



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



4. gyakorlat: Immunhisztokémia, fluoreszcens mikroszkópia

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Pécs

Direkt immunhisztokémia gyakorlat

Gyakorlat menete:

1. Egér lép izolálása, szövet metszése tárgylemezre, fixálása acetonban. (megtörtént)
2. Endogén **peroxidáz enzim gátlása** PBS-ben oldott fenilhidrazinnal (**MÉRGEZŐ**) 10 percig.
3. Mosás PBS-sel 2x2 percig. (PBS: Phosphate buffered saline, izotóniás sóoldat)
4. **Nem-specifikus protein-kötőhelyek blokkolása** 5% BSA-PBS oldattal 10 percig. (BSA: bovine serum albumin = marha albumin)
5. Az **antigén** (egér Thy-1, T-sejt marker) **jelölése** HRP-konjugált anti-egér Thy-1 **monoklonális antitesttel** 30 percig.
6. Mosás PBS-sel 3x2 percig.
7. **Előhívás kromogén oldattal** (AEC: amino-etilkarbazol, **MÉRGEZŐ**) és hidrogén-peroxiddal (szubsztrát), 0,1 M Na-acetát pufferben. (pH 5.2)
8. Kész metszetek megtekintése a mikroszkópban.



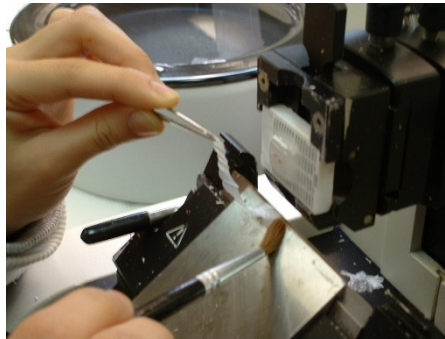
HÚZZATOK KESZTYŰT!

Immunhisztokémia 1.

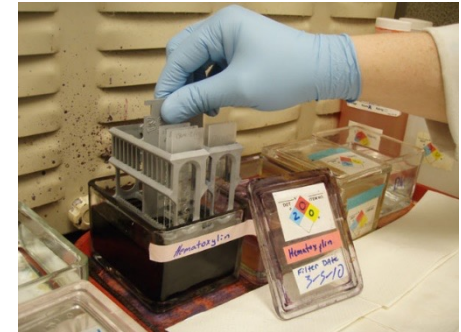
1. Mitől „hiszto”? → hisztológia = **szövettan** (ilyet már sokat láttatok)



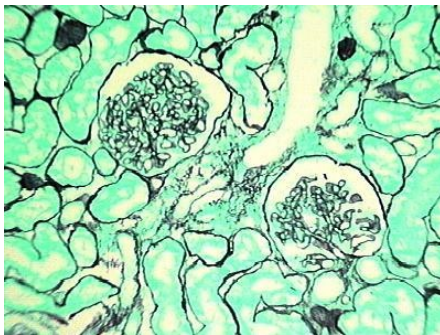
1. Szövetteni
mintavétel



2. Szövet
metszése



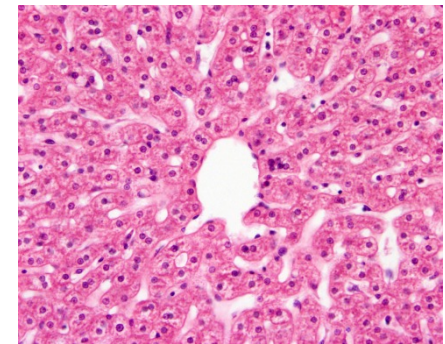
3. Szövet
festése



Glomerulusok (Gömöri-
féle ezüstözés)



4. Vizsgálat fénymikroszkóppal



Máj (H&E festés)

Immunhisztokémia 2.

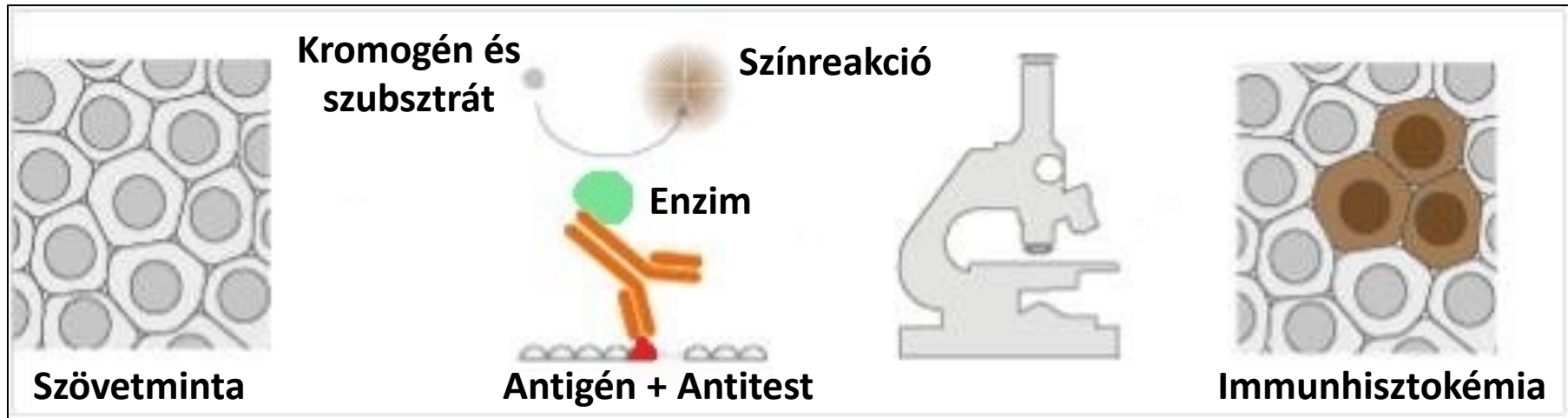
2. Mitől „hisztokémia”?

- A szövet kémiai összetételét próbáljuk jellemezni.^[1.]
- Pl. H&E festésnél:
 - hematoxylin → savas kémhatású anyagok („basophil” pl. DNS a sejtmagban)
 - eosin → lúgos kémhatású anyagok („eosinophil” pl. fehérjék a cytoplasmában, kollagén az extracelluláris mátrixban, stb.)

3. Mitől „immunhisztokémia” (IHC)?

- **Antitest-antigén reakción** alapul.
- Cél: Valamilyen **antigén** kimutatása **specifikus antitest** segítségével a szövetben. (a sejtfelszínen, a sejt belsejében, vagy az extracelluláris térben)
- Az antigén-antitest reakció **színtelen**, láthatóvá a használt antitesthez kötött **jelölő molekulákkal** tehető. (lásd előző gyakorlaton)
- Enzim immunhisztokémia esetében a jelölő molekula egy **enzim**, ami a hozzáadott szubsztrát és **kromogén** hatására utóbbiból valamilyen oldhatatlan **színes végterméket** hoz létre, ami fénymikroszkópban látható.
- Fluoreszcens IHC esetén a jelölőmolekula egy fluorokróm. (lásd később)

Enzim immunhisztokémia



Leggyakrabban használt enzimek:

1. **HRP** (Horseradish peroxidase):
Torma peroxidáz

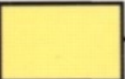


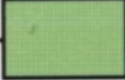
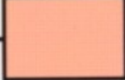
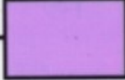





2. **ALP** (alkaline phosphatase):
Alkalikus foszfatáz

Fontosabb kromogénjeik:

