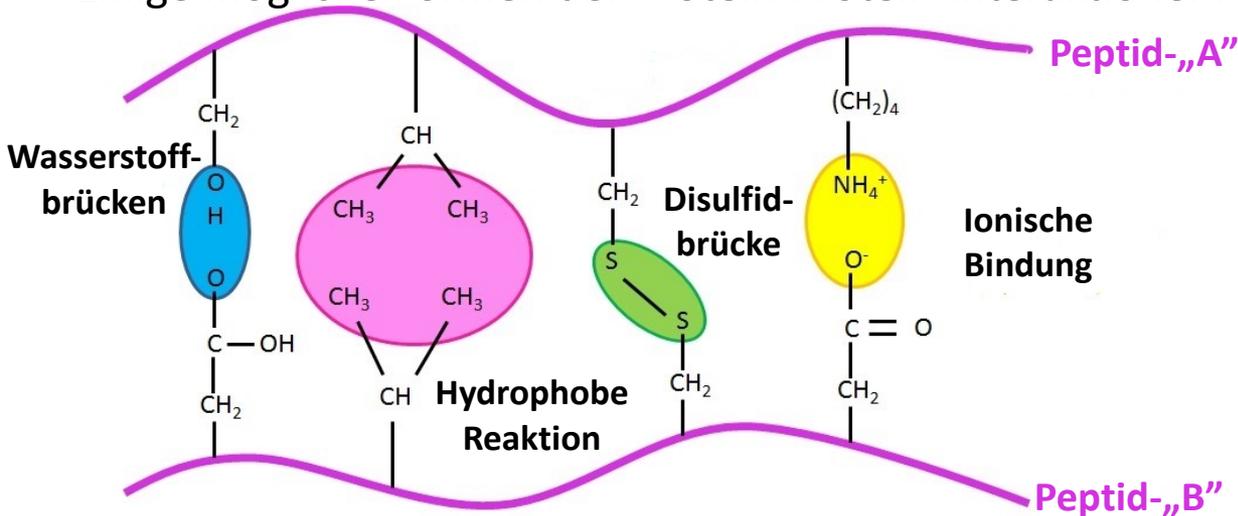
- Warum ist es notwendig?
 - Obwohl die Antigen-Antikörper-Reaktion spezifisch ist, können **nicht-spezifische Protein-Protein-Interaktionen** zwischen Antikörpern und Proteinen in Geweben stattfinden. (siehe nächste Folie) → **nicht-spezifischer Hintergrund**
- Unspezifische Bindungsstellen sollten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



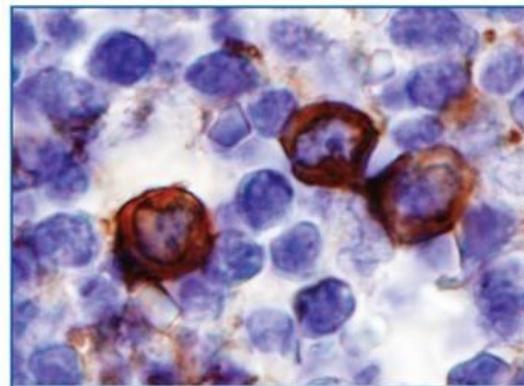
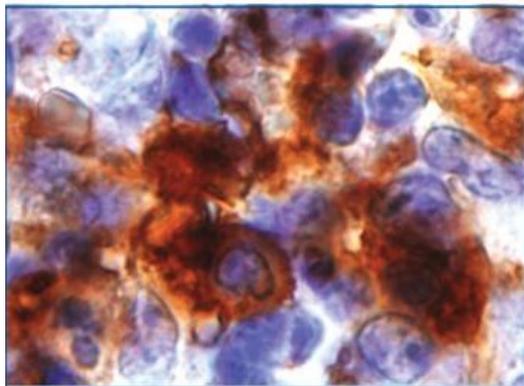
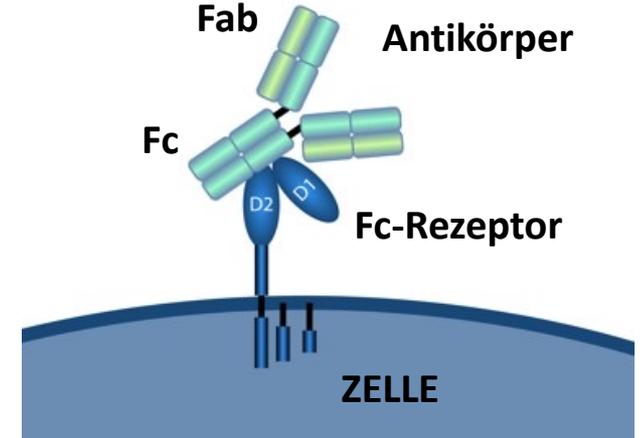
unspezifische Bindung Das blockierende Protein bindet kompetitiv (gegen die Antikörper) die unspezifischen Bindungsstellen.

Nicht-antigenspezifische Protein-Protein-Interaktionen

Einige mögliche Formen der Protein-Protein-Interaktionen:



Problem ausschließlich bei Antikörpern:

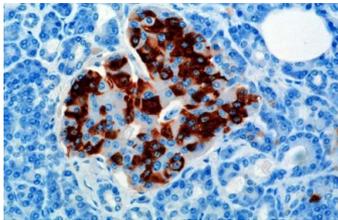


Fc-Rezeptoren können durch unmarkierte Antikörper blockiert werden.

