



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



5. Praktikum: Immunhistochemie, Fluoreszenzmikroskopie

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2026.

Direkte Immunhistochemie



Schritte des Praktikums:

Während des Praktikums führen Sie eine immunhistochemische Färbung durch. Tragen Sie einen Mantel und Gummihandschuhe, da Sie mit giftigen Chemikalien arbeiten. Auf dem Objektträger befindet sich ein Schnitt der Mausmilz. Isolierung, Gewebsschnitt und Fixierung der Mausmilz wurden bereits von Kollegen durchgeführt.

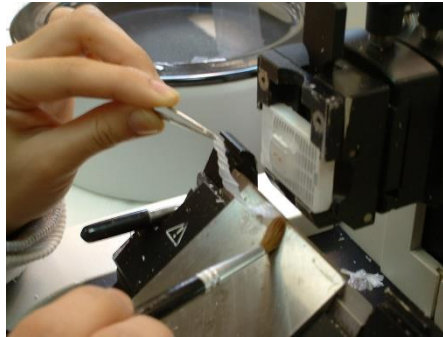
- **Die Hemmung der endogene Peroxidase mit Phenylhydrazin:** Da Phenylhydrazin giftig ist, berühren Sie es nur mit Gummihandschuhen. Ziehen Sie eine Pipettenspitze auf die Pipette und pipettieren Sie 100 µl der Lösung vorsichtig. Die Lösungen sollten tropfenweise zum eingekreisten Schnitt hinzugefügt werden. Lassen Sie die Lösung mit der Pipette sehr vorsichtig auf den Schnitt fallen. Berühren Sie den Schnitt nicht mit der Pipettenspitze, da er leicht beschädigt werden kann. Verwenden Sie für jeden Schritt eine neue Pipettenspitze. Werfen Sie gebrauchte Pipettenspitzen in das Glas. **Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten.**
- **Entfernung der Phenylhydrazinlösung:** Gießen Sie die Phenylhydrazinlösung vom Objektträger. Drehen Sie es zur Seite und lassen Sie es in die Petrischale fließen.
- **Waschschritt:** Legen Sie den Objektträger mit dem Schnitt in den PBS-Behälter. Eine Inkubationszeit von **2 Minuten folgt**. Nehmen Sie den Objektträger aus der PBS-Lösung. Gießen Sie das PBS wie zuvor aus dem Schnitt. **Wiederholen Sie die PBS-Wäsche wie zuvor. Weitere 2 Minuten Inkubation folgt.**
- **Blockierung:** In diesem Schritt werden unspezifische Proteinbindungsstellen mit 5% BSA-PBS-Lösung blockiert. Gießen Sie die PBS-Lösung aus dem Schnitt und pipettieren Sie **100 µl BSA-PBS-Lösung** vorsichtig darauf. Es folgt eine **10-minütige Inkubation**.
- **Markierung der T-Zellen:** T-Zellen werden mit monoklonalem Anti-Thy-1-Antikörper markiert. Thy-1 ist ein T-Zell-Marker. Der Thy-1-spezifische Antikörper ist mit HRP konjugiert. Pipettieren Sie **100 µl Antikörperlösung** auf den Schnitt. Eine **Inkubationszeit von 30 Minuten folgt**.
- **Waschschritt:** Der Schnitt wird auf bekannte Weise zweimal 2 Minuten lang mit PBS gewaschen.
- **Zugabe von Chromogen und Substrat:** Gießen Sie PBS aus dem Schnitt. Chromogen (AEC: Amino-Ethylcarbazol, GIFTIG) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Substrat), gelöst in 0,1 M (molare) Na-Acetat-Puffer, hinzufügen. In Anwesenheit von Substrat wandelt Antikörper-konjugiertes HRPO Chromogen in ein farbiges Endprodukt um. Das histologische Präparat wird im Mikroskop untersucht.

Immunhistochemie 1.

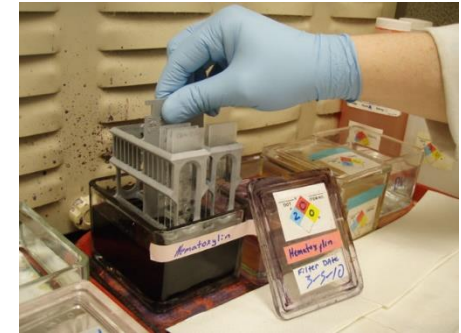
1. Warum „histo“? → **Histologie** (Sie haben solche Gewebsschnitte schon gesehen)



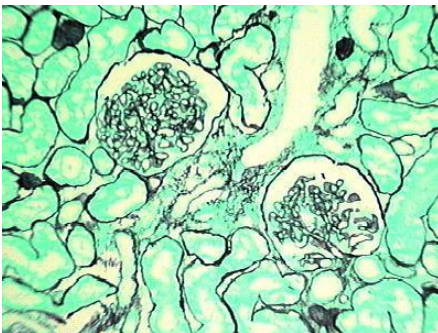
1. Probe gewinnen



2. Gewebsschnitte herstellen



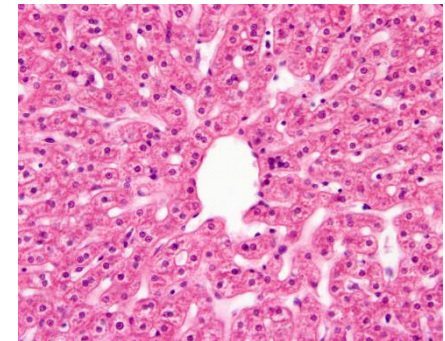
3. Färben der Schnitte



Glomeruli (Gömöri-Silberimprägnation)



4. Untersuchen des Schnitts im Mikroskop



Leber (H&E-Färbung)

Immunhistochemie 2.

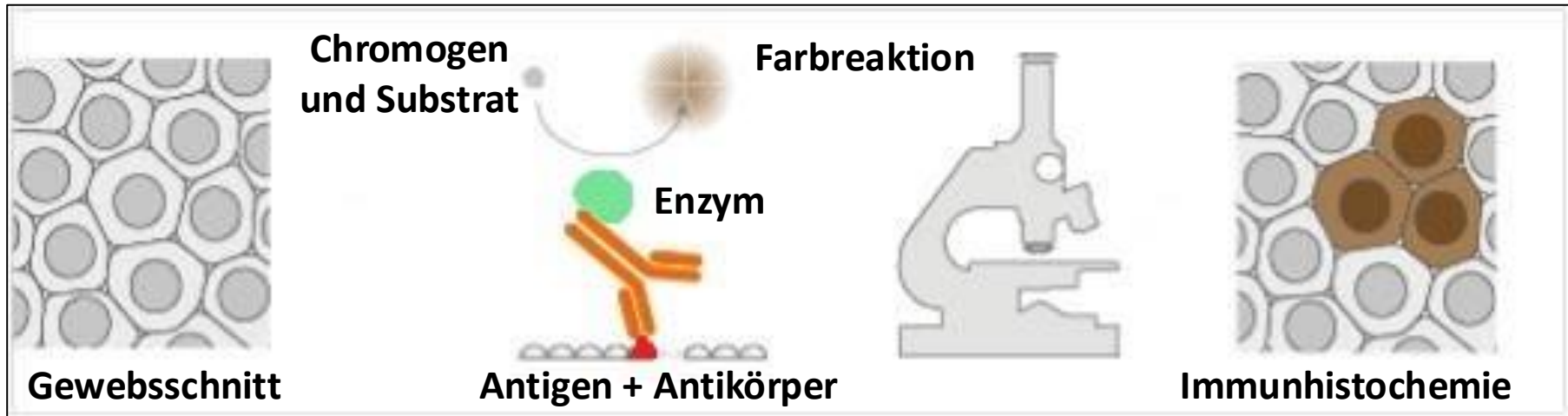
2. Warum „Histochemie“?