- **DAB** (diaminobenzidin)
- **AEC** (amino-etilkarbazol)

- **NBT** (nitro blue tetrazolium)



Alkalikus foszfátáz				
p-nitrofenil-foszfát (pNPP)		oldható	ELISA	
Nitro blue tetrazolium (NBT)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
Fast Red		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
Peroxidáz				
ABTS		oldható	ELISA	
o-feniléndiamin (OPD)		oldható	ELISA	
tetrametilbenzidin (TMB)		oldható	ELISA	
o-dianizidin		oldható	ELISA	
5-aminoszalicilsav (5-ASA)		oldható	ELISA	
diaminobenzidin (DAB)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
3-amino-9-etilkarbazol (AEC)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
4-kloro-1-naftol (4C1N)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	

A kromogéneknel fontos szempont, hogy oldható-e a **végtermékük**:

- Enzim **IHC** esetében követelmény, hogy a végtermék **oldhatatlan** legyen, hiszen így nem diffundál el a reakció helyétől, és ott látjuk a mikroszkópban a jelet, ahová az enzim-jelölt antitest kötődött.
- ELISA** esetén (lásd később) épp fordítva, **oldható** végterméket adó kromogének használatosak.

Direkt vagy indirekt?

Színes végtermék

Kromogén és szubsztrát

Jelölt elsődleges antitest

Enzim

Vizsgált antigén

SEJT

Direkt IHC



Jelöletlen elsődleges egér antitest

Jelölt másodlagos anti-egér antitest

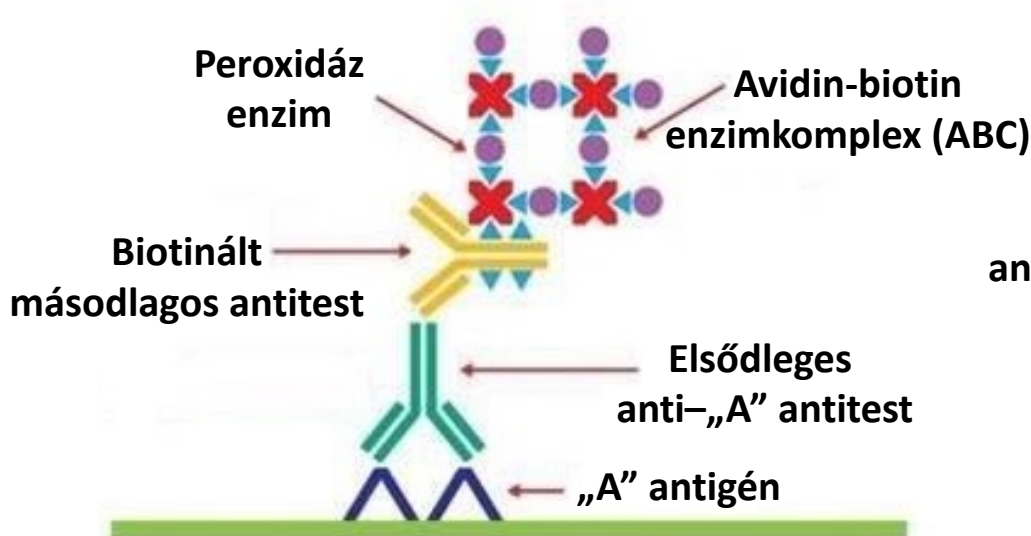
Indirekt IHC

Enzim IHC esetében az **indirekt módszer** terjedt el, mert bár időigényesebb, mint a direkt, de vannak előnyei:^[2.]

- **Erősebb a jel.** (Ez különösen akkor fontos, ha a vizsgált antigén csak kis mennyiségben van jelen a szövetben.)
- Hosszú távon **olcsóbb.** (Ugyanaz a másodlagos antitest több elsődleges antitesthez is használható, így egyetlen jelölt ellenanyag elég a különböző antigének kimutatásához. A jelölt antitestek rendszerint drágábbak.)

Komplex előhívó rendszerek

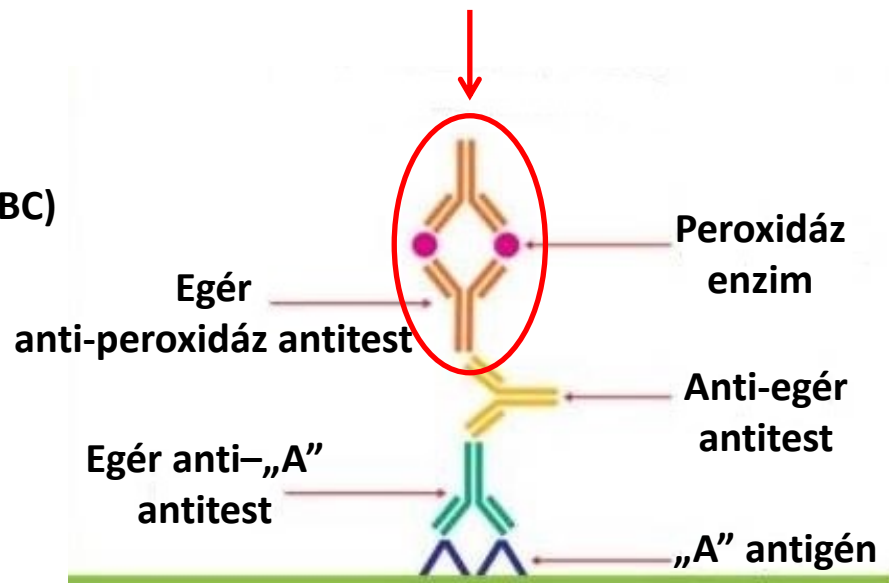
Avidin-biotin komplexek (ABC)



A biotin-avidin kötődés a legerősebb ismert nem-kovalens kölcsönhatás fehérje és ligandja között. A biotinált másodlagos antitesthez biotinhoz kötött enzimet és avidint vagy streptavidint adnak. Az avidin hídként szolgálva nagy enzimkomplexeket hoz létre.^[3.]

Értelme: **További jelerősítés**

PAP (peroxidáz anti-peroxidáz komplex)

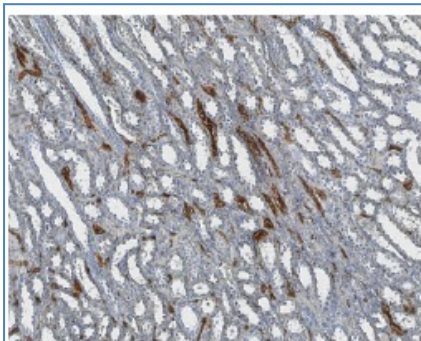


Peroxidázzal immunizált állat szérumából nyert anti-peroxidáz antitesthez peroxidázt adnak. Az antitestek ezzel komplexet képeznek (PAP), az enzim azonban megtartja enzimatisz aktivitását.^[4.]