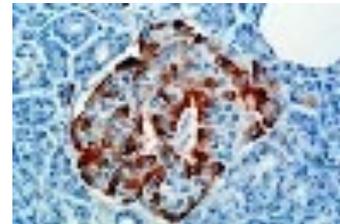
Detektion von CD14 (LPS-Rezeptor) in einer menschlichen Tonsille ohne (links) oder mit Blocken. (rechts)

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.:

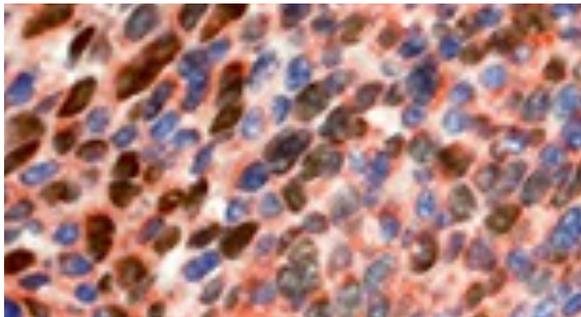


1. Schnitt : Anti-Insulin



2. Schnitt: Anti-Glukagon

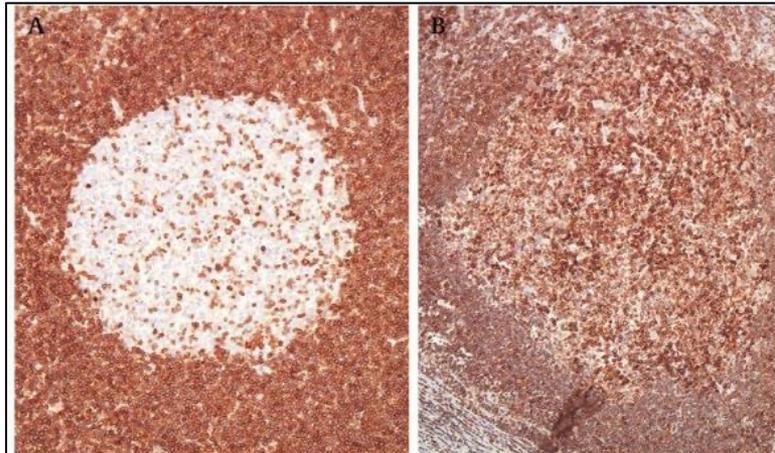
- Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung der Doppelfärbung. → Man fügt 2 Antikörpertypen, die jeweils **mit einem anderen Enzym konjugiert** sind und in einer **anderen Farbreaktion** resultieren, die unterschieden werden kann.



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

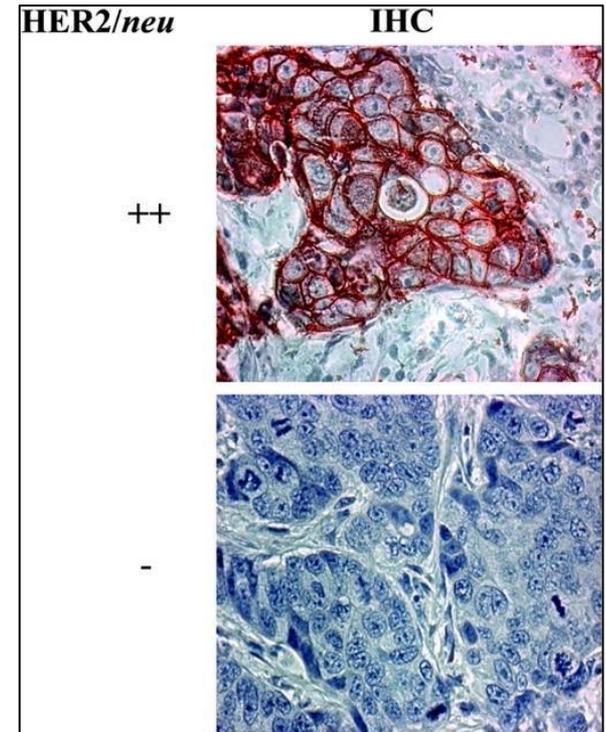
Klinische Bedeutung der IHC

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



Detektion des antiapoptotischen Bcl-2 in einem normalen Follikel (links) und in einem folliculären Lymphom. (rechts)

Erkennung von HER2 im Mamma-CA.



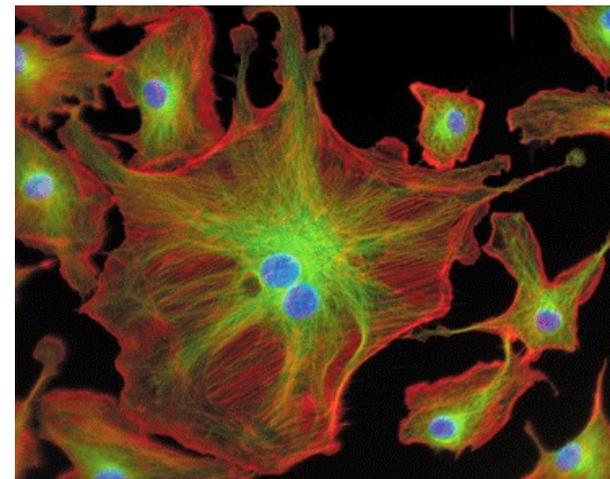
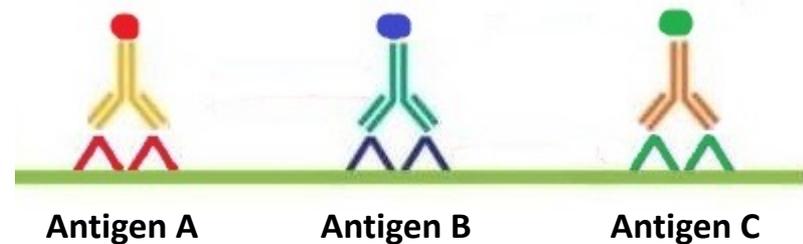
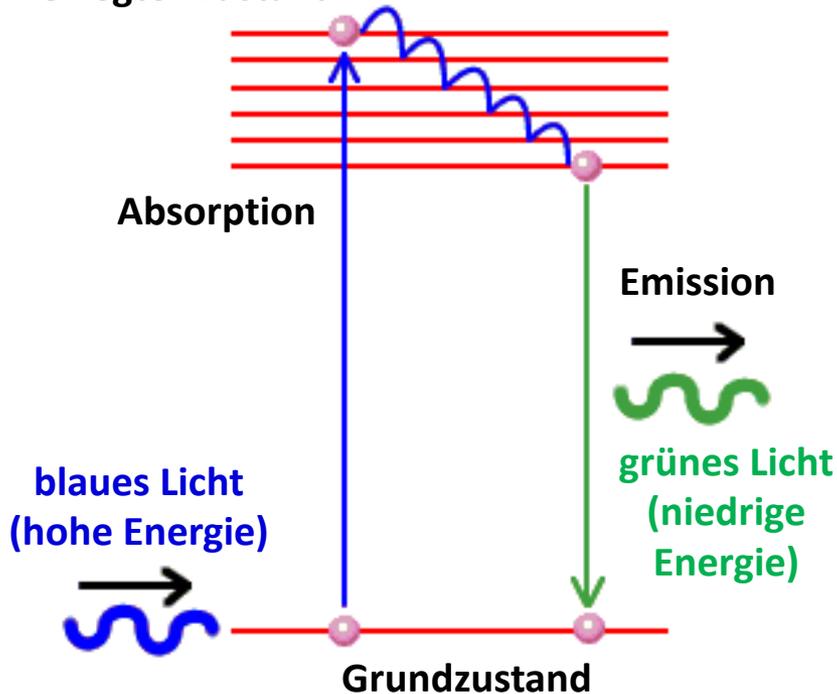
Die Tumorzellen des oberen Patienten haben eine starke HER2-Exprimierung, wodurch der Patient mit Herceptin behandelt werden kann.^[8.] Die Zellen des unteren Patienten sind HER2-negativ.