- 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:

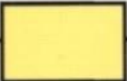
1. **HRP** = Horseradish peroxidase (Meerrettich-PO)
2. **ALP** = alkalische Phosphatase

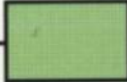
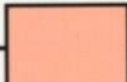
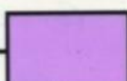
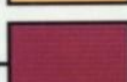
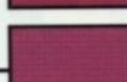
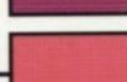
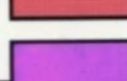


die am häufigsten genutzten Chromogene:

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

- **NBT (Nitroblau-Tetrazolium)**

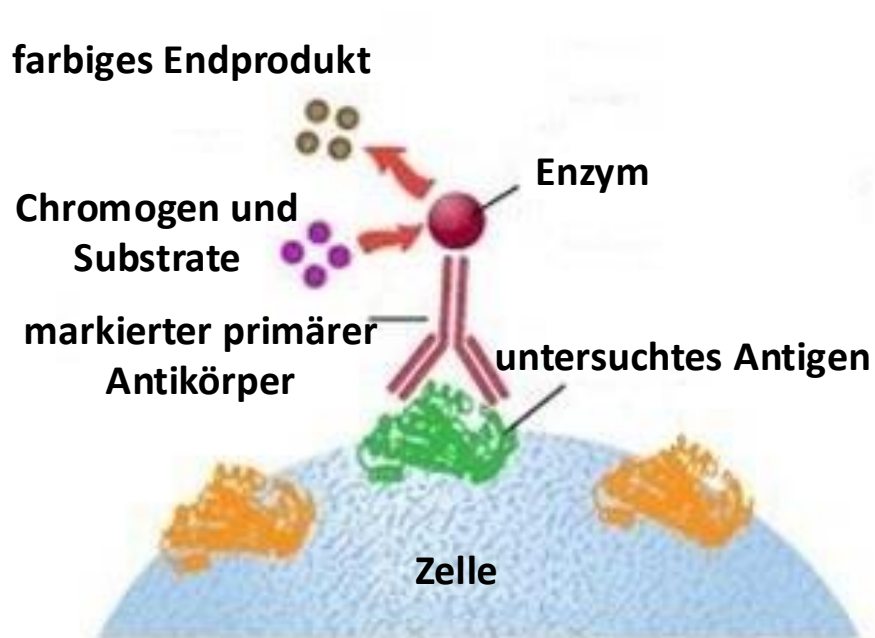
ALP	P-Nitrophenyl-Phosphate (pNPP)		löslich	ELISA
	Nitroblau-Tetrazolium (NBT)		unlöslich	Histochemie, Immunoblotting
	Fast Red		unlöslich	Histochemie, Immunoblotting

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

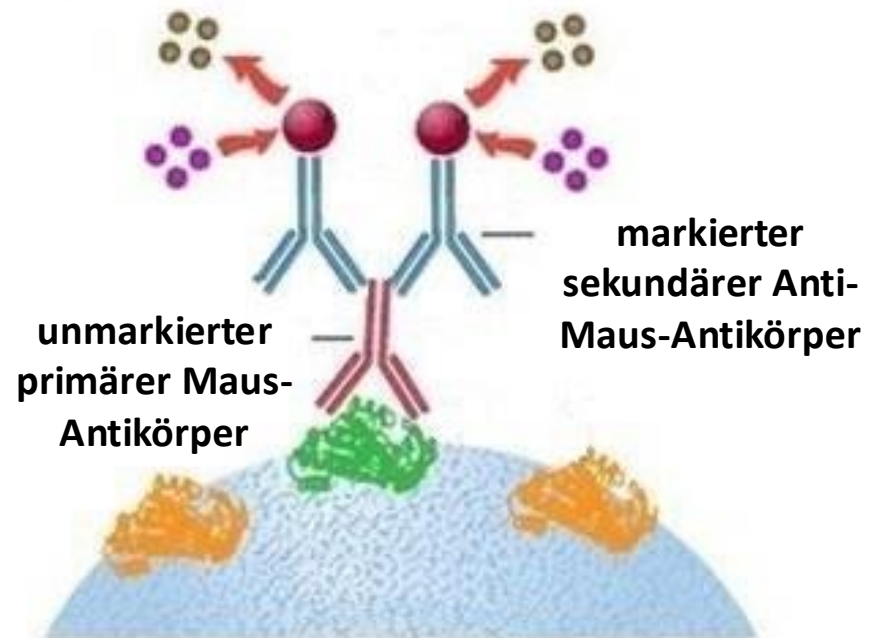
Man muss beachten, ob das **Endprodukt** des Chromogens **löslich oder unlöslich** ist :

- 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



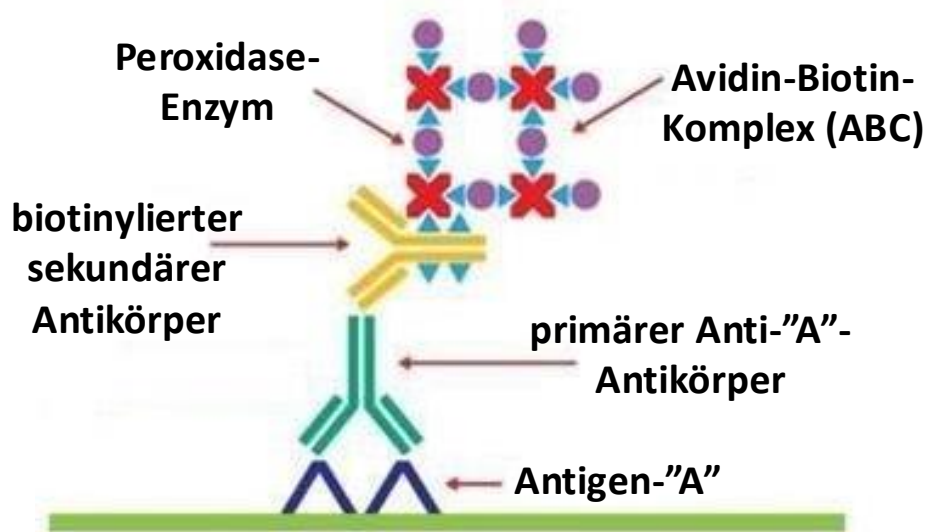
indirekte IHC

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

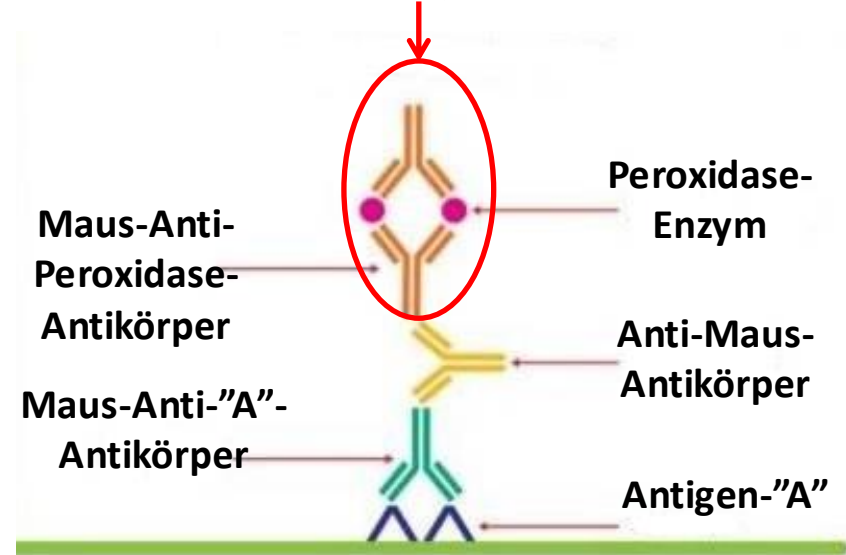
Avidin-Biotin-Komplex (ABC)



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)

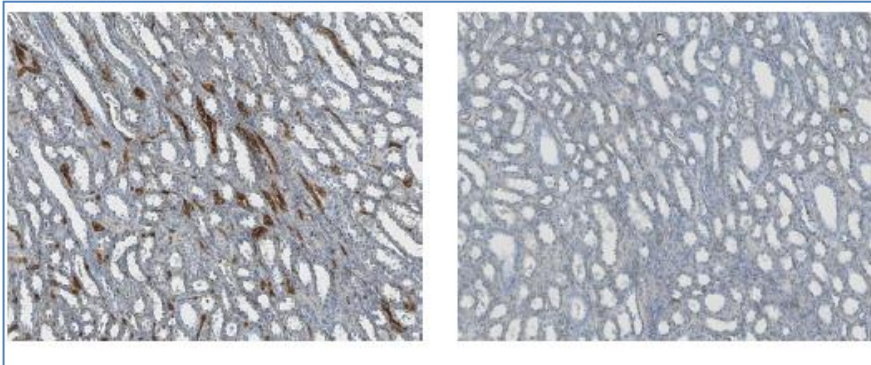


Tiere werden mit Peroxidase immunisiert und dann werden Anti-Peroxidase-Antikörper aus dem Tierserum isoliert. Sowohl Peroxidase als auch Anti-Peroxidase-Antikörper werden hinzugefügt und sie bilden Komplexe (PAP) ^[4.]