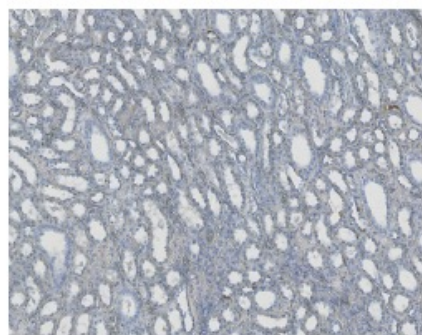
Értelme: **További jelerősítés**

Endogén peroxidáz gátlása

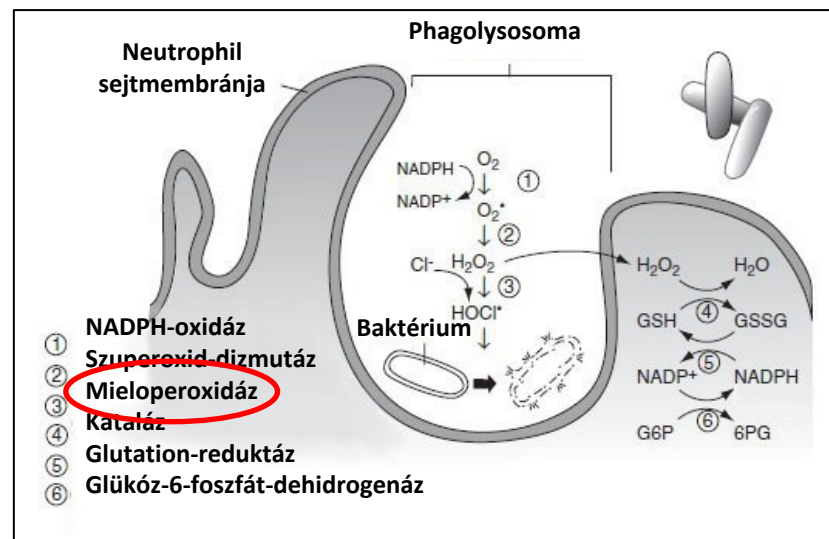
- Miért kell?
 - Peroxidáz sokféle sejtben található. Emlékeztek? → pl. **oxidatív burst** a mieloid fehérvérsejtekben (pl. neutrophil, monocyta/macrophag → 2. gyakorlat)
 - Az enzimeik ugyanúgy átalakítják a szubsztrátot. → nem csak a vizsgált marker látszana → **nem-specifikus háttérjel**
- Gátolni kell az endogén peroxidázt, **mielőtt** a szövethöz hozzáadnánk a jelölt antitestet.^[5.]



Endogén peroxidáz aktivitás vesében



Gátlás után nincs aspecifikus jel



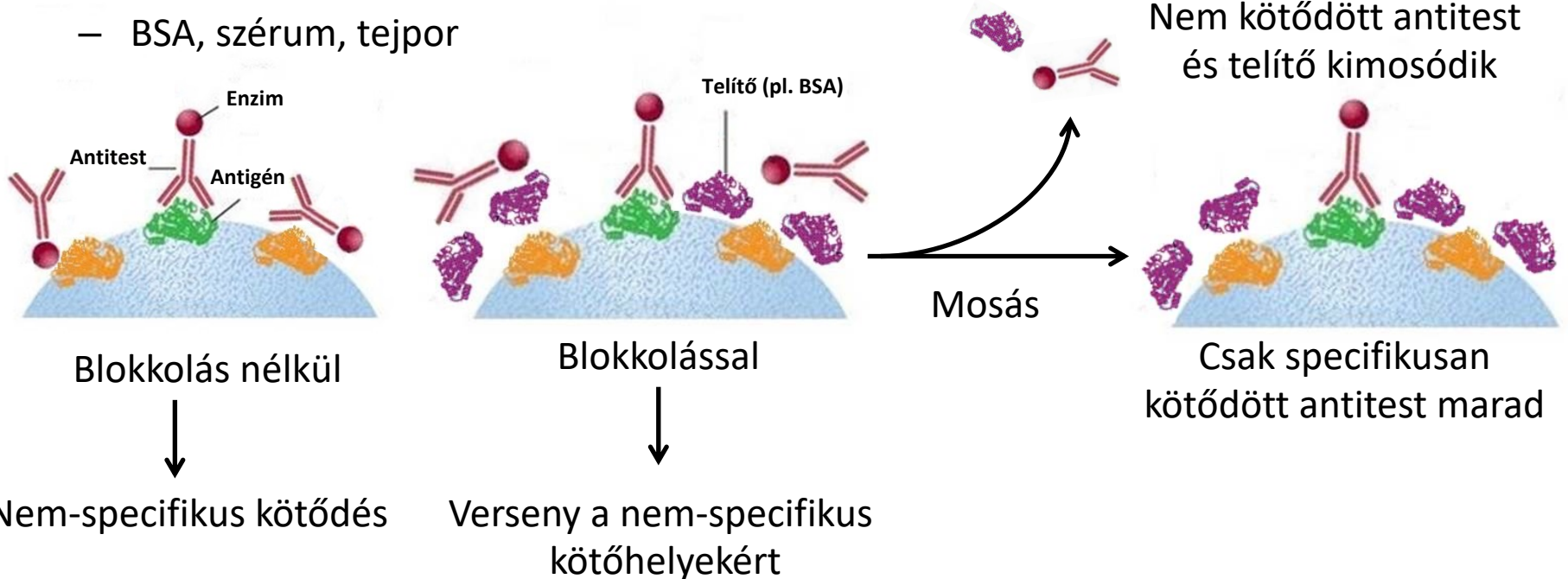
Főbb gátlószerek:^[6.]

- Fenilhidrazin
- Hidrogén-peroxid
- Azid

Telítés (blokkolás)

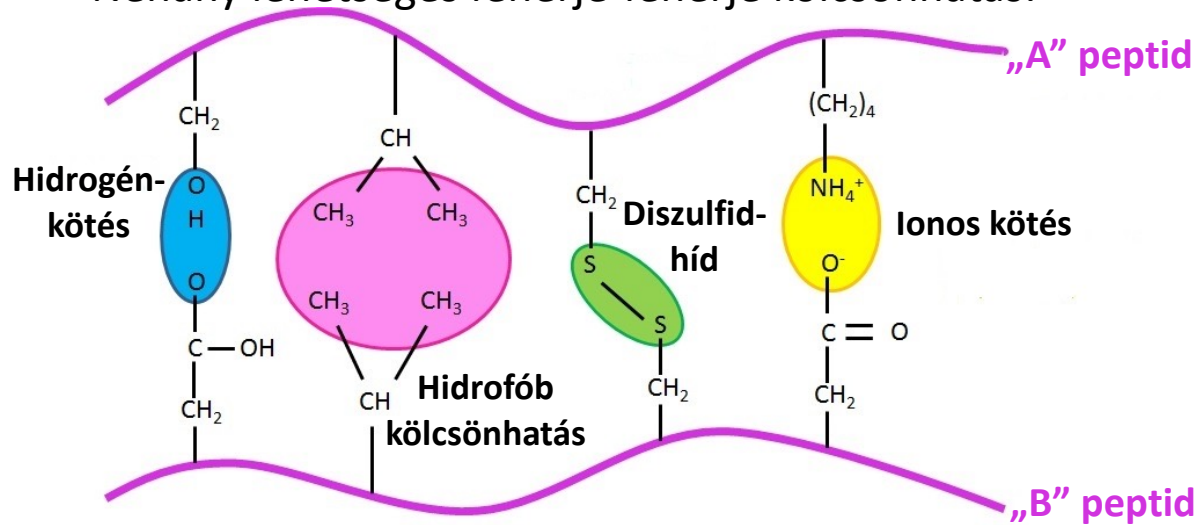
- Miért kell?
 - Ugyan az antigén és az antitest között specifikus reakció jön létre, azonban létrejöhetnek **nem-specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatások** a szövetben található fehérjék és az antitestek között (lásd következő dia) → **nem-specifikus háttérjel**
- A nem-specifikus kötőhelyeket blokkolni kell, **mielőtt** hozzáadjuk az antitestet. Erre a vizsgált szövetből és a használt antitesttől függően különböző fehérje oldatokat használnak, pl.:^[7.]