Immunfluoreszenz-Färbung

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

rotes Fluorochrom blaues Fluorochrom grünes Fluorochrom

erregter Zustand

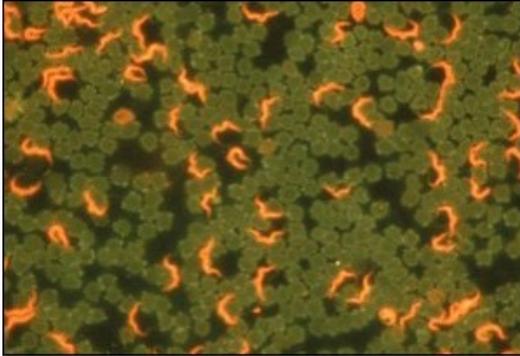


grün: Tubulin
rot: Aktin
blau: Zellkern

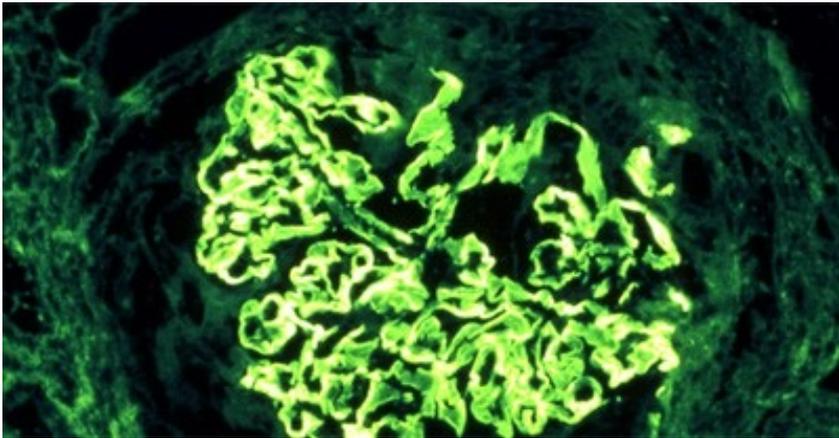
grundlegendes Prinzip der Fluoreszenz

fluoreszenzmikroskopisches Bild von
Endothelzellen

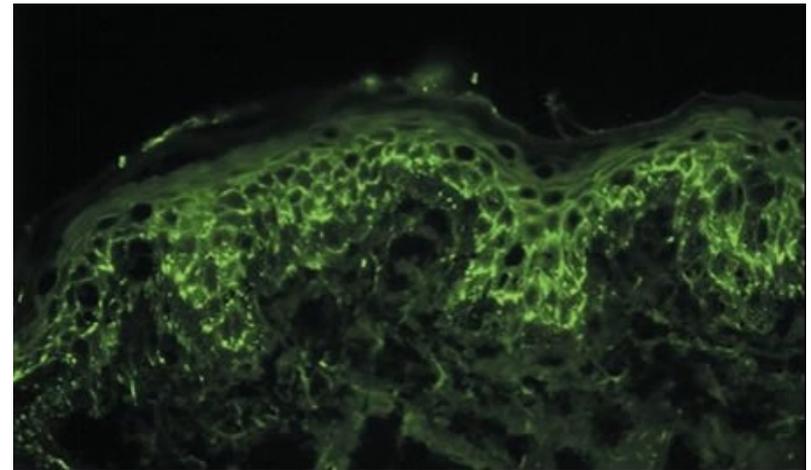
Klinische Bedeutung der Fluoreszenz- mikroskopie



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



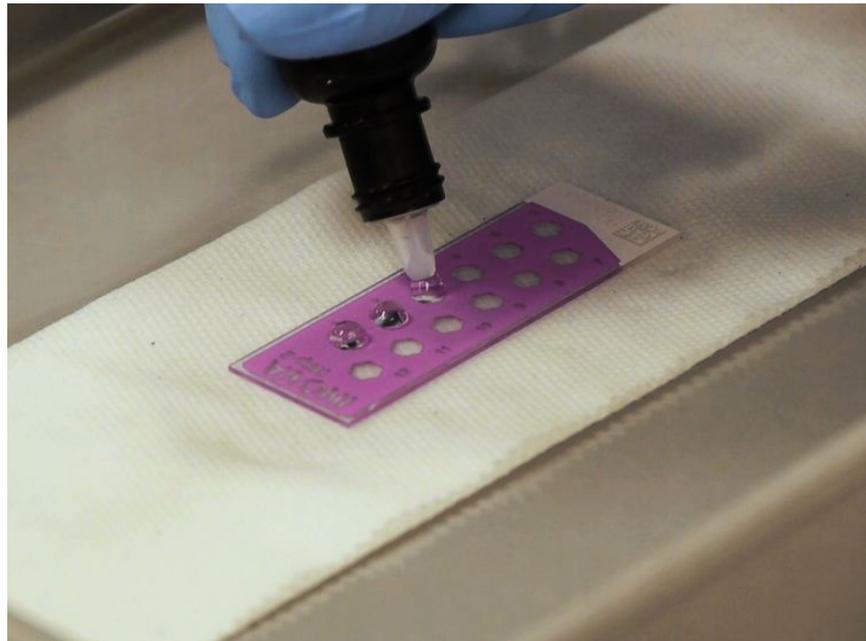
Lineare Ablagerung von IgG entlang der glomerulären Basalmembran eines Patienten mit Goodpasture-Syndrom. (siehe später)