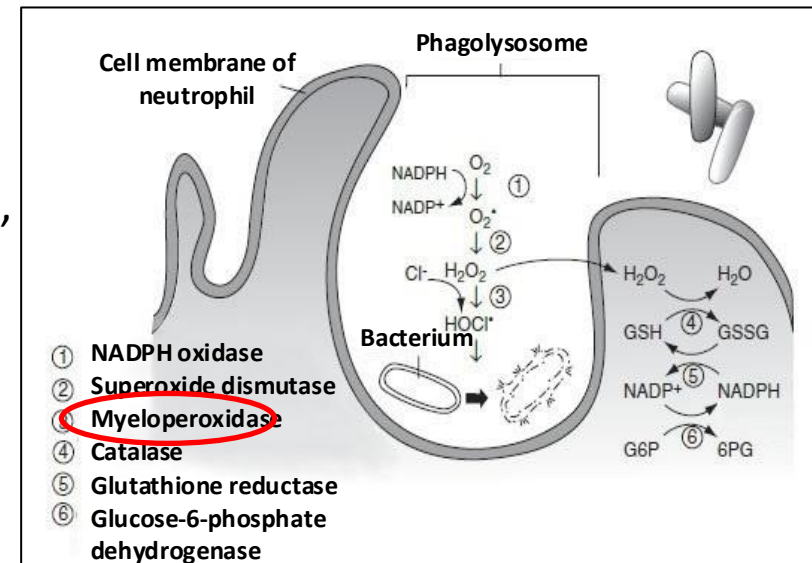
Vorteil: **Signalverstärkung**

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

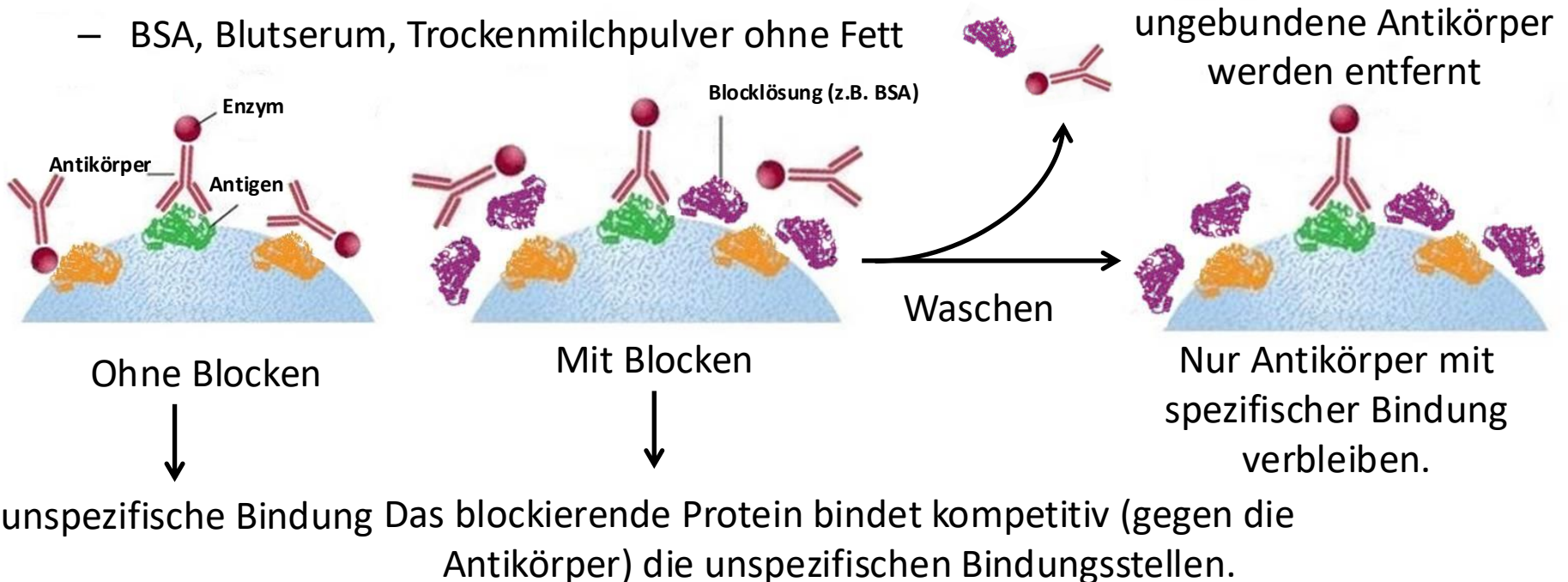


Haupt-Inhibitoren:^[6.]

- Phenylhydrazin
- Wasserstoffperoxid
- Azide

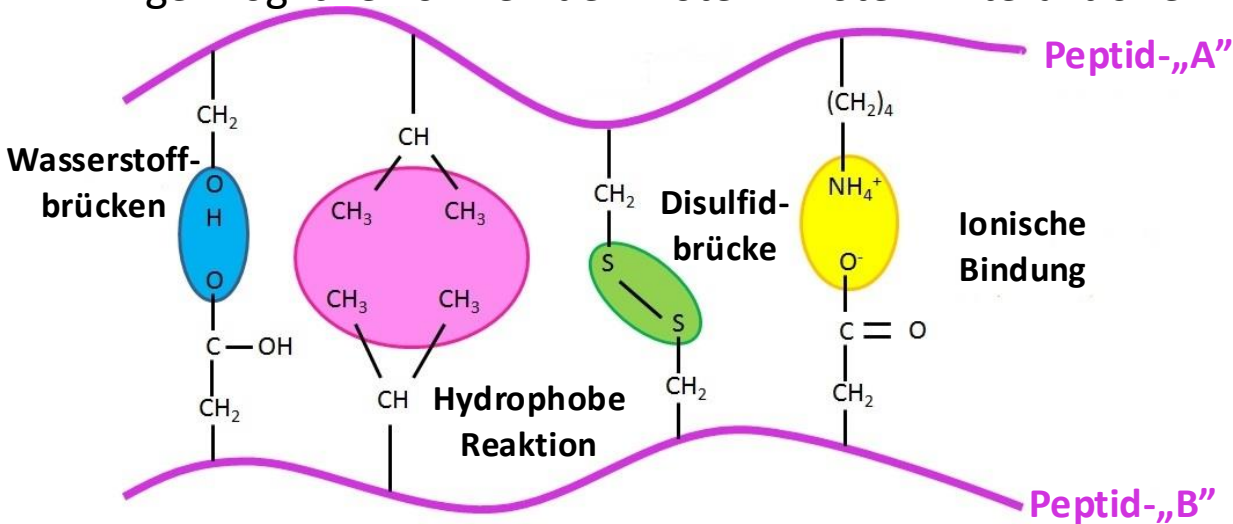
Blocken

- 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

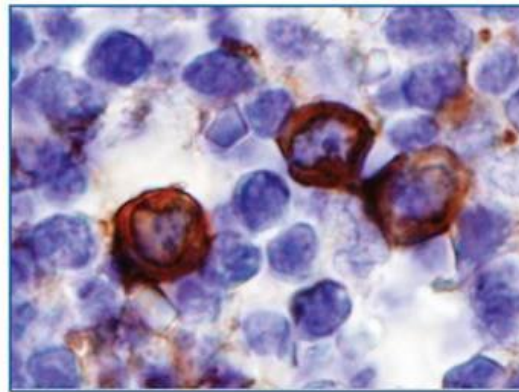
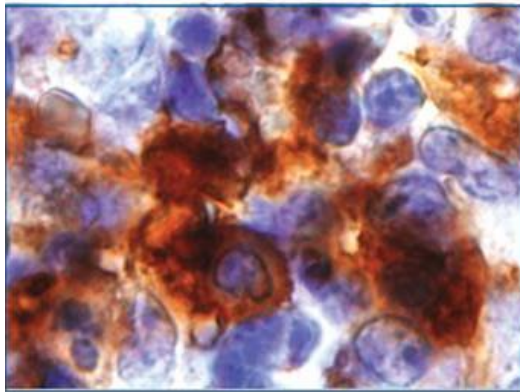
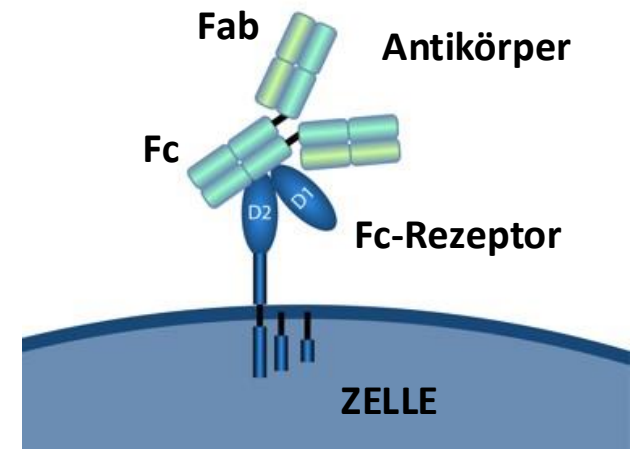


Nicht-antigenspezifische Protein-Protein-Interaktionen

Einige mögliche Formen der Protein-Protein-Interaktionen:



Problem ausschließlich bei Antikörpern:

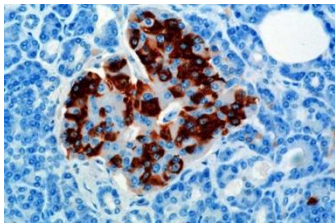


Fc-Rezeptoren können durch unmarkierte Antikörper blockiert werden.