- BSA, szérum, tejpor

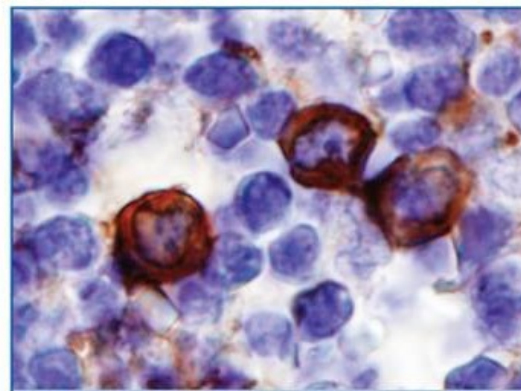
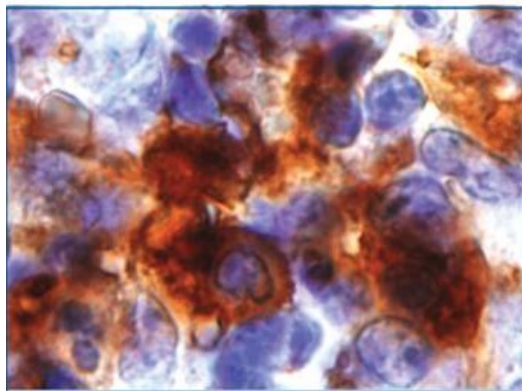
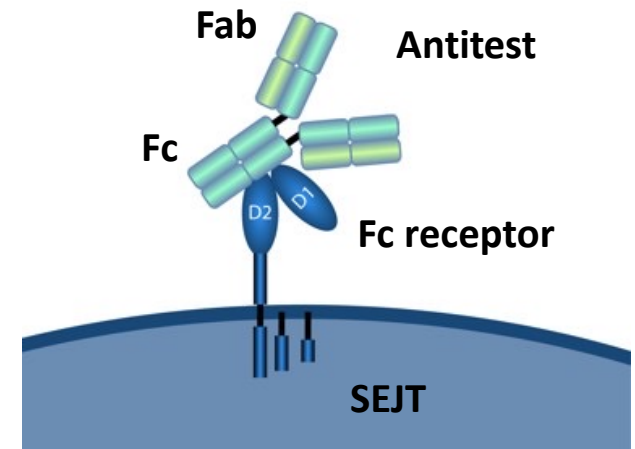


Nem antigén-specifikus antitest-fehérje kölcsönhatások

Néhány lehetséges fehérje-fehérje kölcsönhatás:



Speciálisan az antitesteket érintő probléma:

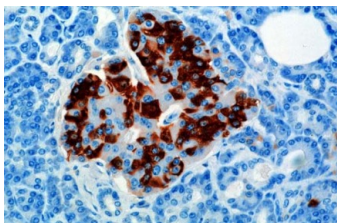


Az Fc receptorokat jelöletlen immunglobulinnal lehet blokkolni.

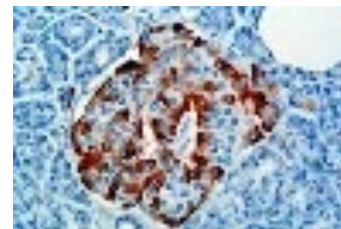
CD14 (LPS receptor) kimutatása humán mandulában telítés nélkül (bal) és telítéssel. (jobb)

Kettős jelölés

- Hagyományos enzim IHC esetében egyetlen metszetben csak egy antigén mutatható ki, több antigén vizsgálatához ugyanabból a szövetből több metszetet kell készíteni és külön-külön jelölni az egyes markerekre. Pl.:

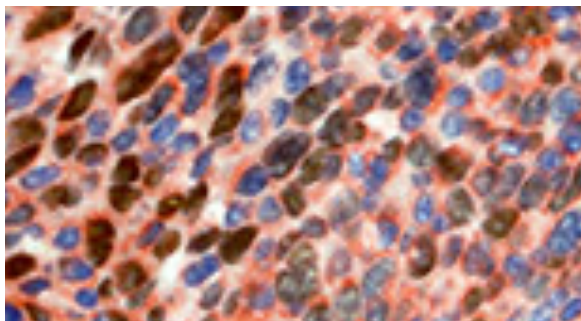


1. metszet: anti-inzulin



2. metszet: anti-glukagon

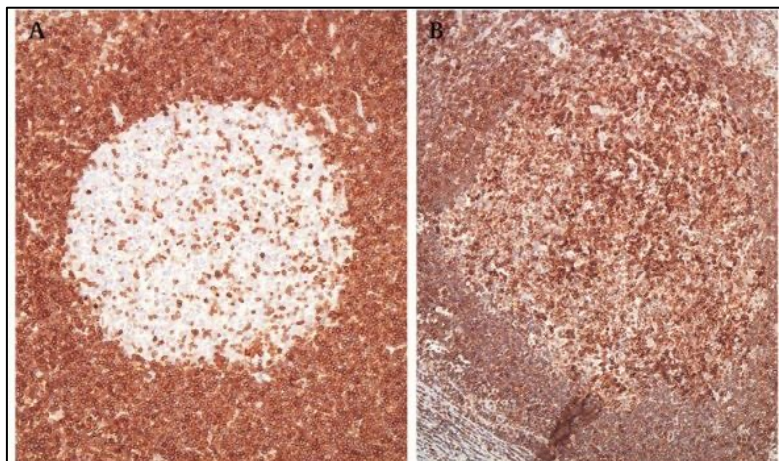
- Egyik lehetőség a kettős jelölés. → Két **különböző enzim**mel jelölt antitestet használunk, melyek **eltérő színreakciót** adnak, így megkülönböztethető a szövetben a két antigén.



Kettős jelölés humán prosztatarákban, a p53 tumor szuppresszor **barnával** (DAB), az AIF (apoptosis-inducing factor) pedig **vörössel** (Fast Red) látható ugyanabban a metszetben.^[9.]

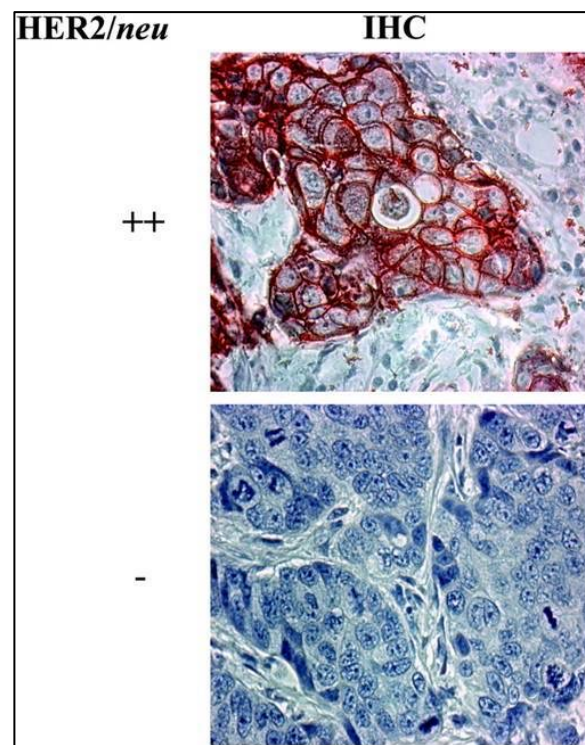
Az immunhisztokémia orvosi jelentősége

1. Morfológiailag nem egyértelmű szövettani megjelenésű eltérések **diagnosztizálásánál** nagy segítséget jelent egy-egy betegségre jellemző marker vagy molekuláris mintázat kimutatása. (lásd jövőre patológiából)
2. Bizonyos markerek jelenléte vagy hiánya nagy **prognosztikai jelentőséggel** bír és megszabhatja a beteg további kezelésének menetét is.