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

IMMUNFLUORESZENZ

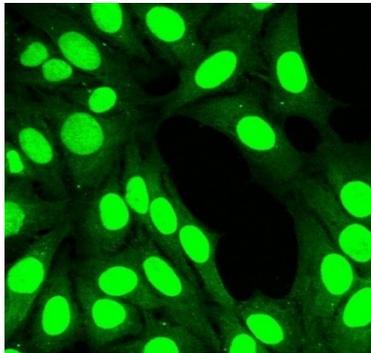
„ Der Goldstandard“



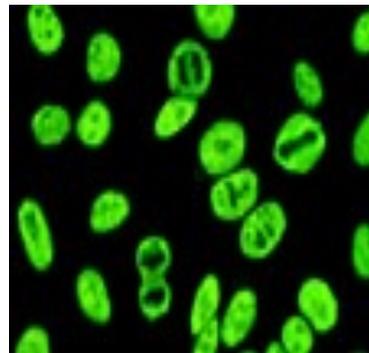
ANA-Screening – Bestimmung antinukleärer Antikörper – IIF

Ein zusammenfassender Name für mehrere verschiedene Autoantikörper.

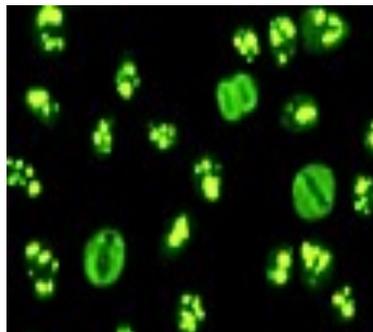
Screening-Test, der am häufigsten angeordnete Test.



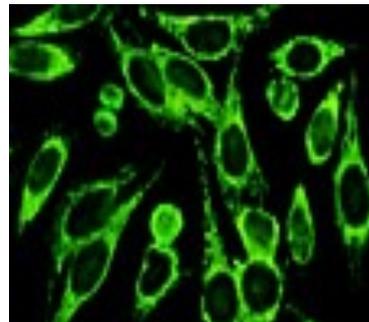
Anti-dsDNA +



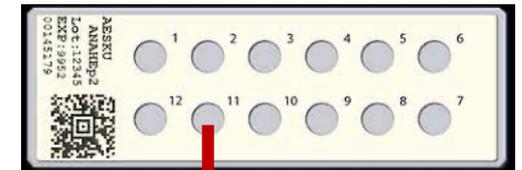
Anti-PMScl+



Anti-SSA/SSB+ ?



AMA-M2 +



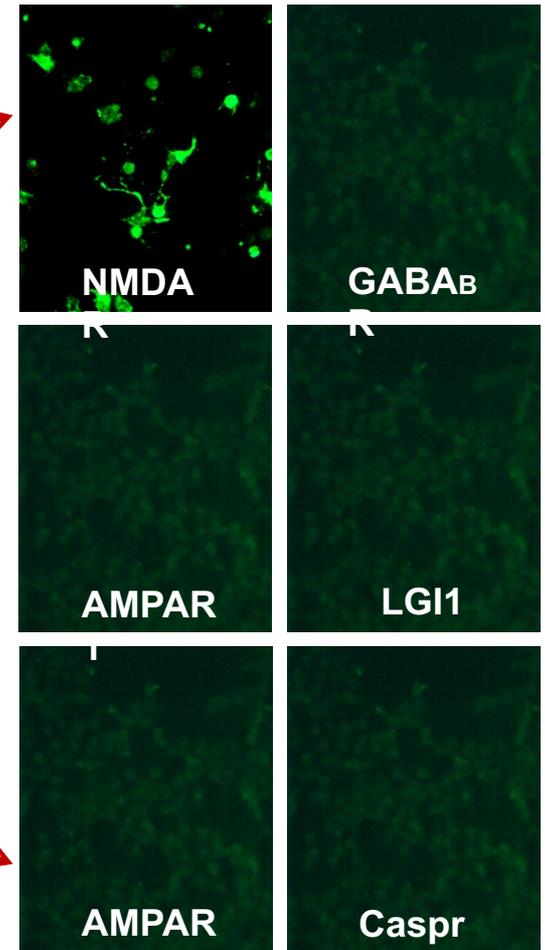
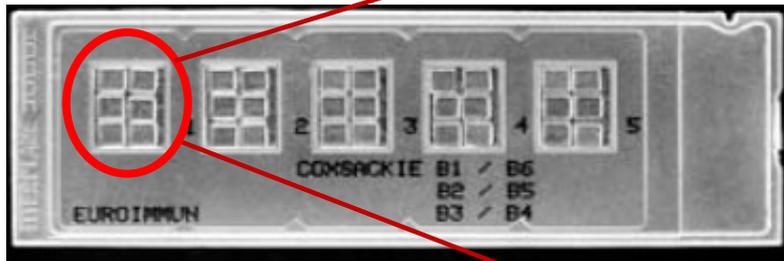
Hep-2-Zelle