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.:

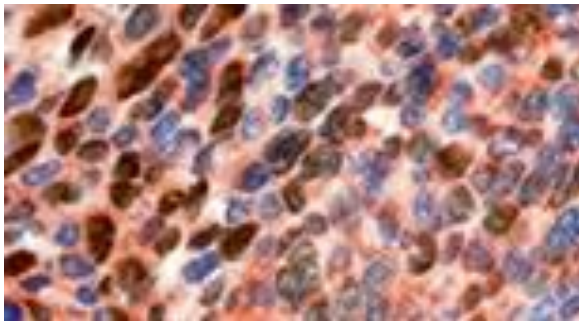


1. Schnitt : Anti-Insulin



2. Schnitt: Anti-Glukagon

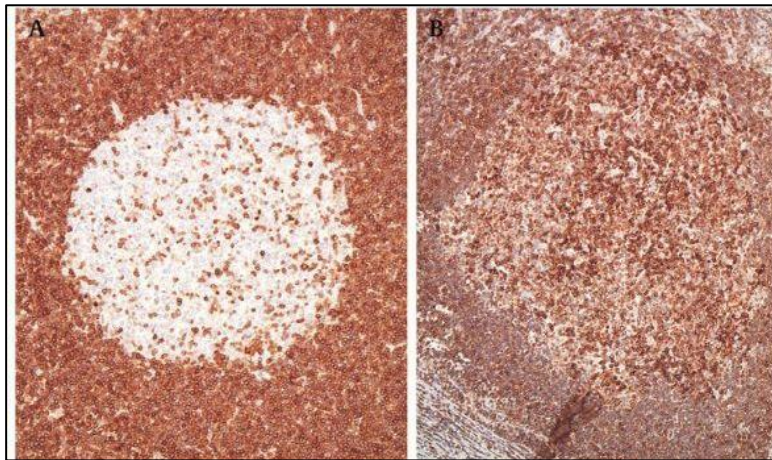
- Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung der Doppelfärbung. → Man fügt 2 Antikörpertypen, die jeweils **mit einem anderen Enzym konjugiert** sind und in einer **anderen Farbreaktion** resultieren, die unterschieden werden kann.



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.]

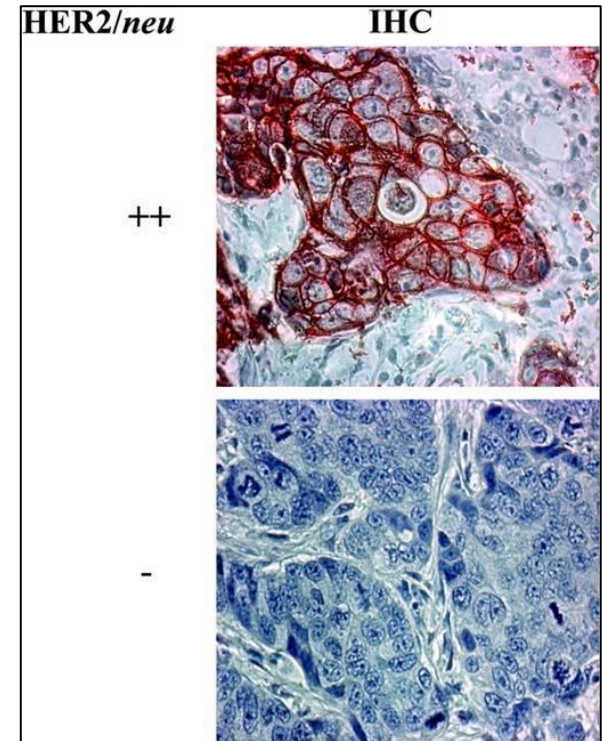
Klinische Bedeutung der IHC

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 follikulären Lymphom. (rechts)

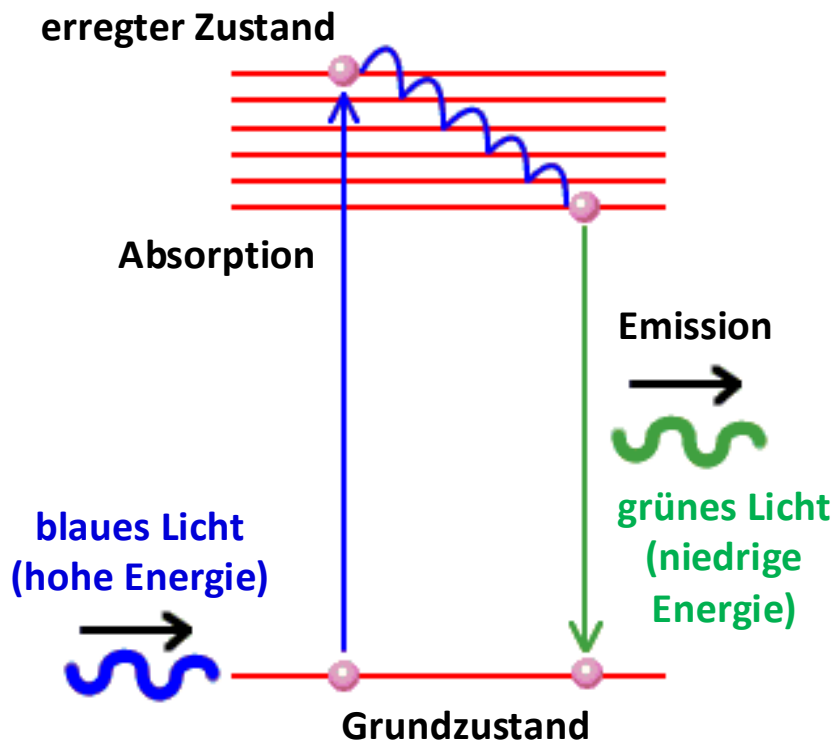
Erkennung von HER2 im Mamma-CA.



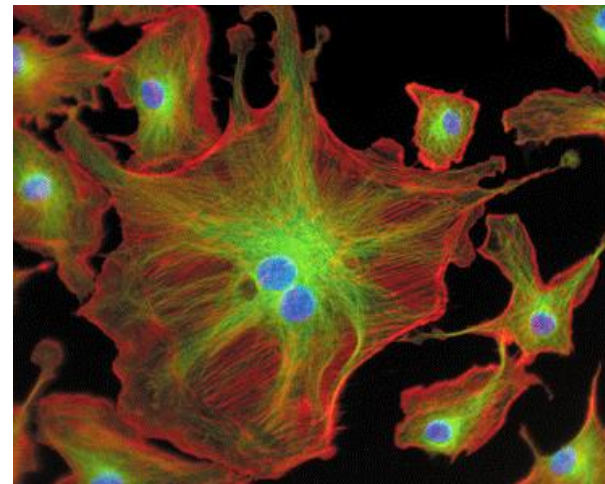
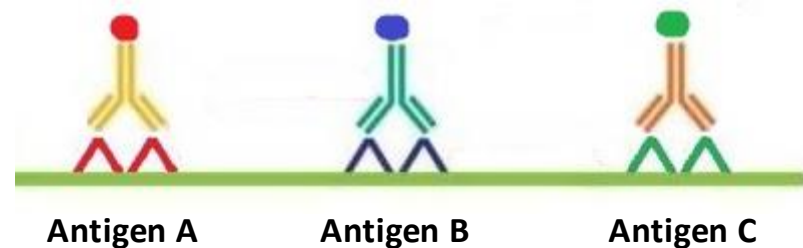
Die Tumorzellen des oberen Patienten haben eine starke HER2-Exprimierung, wodurch der Patient mit Herceptin behandelt werden kann.^[8.] Die Zellen des unteren Patienten sind HER2-negativ.