Az anti-apoptotikus Bcl-2 kimutatása normális folliculusban (bal) és follicularis lymphomában. (jobb)

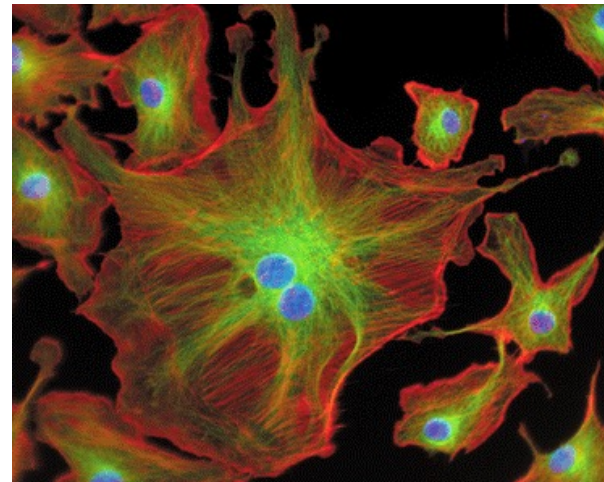
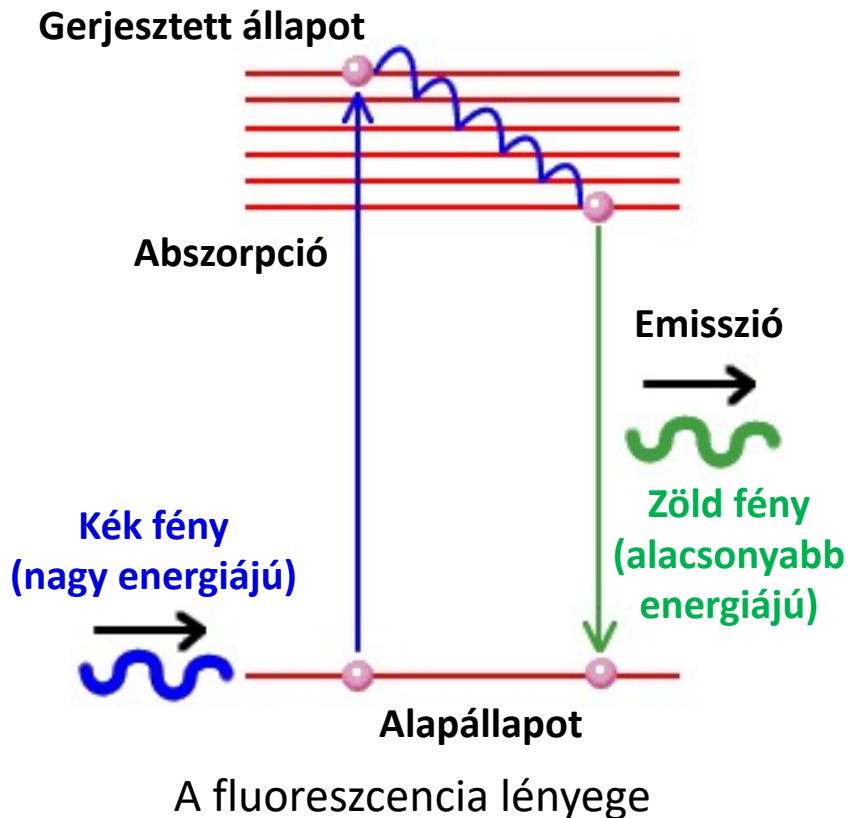
HER2 kimutatása emlőrákban:



A felső betegnél a tumorsejtek expresszálják a HER2 fehérjét, így nála a Herceptin® kezelés hatékony lehet.^[8.] Az alsó beteg tumorsejtei ezzel szemben HER2 negatívak.

Immunfluoreszcens jelölés

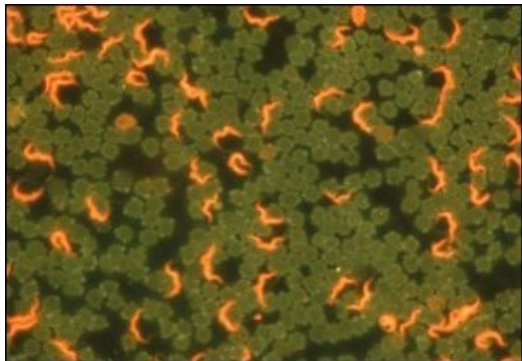
- Különböző **fluorokrómokkal** jelölt antitestekkel egyidejűleg **több antigén** is vizsgálható **ugyanabban a mintában**.^[10.] (pl. fluoreszcens mikroszkópia, áramlási citometria, lásd később)



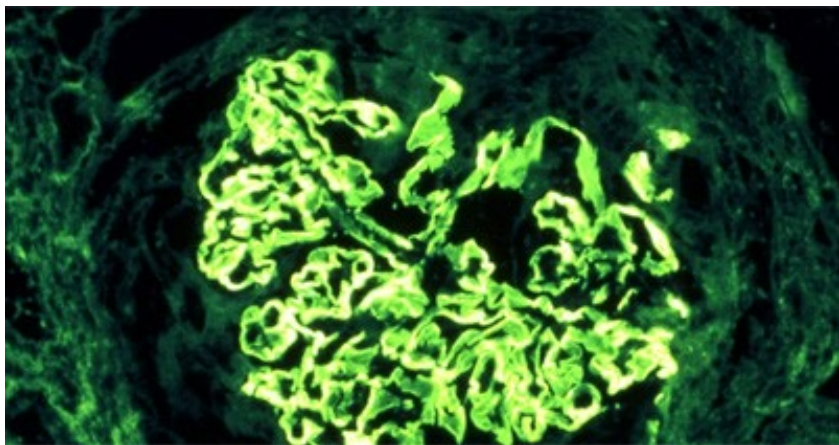
Zöld: tubulin
Piros: aktin
Kék: sejtmag

Endothel sejtek immunfluoreszcens mikroszkópos felvételen

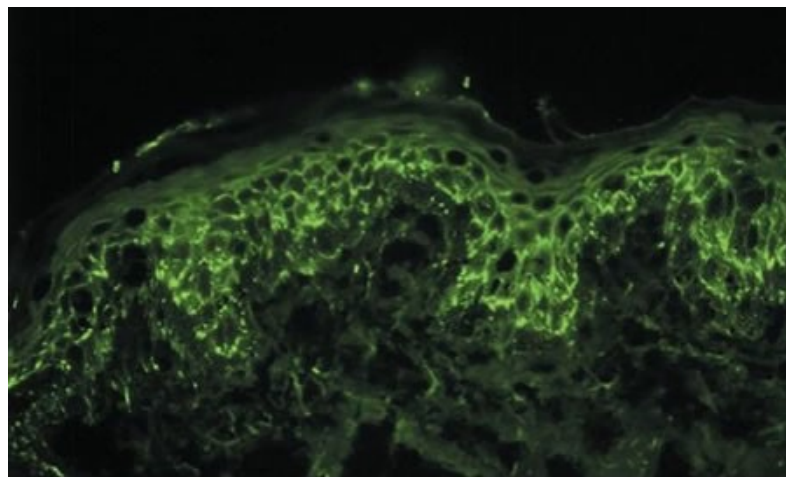
A fluoreszcens mikroszkópia orvosi jelentősége



Acridine Orange (narancssárga) fluorokrómmal jelölt paraziták (*Trypanosoma*) vérkenetben.