1. Serum-Autoantikörper

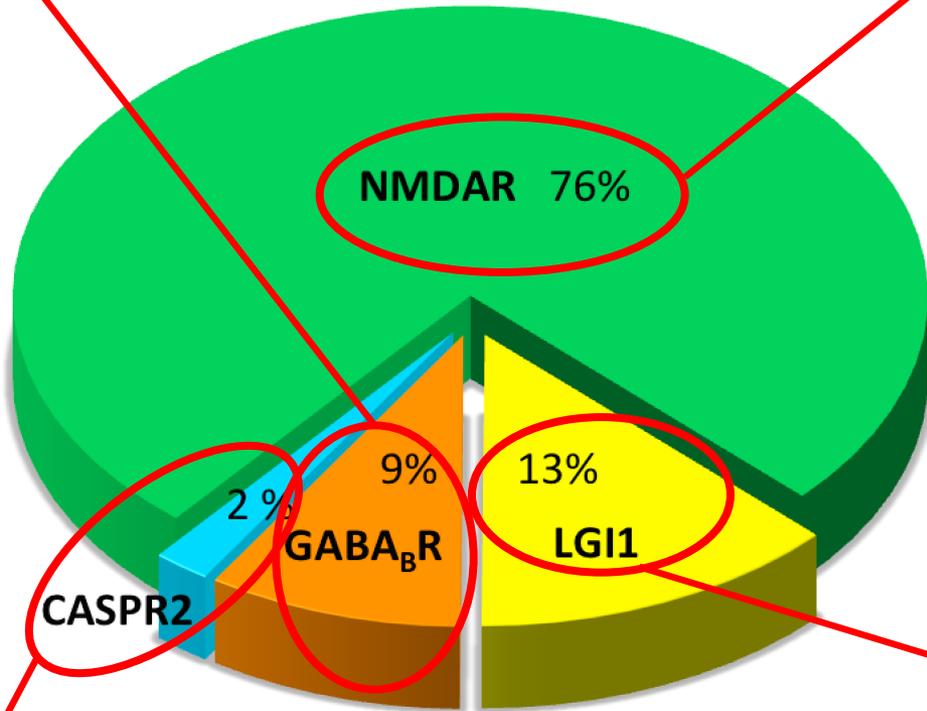
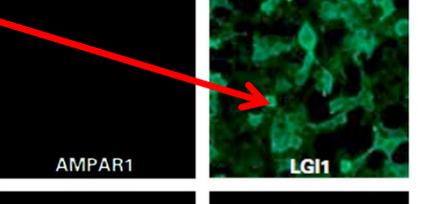
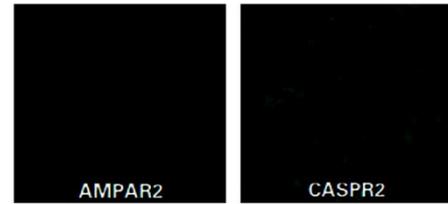
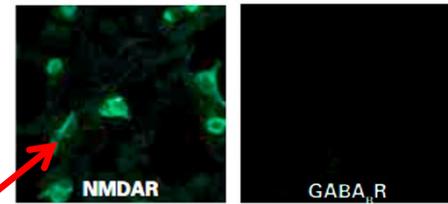
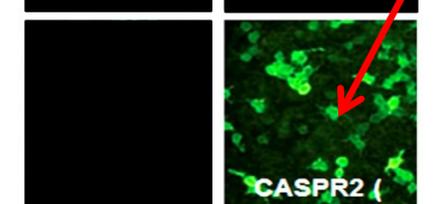
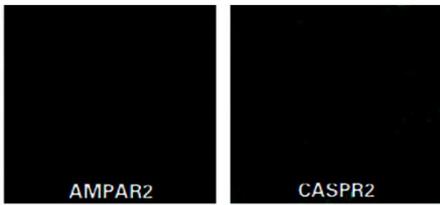
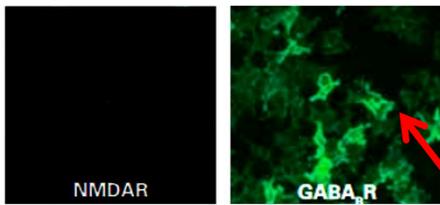
2. Anti-Human-IgG-FITC

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 in großer Menge exprimieren.