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

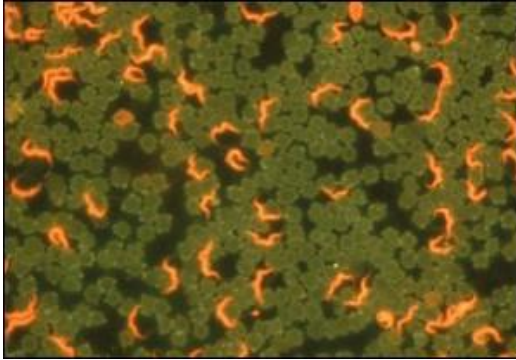


grün: Tubulin
rot: Aktin
blau: Zellkern

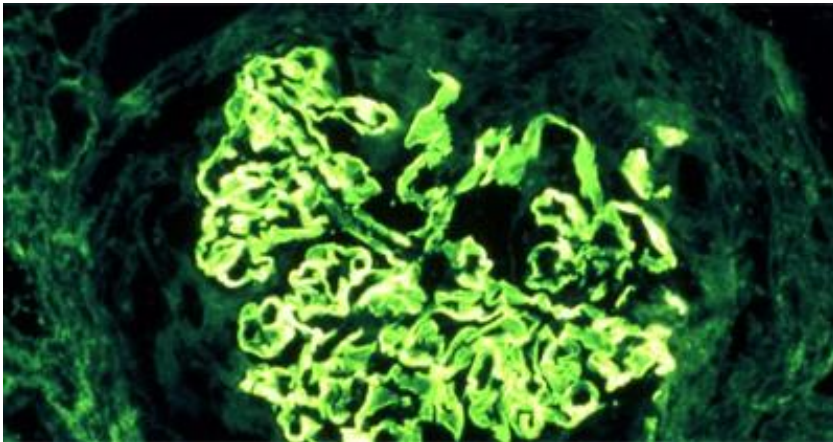
grundlegendes Prinzip der Fluoreszenz

fluoreszenzmikroskopisches Bild von
Endothelzellen

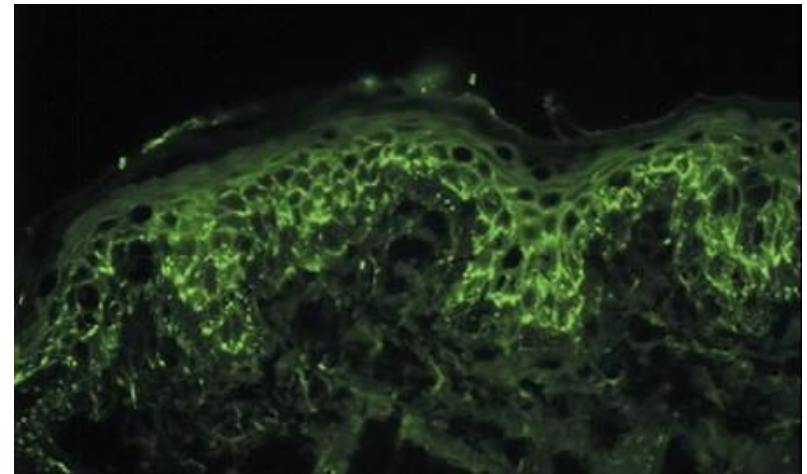
Klinische Bedeutung der Fluoreszenz- mikroskopie



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



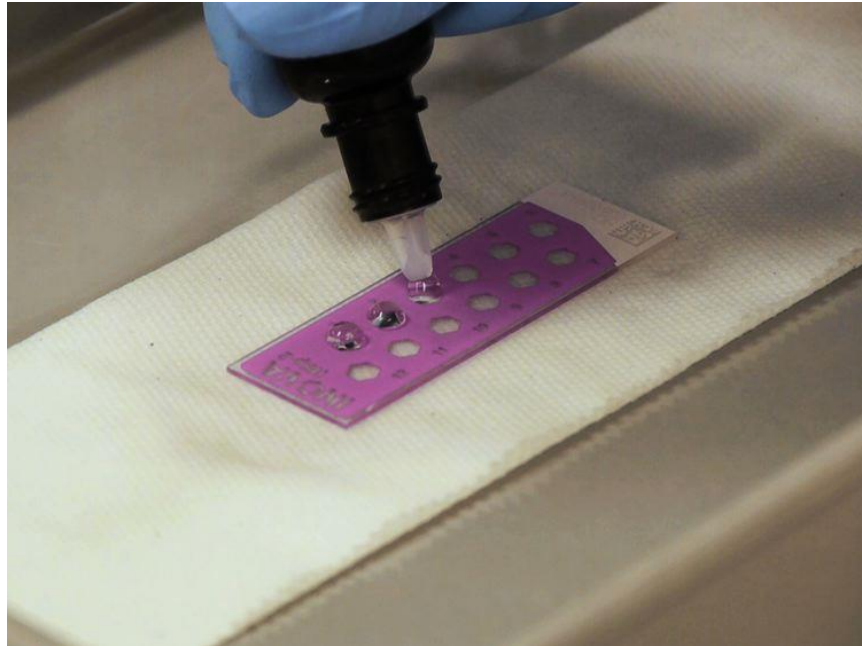
Lineare Ablagerung von IgG entlang der glomerulären Basalmembran eines Patienten mit Goodpasture-Syndrom. (siehe später)



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

IMMUNFLUORESZENZ

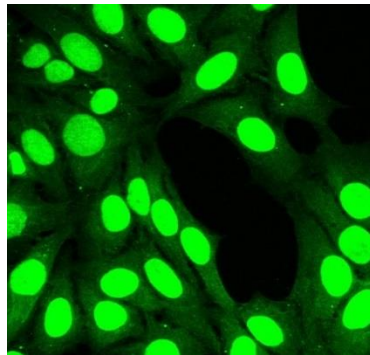
„ Der Goldstandard“



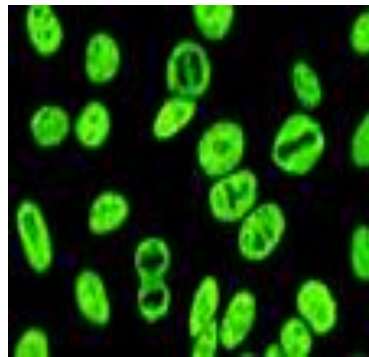
ANA-Screening – Bestimmung antinukleärer Antikörper – IIF

Ein zusammenfassender Name für mehrere verschiedene Autoantikörper.

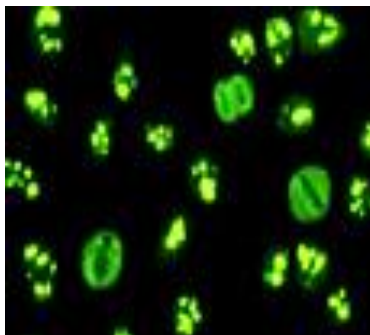
Screening-Test, der am häufigsten angeordnete Test.



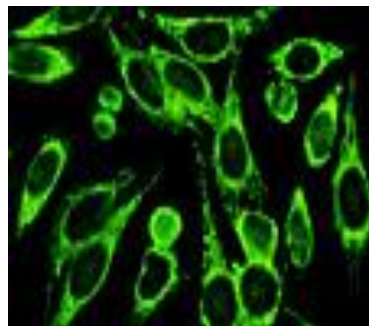
Anti-dsDNA +



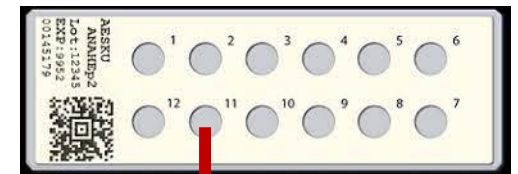
Anti-PMScl+



Anti-SSA/SSB+ ?



AMA-M2 +

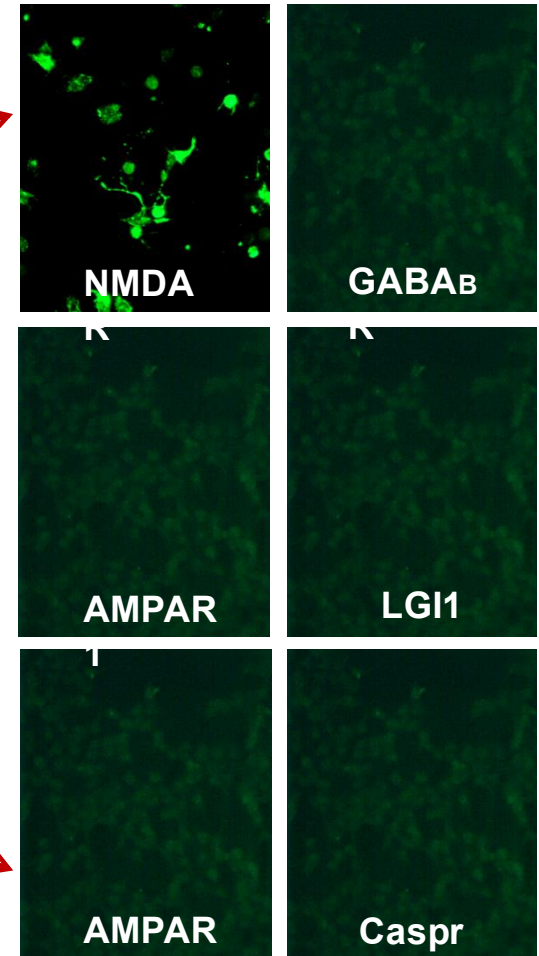
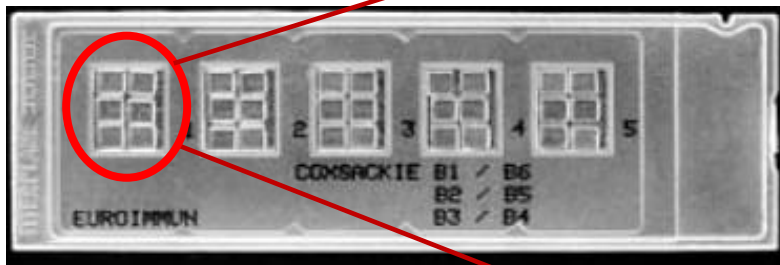