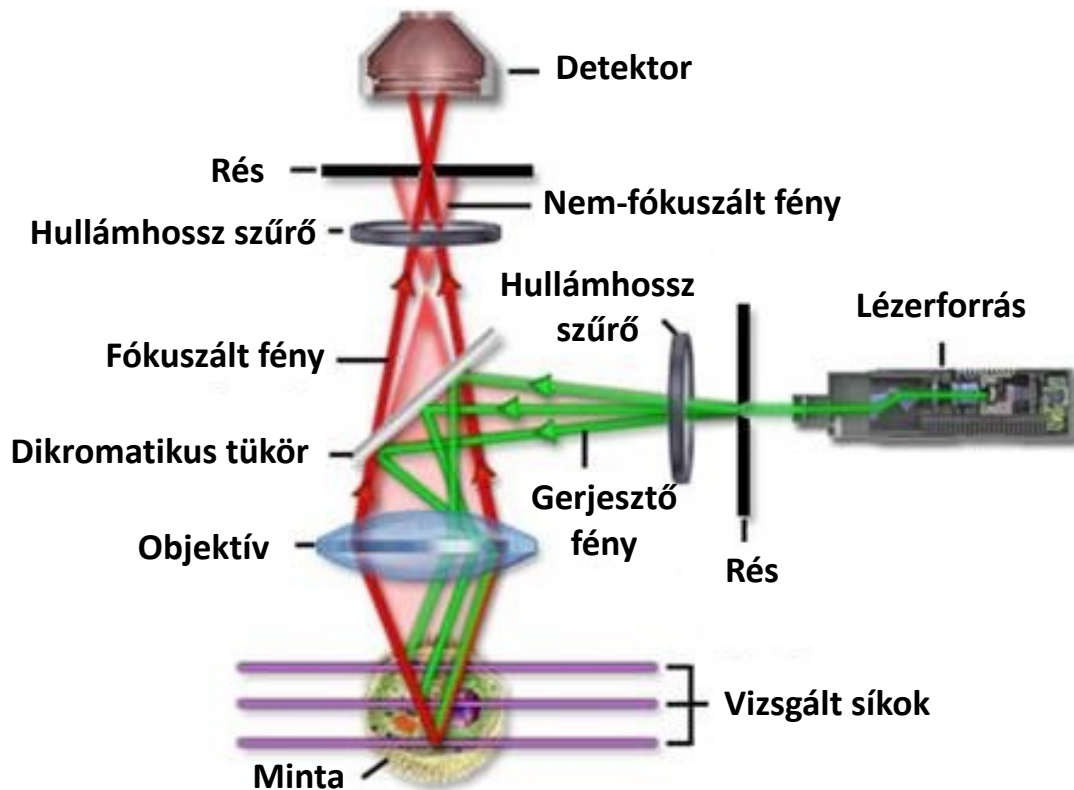
Lineáris IgG lerakódás végig a glomeruláris bazálmembrán (GBM) mentén Goodpasture syndromában. (lásd később)



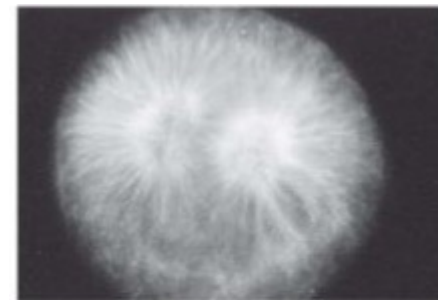
Intercelluláris (=sejtek közötti) IgG lerakódás a bőr hámrétegében pemphigus vulgarisban. (lásd később)

Konfokális mikroszkópia

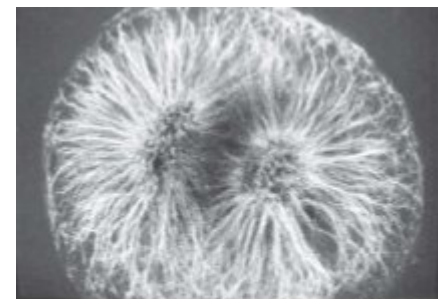
- Hagyományos mikroszkópia: egy nagyobb vastagság **összesített** képét adja (olyan, mint a közönséges röntgenvizsgálat)
- Konfokális mikroszkópia: egy-egy nagyon **vékony szelet** képét adja^[11.] (olyan, mint a CT)



Hagyományos:

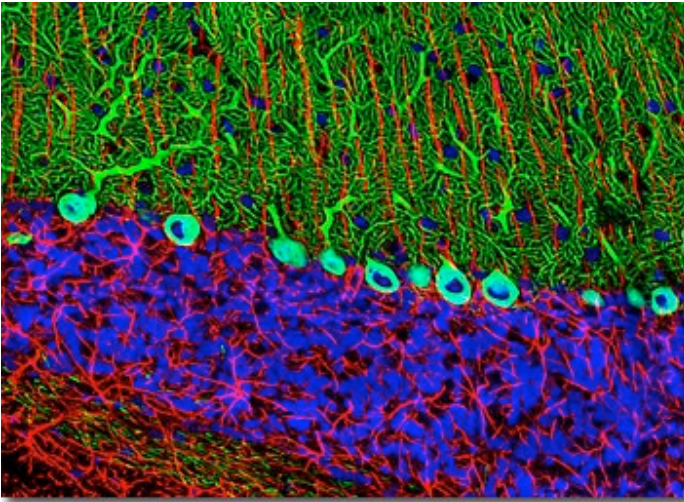


Konfokális:

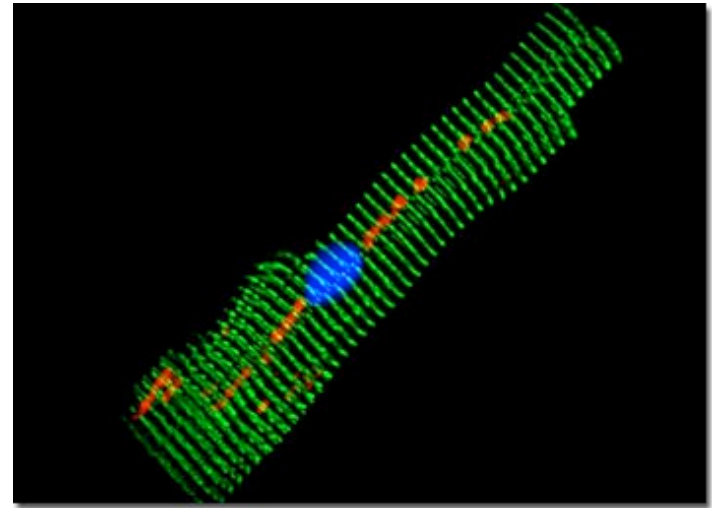


Anti-tubulin antitesttel végzett jelölés egy mitotikus sejtben.