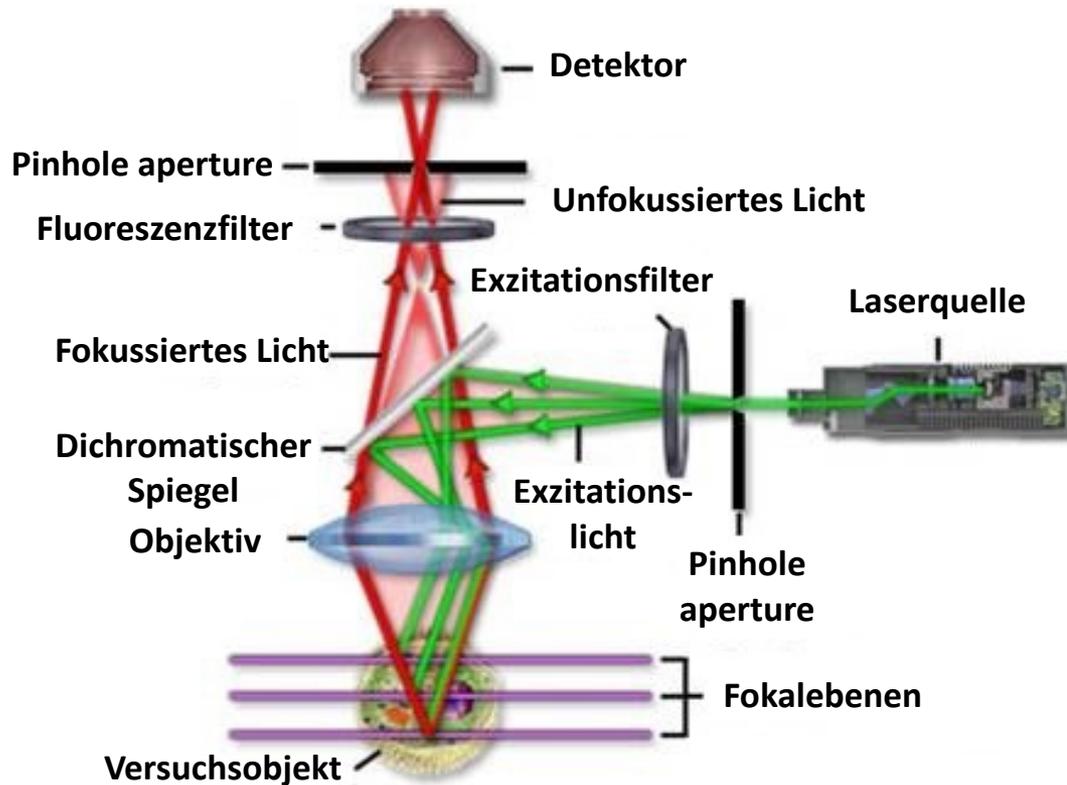


Anzahl der Untersuchungsanfragen (30.06.2011-08.08.2017.)	836	
Anzahl der untersuchten Patienten	717	100%
Anzahl positiver Fälle	54	7,53%

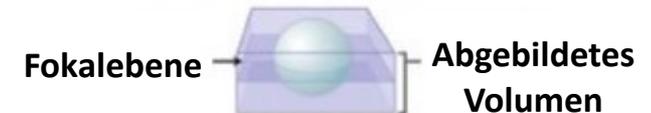
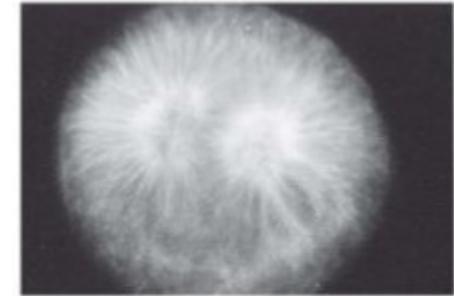
Gegen die anderen Rezeptoren wurden keine positiven Proben gefunden.

Konfokalmikroskopie

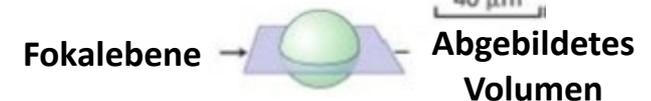
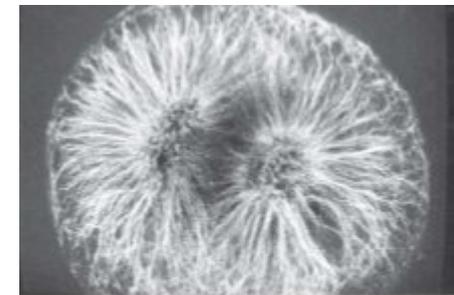
- Normale Mikroskope: Bieten ein summiertes Bild des gesamten Volumens des Schnitts (ähnlich dem klassischen Röntgen)
- Konfokalmikroskope: Schaffen Bilder eines sehr dünnen optischen Schnitts.^[11.] (ähnlich dem CT)



Normal:

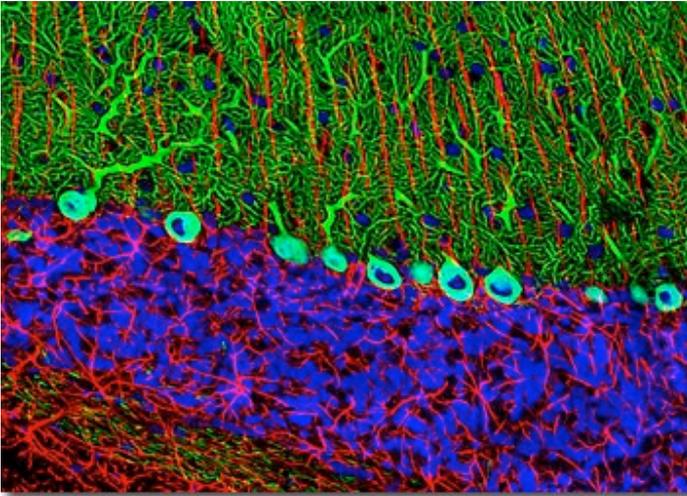


Konfokal:

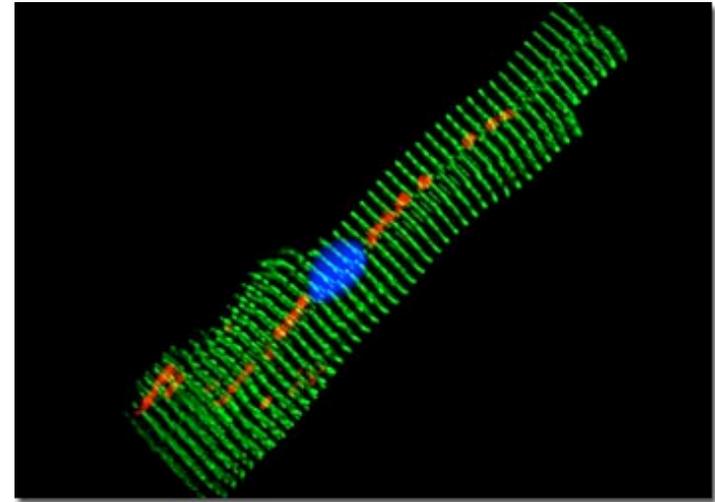


Markierung des Tubulins in mitotischen Zellen mit dem Anti-Tubulin-Antikörper.