Hep-2-Zelle

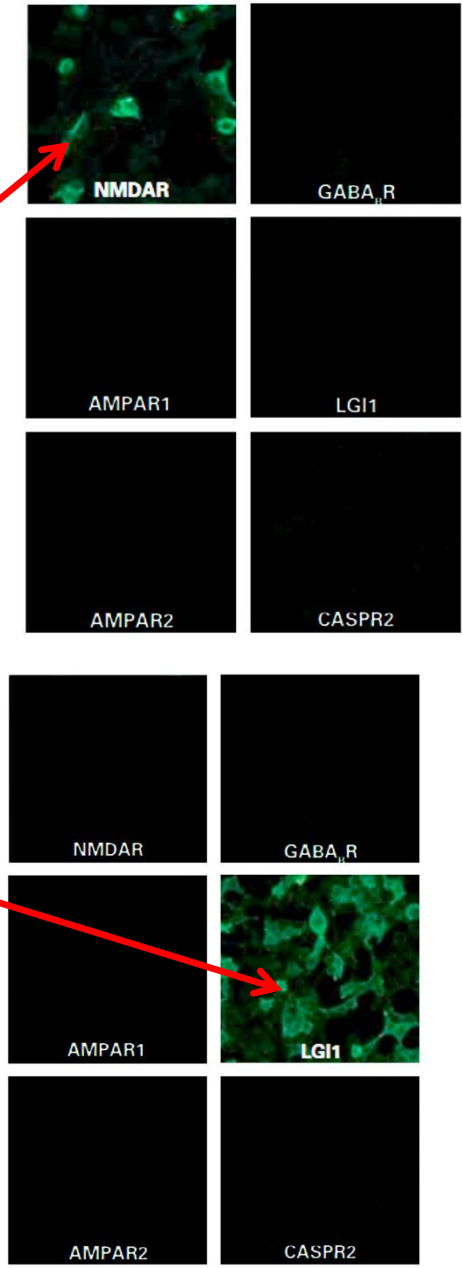
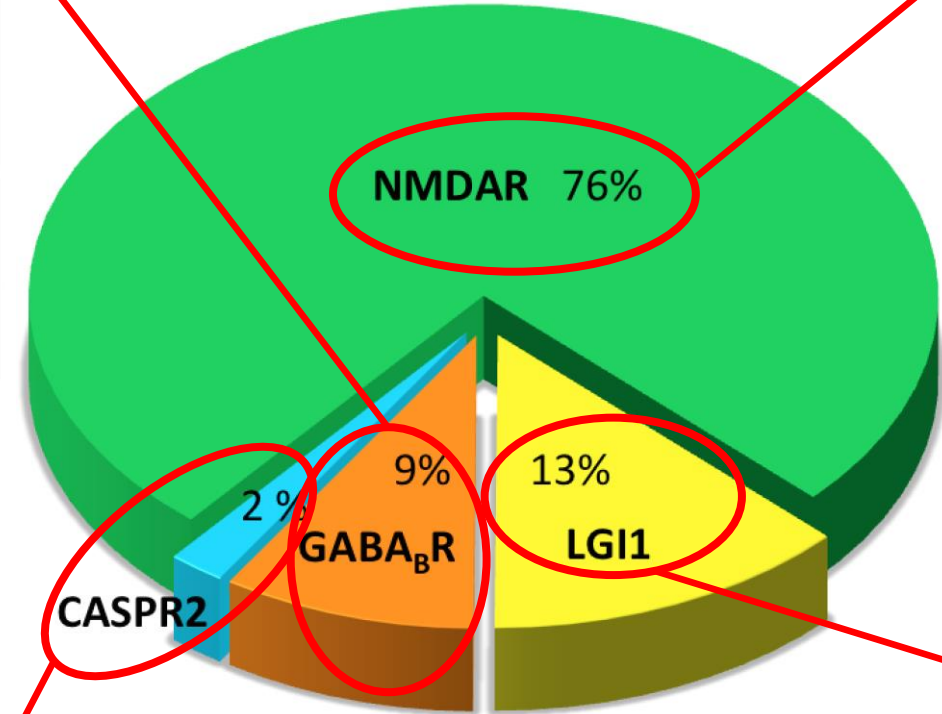
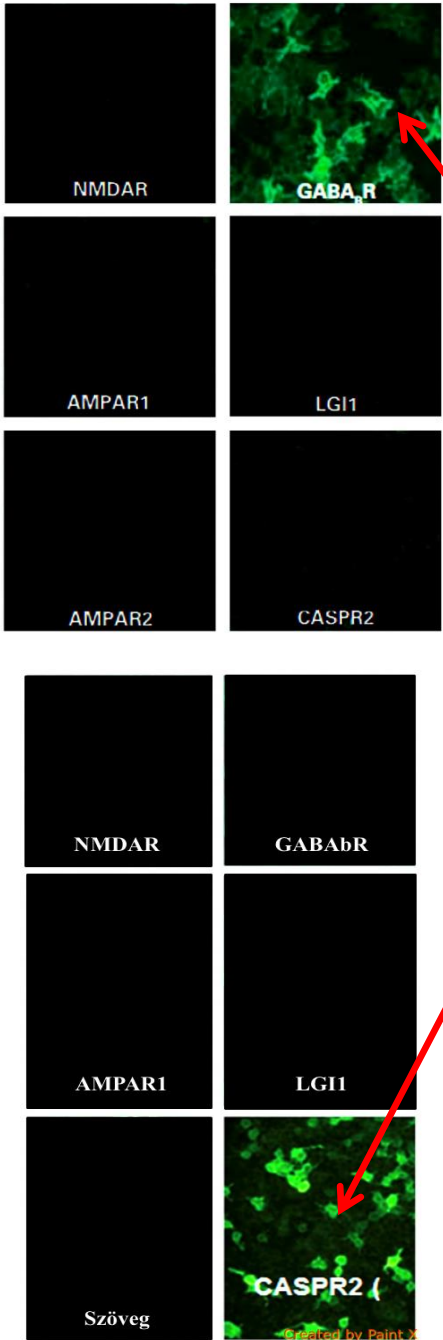
1. Serum-Autoantikörper
2. Anti-Human-IgG-FITC

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.