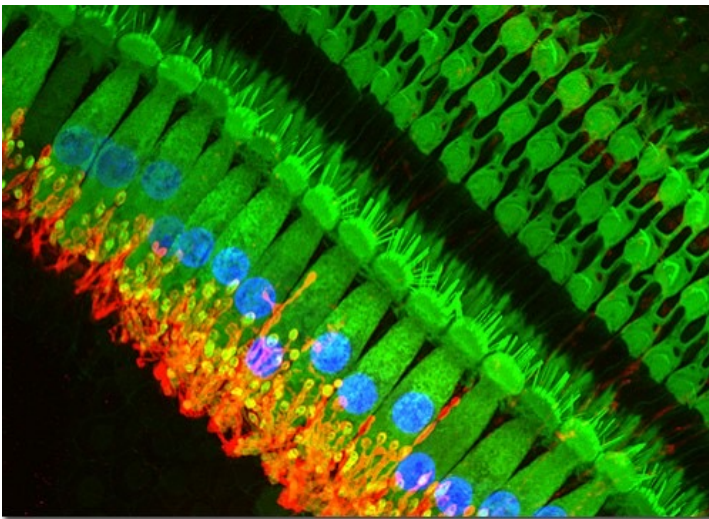
Konfokális mikroszkópia



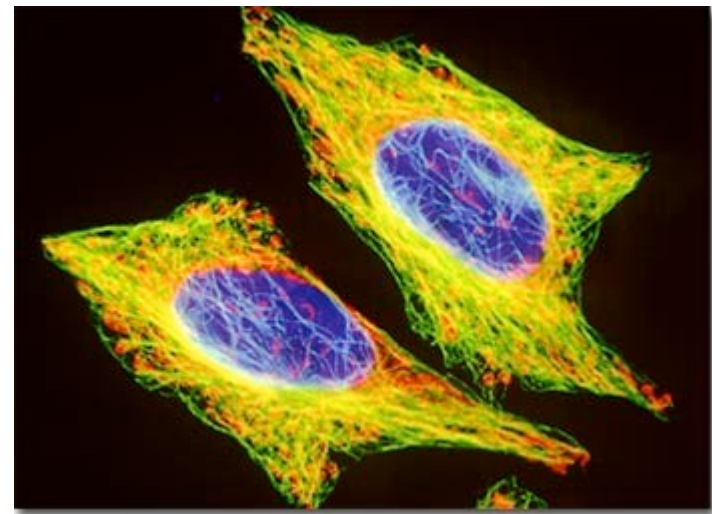
Patkány cerebellum



Szívizom



Corti-szerv

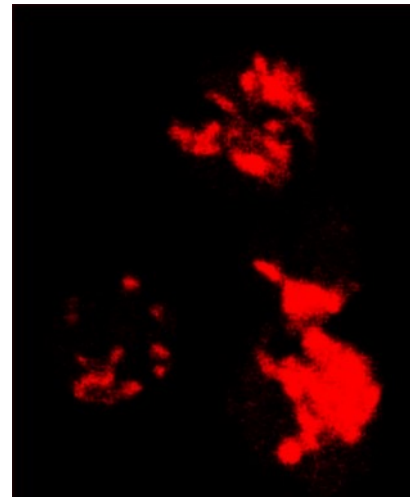
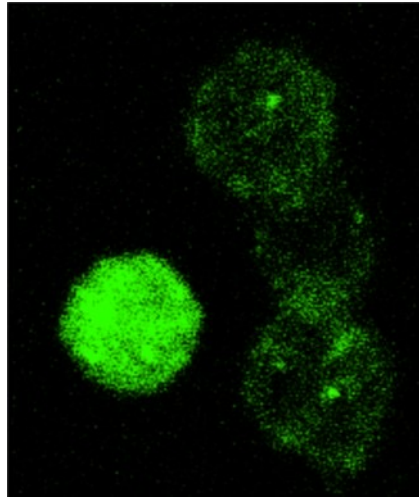
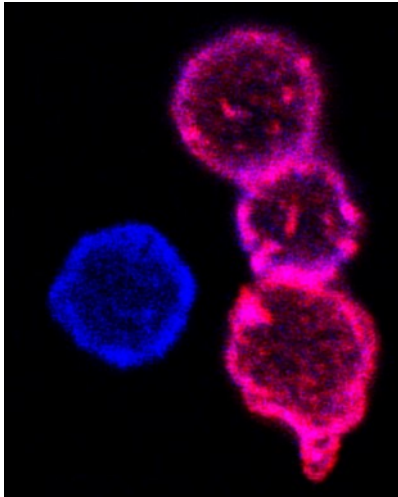


HeLa-sejtek

Kolokalizáció vizsgálata

Zöld: glükokortikoid receptor

Piros: mitokondrium



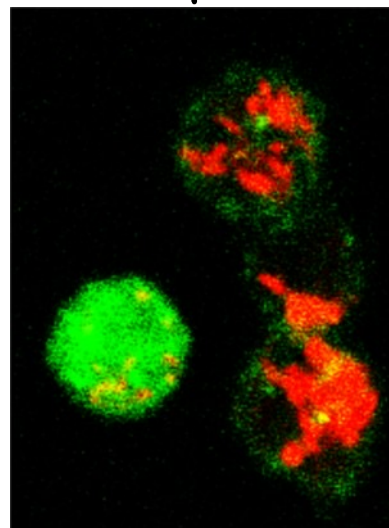
Kék: CD4

Pirosas: CD8

Lila: CD4/CD8 kettős pozitív



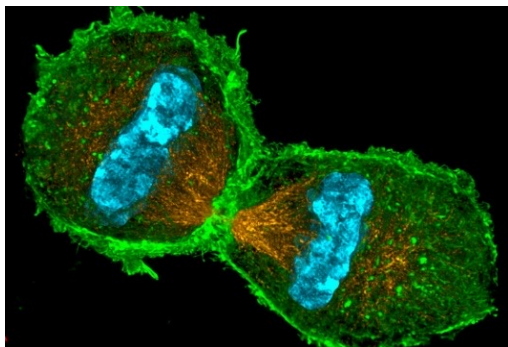
DP (double positive): Kettős pozitív T-sejt, éretlen T-sejt előalak, lásd később



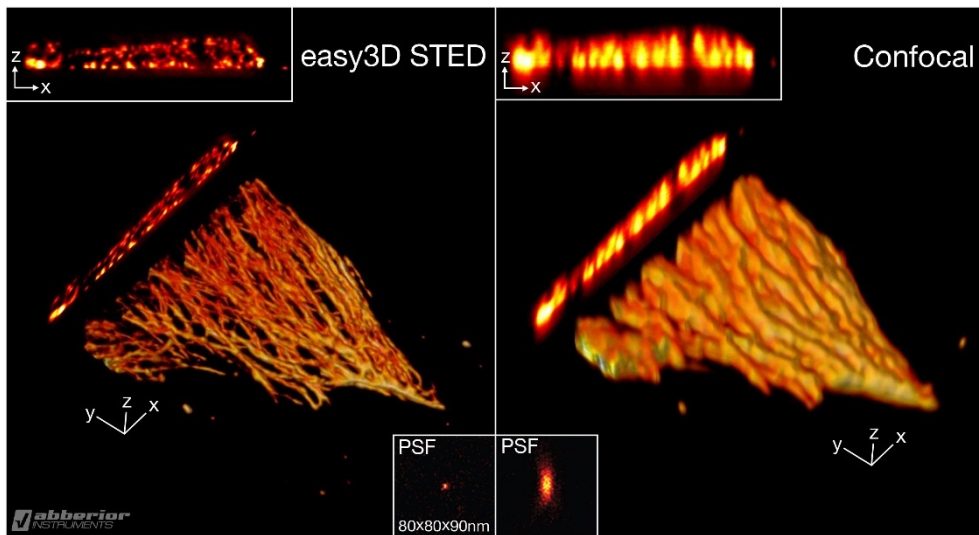
Sárga: GR+mitokondrium

Szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia

20-50 nanométeres nagyságrend → fehérje komplexek^[12,13.]