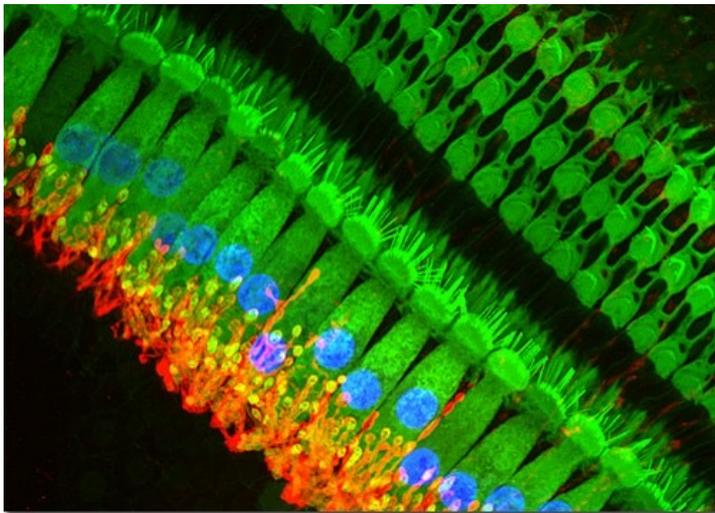
Konfokalmikroskopie



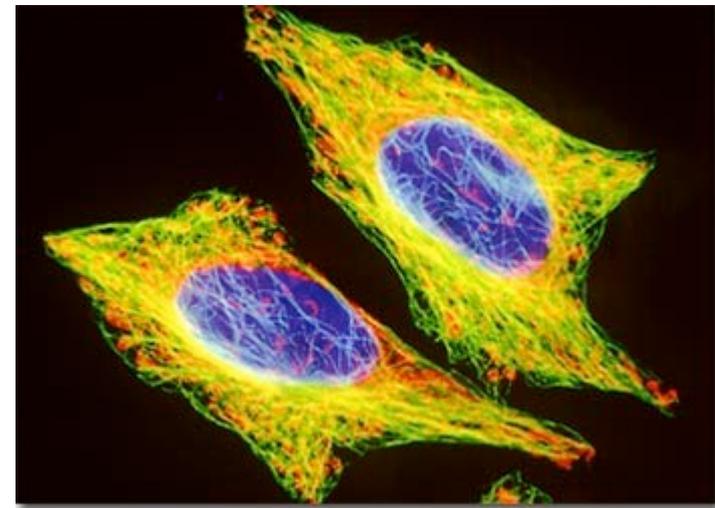
Rattenzerebellum



Herzmuskel



Organ von Corti

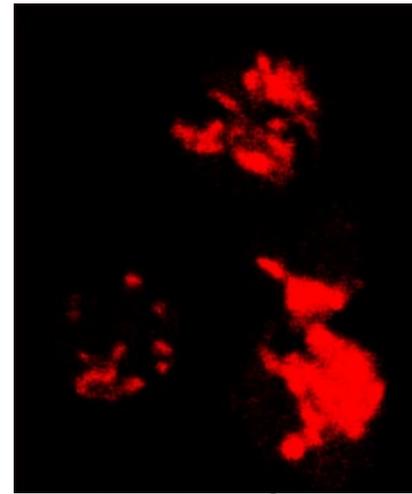
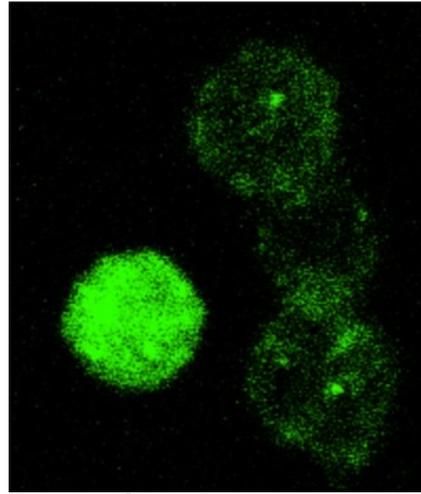
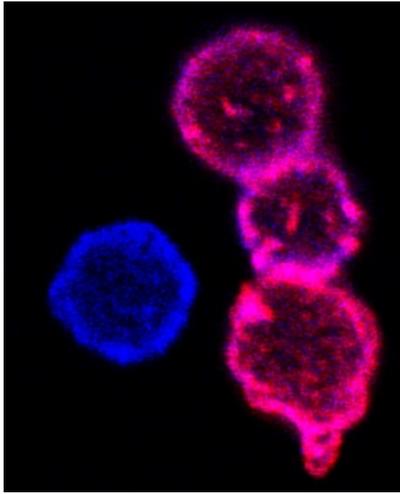


HeLa-Zellen

Detektion der Kolo-kal-zi-zation

grün: Glukokortikoidrezeptor

rot: Mitochondrien



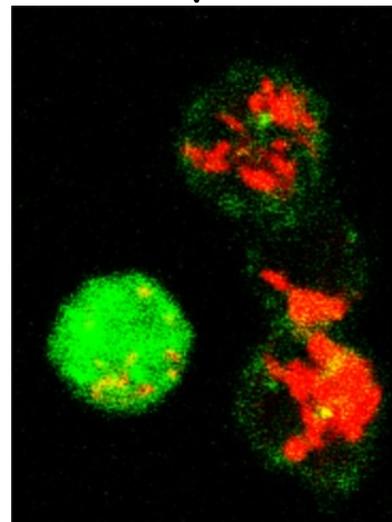
blau: CD4

rötlich: CD8

lila: CD4/CD8-doppelpositiv



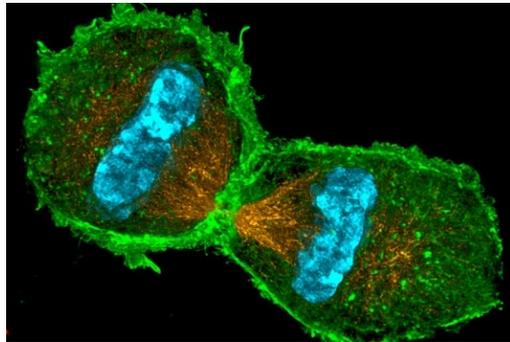
DP (doppelpositiv): Unreife T-Zell-Vorläufer exprimieren sowohl CD4 als auch CD8, siehe später.