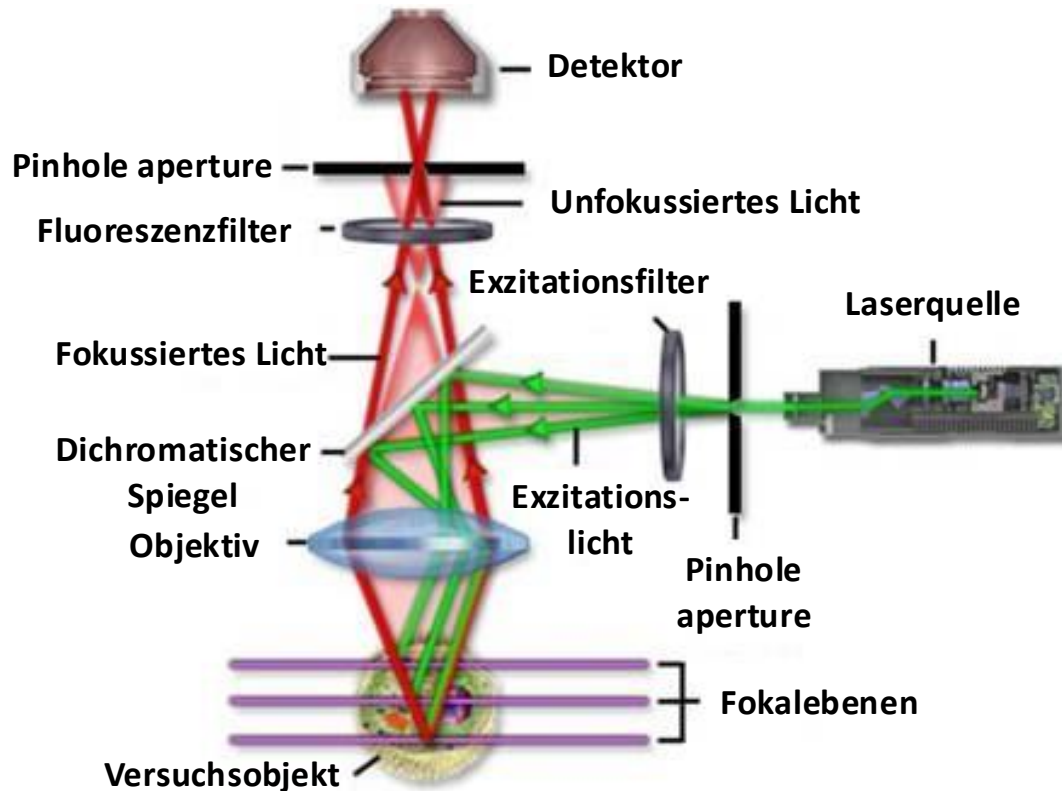


Anzahl der Untersuchungsanfragen (30.06.2011-08.08.2017.)	836	
Anzahl der untersuchten Patienten	717	100%
Anzahl positiver Fälle	54	7,53%

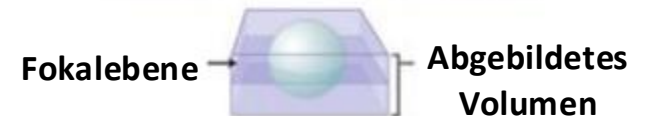
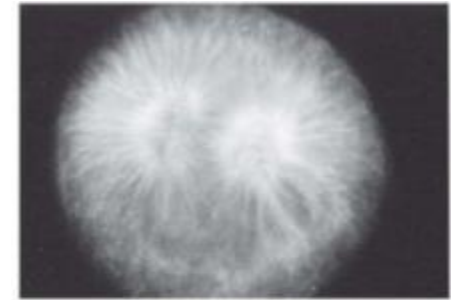
Gegen die anderen Rezeptoren wurden keine positiven Proben gefunden.

Konfokalmikroskopie

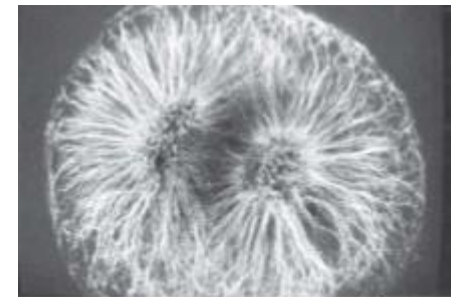
- Normale Mikroskope: Bieten ein summiertes Bild des gesamten Volumens des Schnitts (ähnlich dem klassischen Röntgen)
- Konfokalmikroskope: Schaffen Bilder eines sehr dünnen optischen Schnitts.^[11.] (ähnlich dem CT)



Normal:

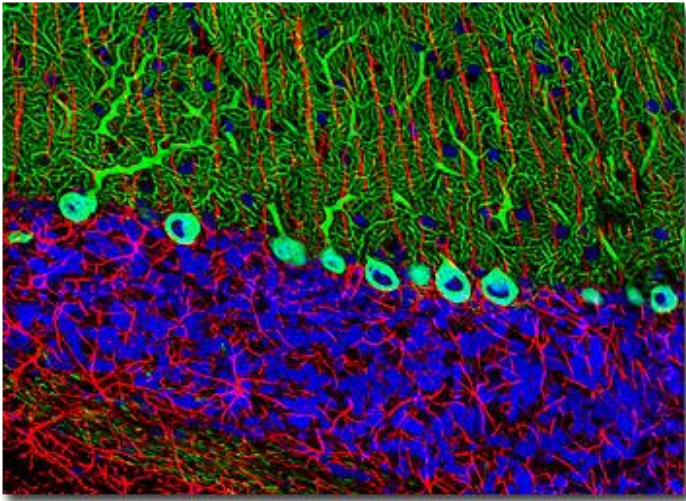


Konfokal:

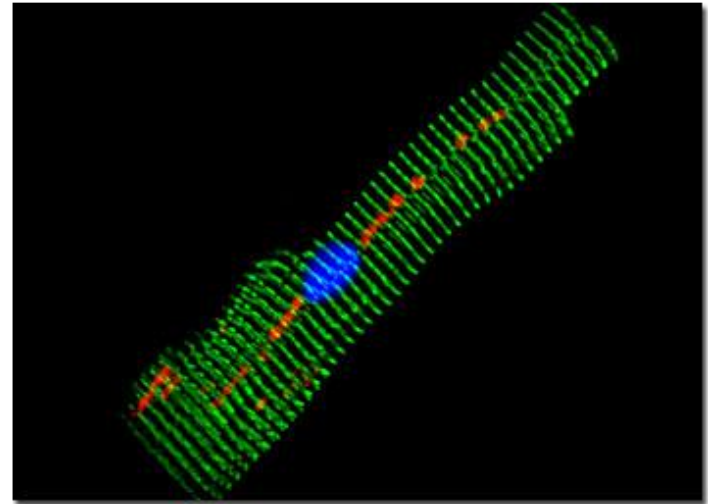


Markierung des Tubulins in mitotischen Zellen mit dem Anti-Tubulin-Antikörper.