Két egérséjt telofázisban
Narancs: tubulin
Zöld: aktin
Kék: kromatin



A konfokális (jobb) és a szuperfelbontású STED mikroszkópia (bal) felbontásának összehasonlítása mikrotubulusokon.



Eric Betzig



Stefan W. Hell

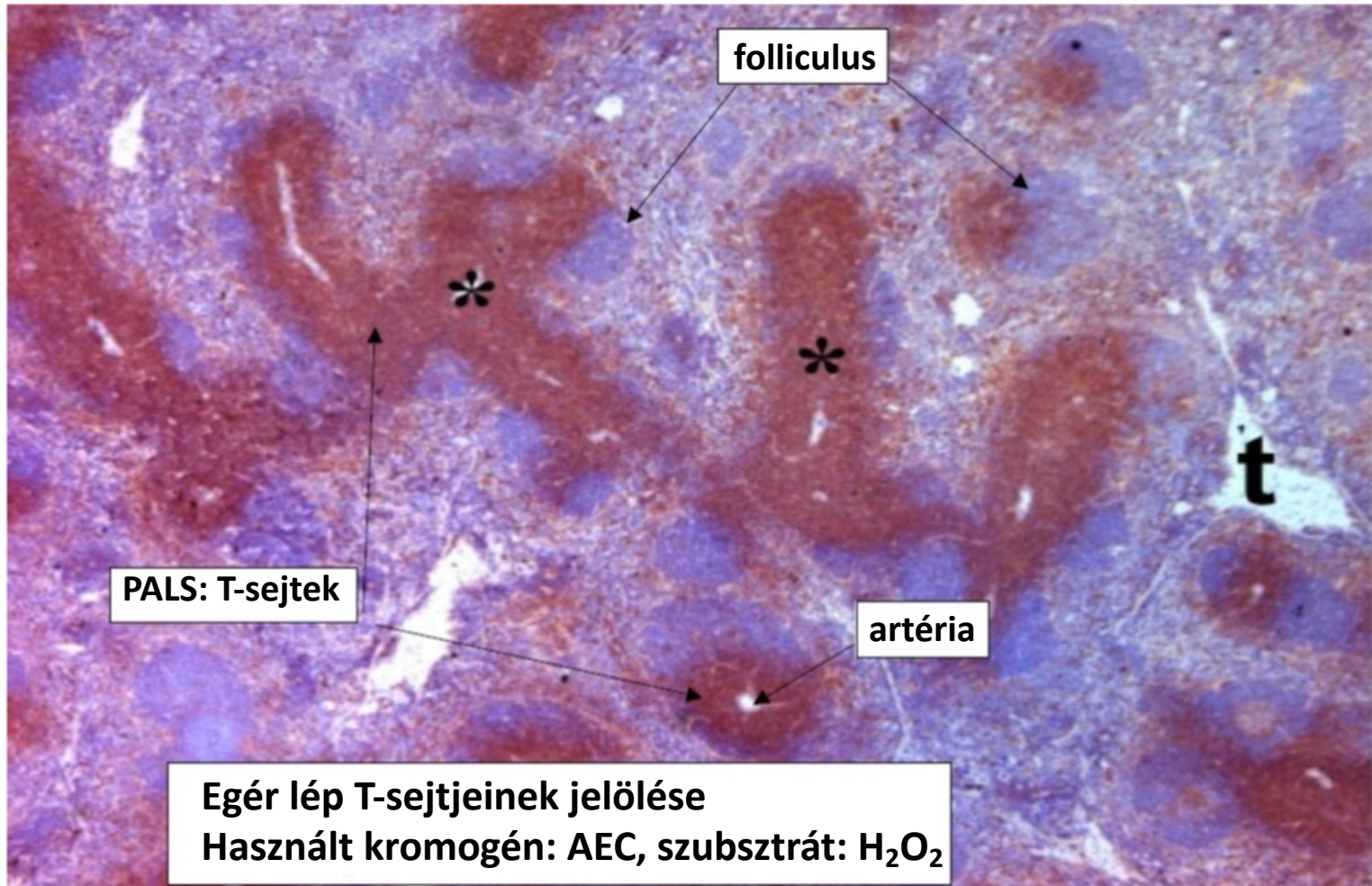


William E. Moerner



2014-es Kémiai Nobel-díj:
„A szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia kifejlesztéséért.”^[14.]

Amit látnotok kellene a metszetben



Lymphocyták szöveti megoszlása

	Perifériás vér	Nyirokcsomók	Lép
Th sejtek	50-60%	50-60%	35-40%
Tc sejtek	20-25%	15-20%	10-15%
B-sejtek	10-15%	20-25%	40-45%
NK-sejtek	≈10%	Igen kevés	≈10%

Hivatkozások 1.

1. Pellicciari C¹: **Histochemistry as an irreplaceable approach for investigating functional cytology and histology.** *Eur J Histochem.* 2013 Dec 19;57(4):e41. doi: 10.4081/ejh.2013.e41.
2. Chen X¹, Cho DB, Yang PC: **Double staining immunohistochemistry.** *N Am J Med Sci.* 2010 May;2(5):241-5. doi: 10.4297/najms.2010.2241.
3. Bratthauer GL¹: **The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods.** *Methods Mol Biol.* 2010;588:257-70. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_26.
4. Bratthauer GL¹: **The peroxidase-antiperoxidase (PAP) method and other all-immunologic detection methods.** *Methods Mol Biol.* 2010;588:243-55. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_25.
5. Liu G¹, Amin S, Okuhama NN, Liao G, Mingle LA: **A quantitative evaluation of peroxidase inhibitors for tyramide signal amplification mediated cytochemistry and histochemistry.** *Histochem Cell Biol.* 2006 Aug;126(2):283-91. Epub 2006 Mar 1.
6. Li CY¹, Ziesmer SC, Lazcano-Villareal O: **Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method.** *J Histochem Cytochem.* 1987 Dec;35(12):1457-60.
7. Buchwalow I¹, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M: **Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts.** *Sci Rep.* 2011;1:28. doi: 10.1038/srep00028. Epub 2011 Jul 1.
8. Figueroa-Magalhães MC¹, Jelovac D¹, Connolly RM¹, Wolff AC²: **Treatment of HER2-positive breast cancer.** *Breast.* 2014 Apr;23(2):128-36. doi: 10.1016/j.breast.2013.11.011. Epub 2013 Dec 19.
9. Abcam.com: **Perfect for immunohistochemistry (IHC): the third RabMAb[®] advantage** (<http://www.abcam.com/primary-antibodies/perfect-for-immunohistochemistry-ihc-the-third-rabmab-advantage>)
10. Sanderson MJ¹, Smith I², Parker I², Bootman MD³: **Fluorescence microscopy.** *Cold Spring Harb Protoc.* 2014 Oct 1;2014(10):pdb.top071795. doi: 10.1101/pdb.top071795.

Hivatkozások 2.

11. Nwaneshiudu A¹, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC: **Introduction to confocal microscopy.** *J Invest Dermatol.* 2012 Dec;132(12):e3. doi: 10.1038/jid.2012.429.
12. Betzig E¹, et al.: **Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution.** *Science.* 2006 Sep 15;313(5793):1642-5. Epub 2006 Aug 10.
13. MacDonald L¹, Baldini G, Storrie B: **Does super-resolution fluorescence microscopy obsolete previous microscopic approaches to protein co-localization?** *Methods Mol Biol.* 2015;1270:255-75. doi: 10.1007/978-1-4939-2309-0_19.
14. NoblePrize.org: **The Nobel Prize in Chemistry 2014**
(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/)