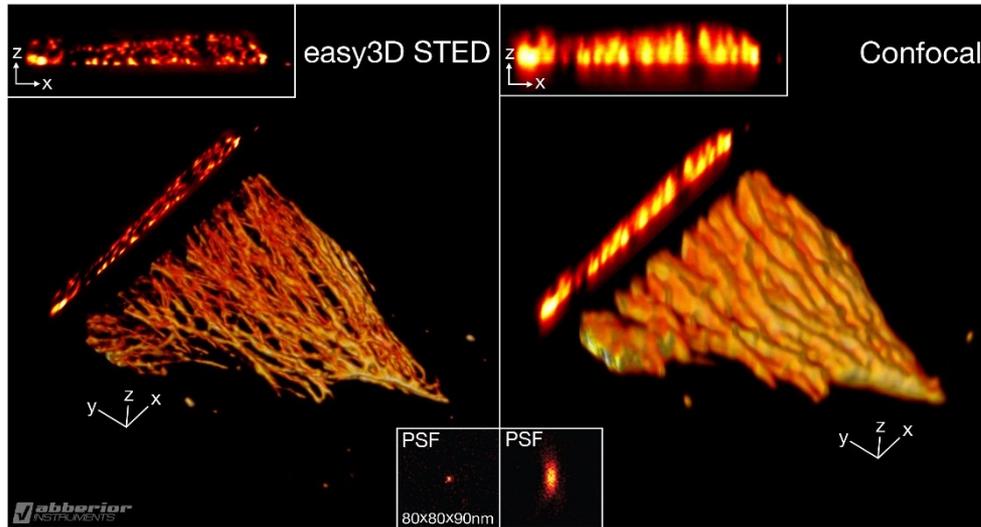
gelb: GR+Mitochondrium

Super-resolved (-aufgelöste) Fluoreszenzmikroskopie

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



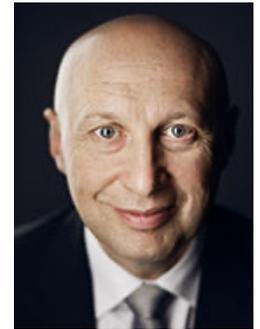
Zwei Mauszellen in der Telophase
orange: Tubulin
grün: Aktin
blau: Chromatin



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



Eric Betzig



Stefan W. Hell

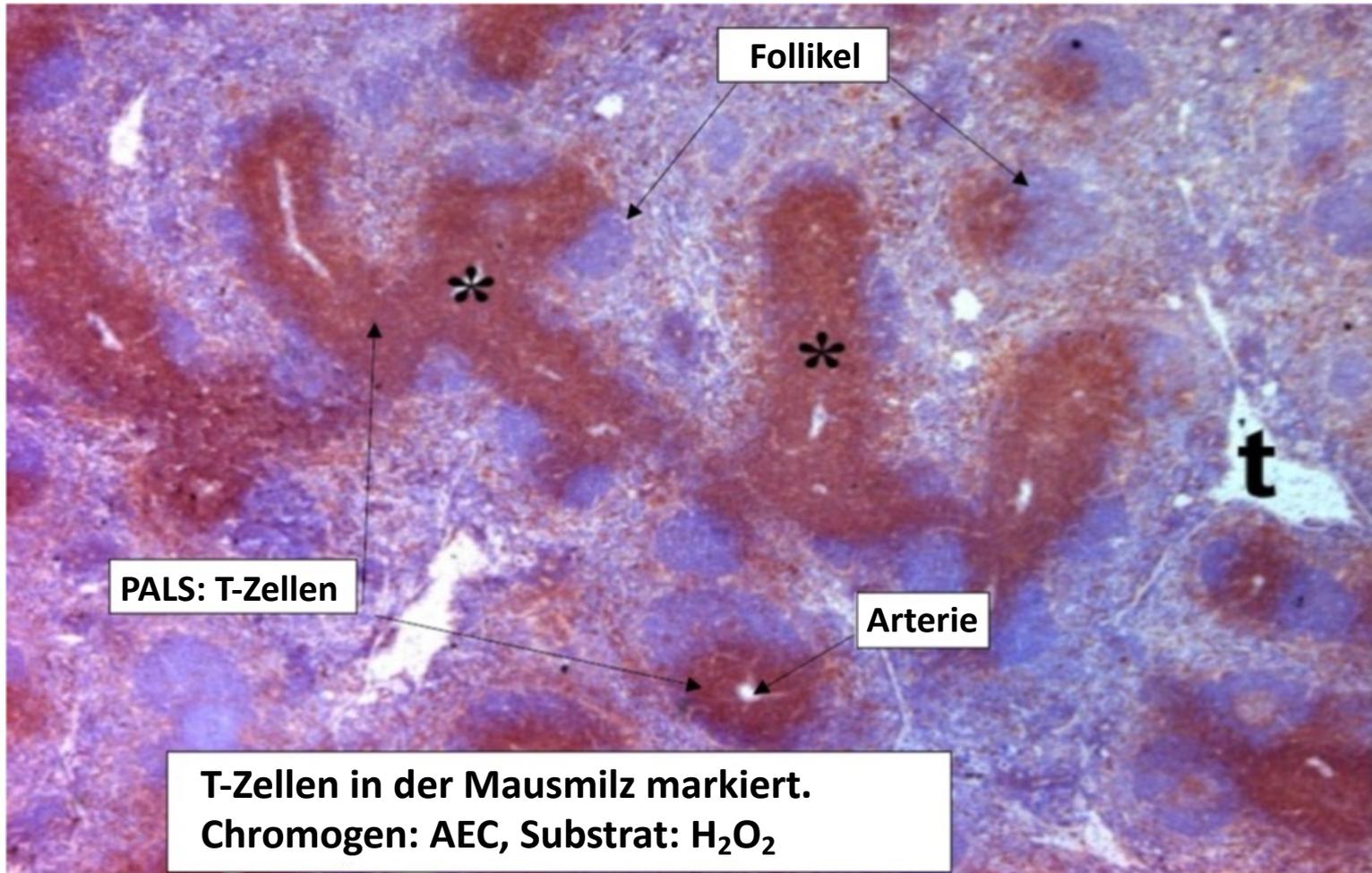


William E. Moerner

Erhielten 2014 den Nobelpreis
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%	sehr wenig	≈10%