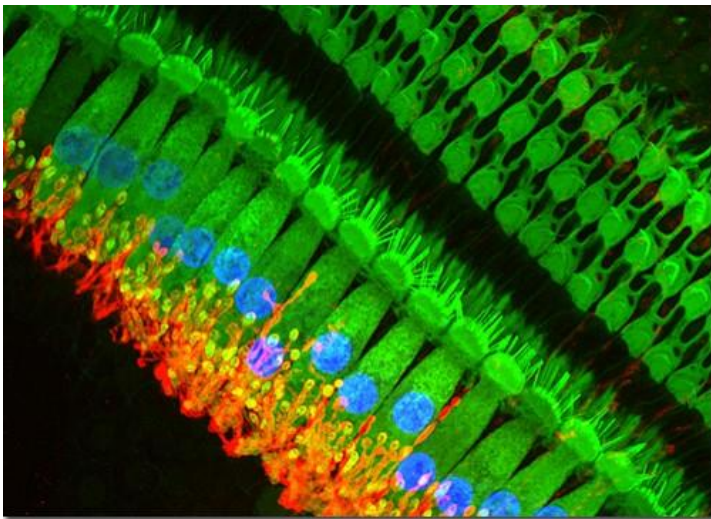
Konfokalmikroskopie



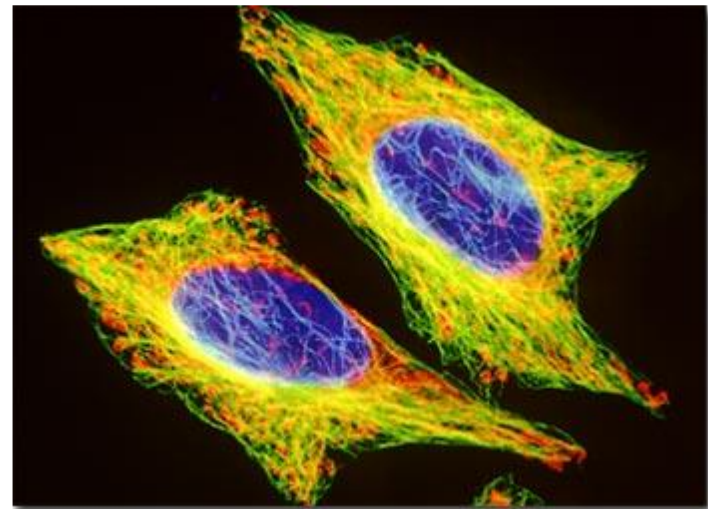
Rattenzerebellum



Herzmuskel



Organ von Corti

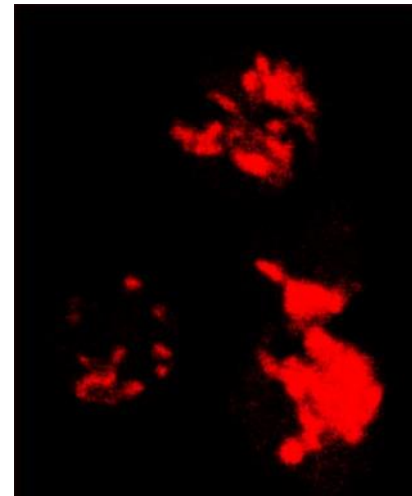
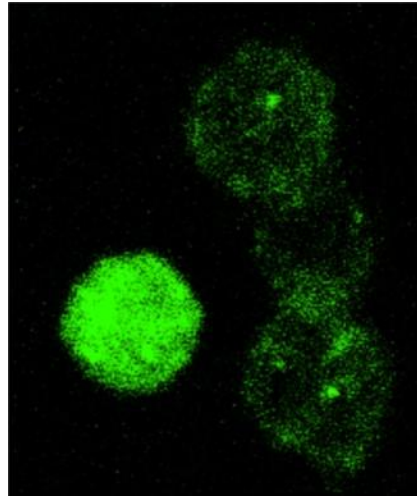
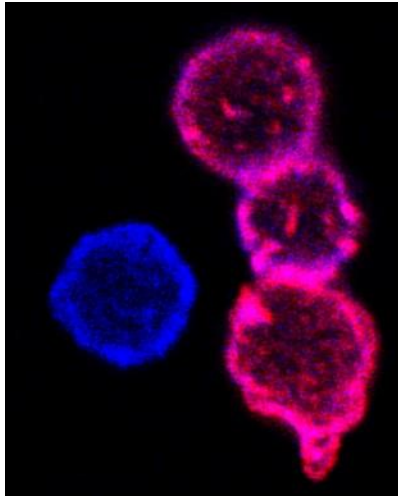


HeLa-Zellen

Detektion der Kolo-kal-ization

grün: Glukokortikoidrezeptor

rot: Mitochondrien



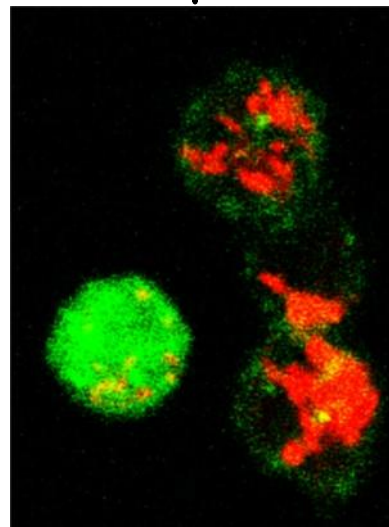
blau: CD4

rötlich: CD8

lila: CD4/CD8-doppelpositiv



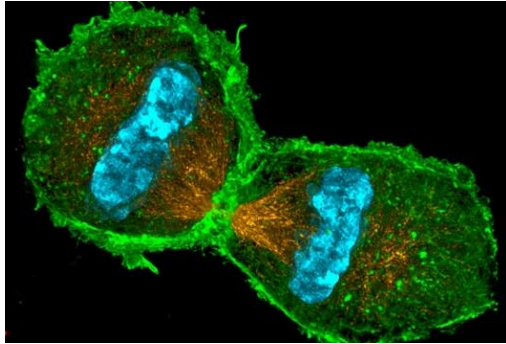
DP (doppelpositiv): Unreife T-Zell-Vorläufer exprimieren sowohl CD4 als auch CD8, siehe später.



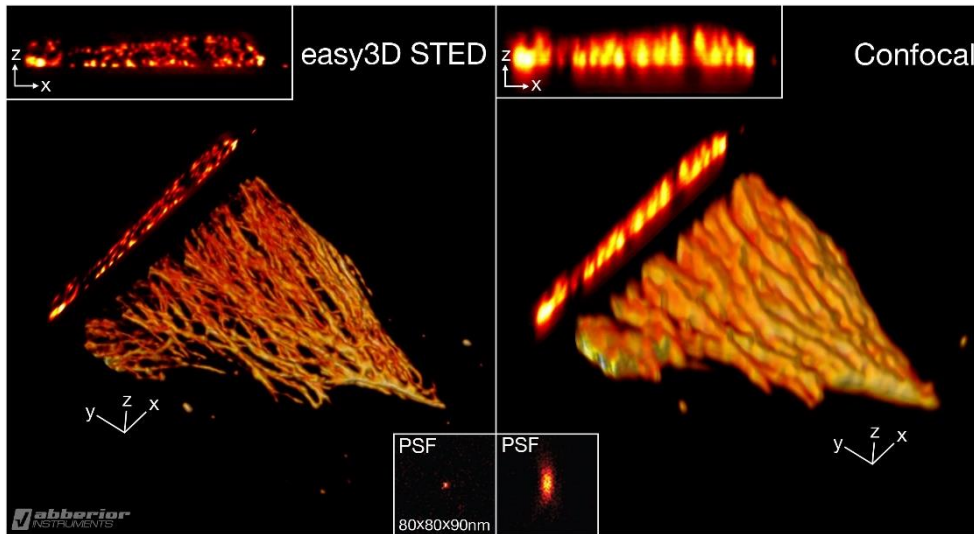
gelb: GR+Mitochondrium

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

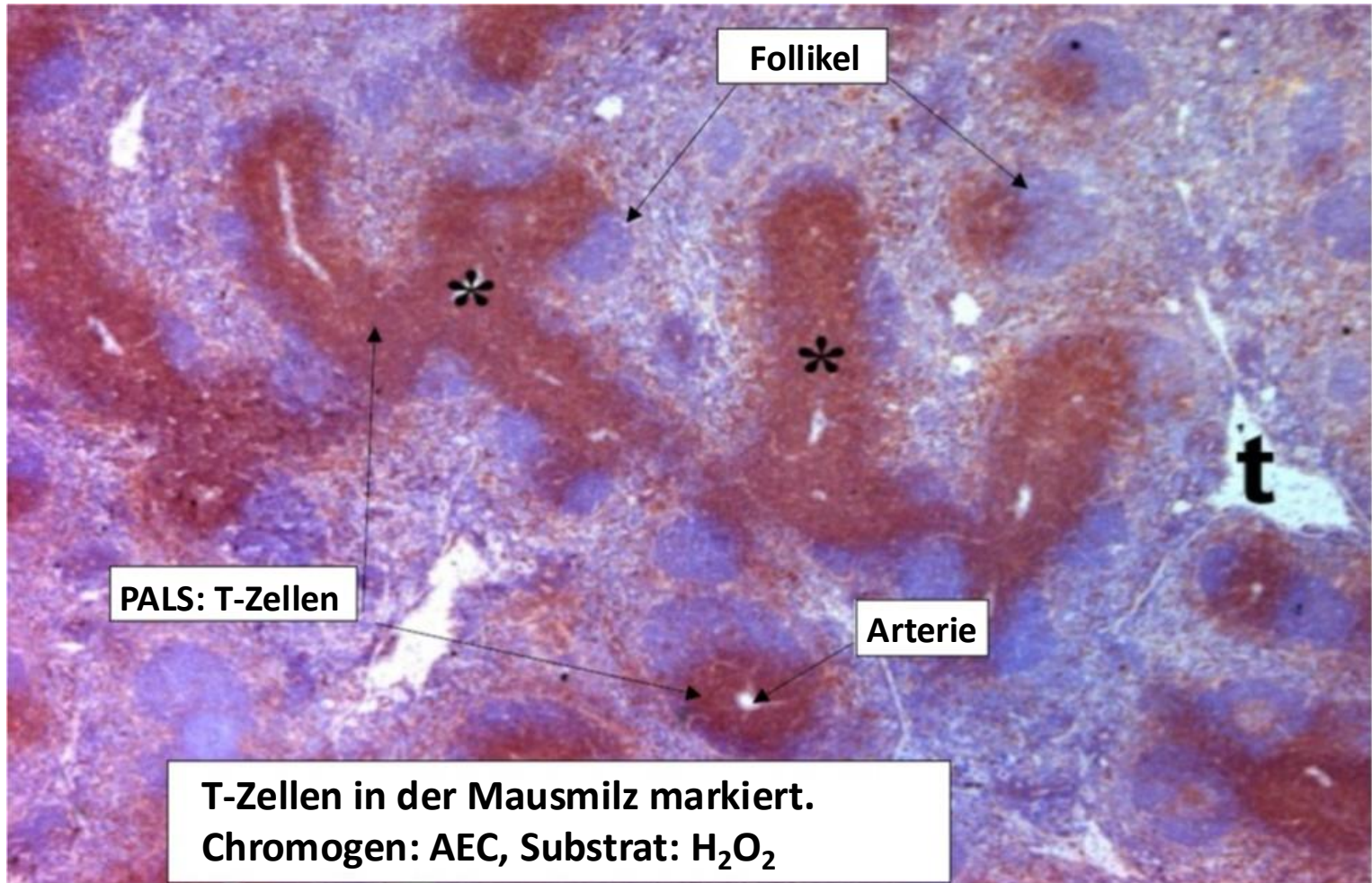


William E. Moerner

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%