

# Diagnostische Techniken

- Makroskopie
- (Licht)Mikroskopie
  - Übersichts-, Spezialfärbungen
  - Enzymhistochemie
  - Immunhistochemie
- Elektronenmikroskopie
- Durchflußzytometrie
- Molekularbiologie
  - Proteinnachweis: Western Blot
  - DNA-, RNA Quantifizierung
  - Mutationsanalyse

# Makroskopie

## ● Veränderungen der

- Form
- Begrenzung
- Größe
- Gewicht
- Oberfläche, Struktur
- Farbe
- Konsistenz

# Asservierung von Gewebe und Zellen I

## ● Fixierung

- 4%iges Formalin (gesättigte Lsg. von Formaldehyd in H<sub>2</sub>O ca. 40%ig), pH 7.5, Phosphatpuffer, Eindringtiefe 1mm/h
  - geeignet für:
    - Konventionelle gefärbte Schnitte
    - Immunhistochemie, ISH
    - Gewinnung niedrigmolekularer DNA, RNA
- Alkohol
  - Zytologische Präparate, ISH
  - Gewinnung niedrigmolekularer DNA, RNA
- 2%iges Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
  - Elektronenmikroskopie

# Asservierung von Gewebe und Zellen II

## ❶ Keine Fixierung – Einfrieren

- Eis: Enzymnachweis
- -20°C:
  - Gefrierschnitte, Enzymnachweis
- -70°C/Flüssigstickstoff:
  - hochmolekulare DNA, RNA
- Flüssigstickstoff-gekühltes 2-methylbutan
  - Immunhistochemie, hochmolekulare DNA, RNA

## ❷ Speziallösungen:

- Guanidiniumthiocyanid (GTC)
- RNAlater etc.



# Einbettungs- und Schneideverfahren

## ● Konventionell:

- Wasserentzug durch „aufsteigende Alkoholreihe
- Xylol/Toluol
- Paraffinwachs
- Mikrotomschnitte: 4-6µm
- Warmes Wasserbad: „Strecken“

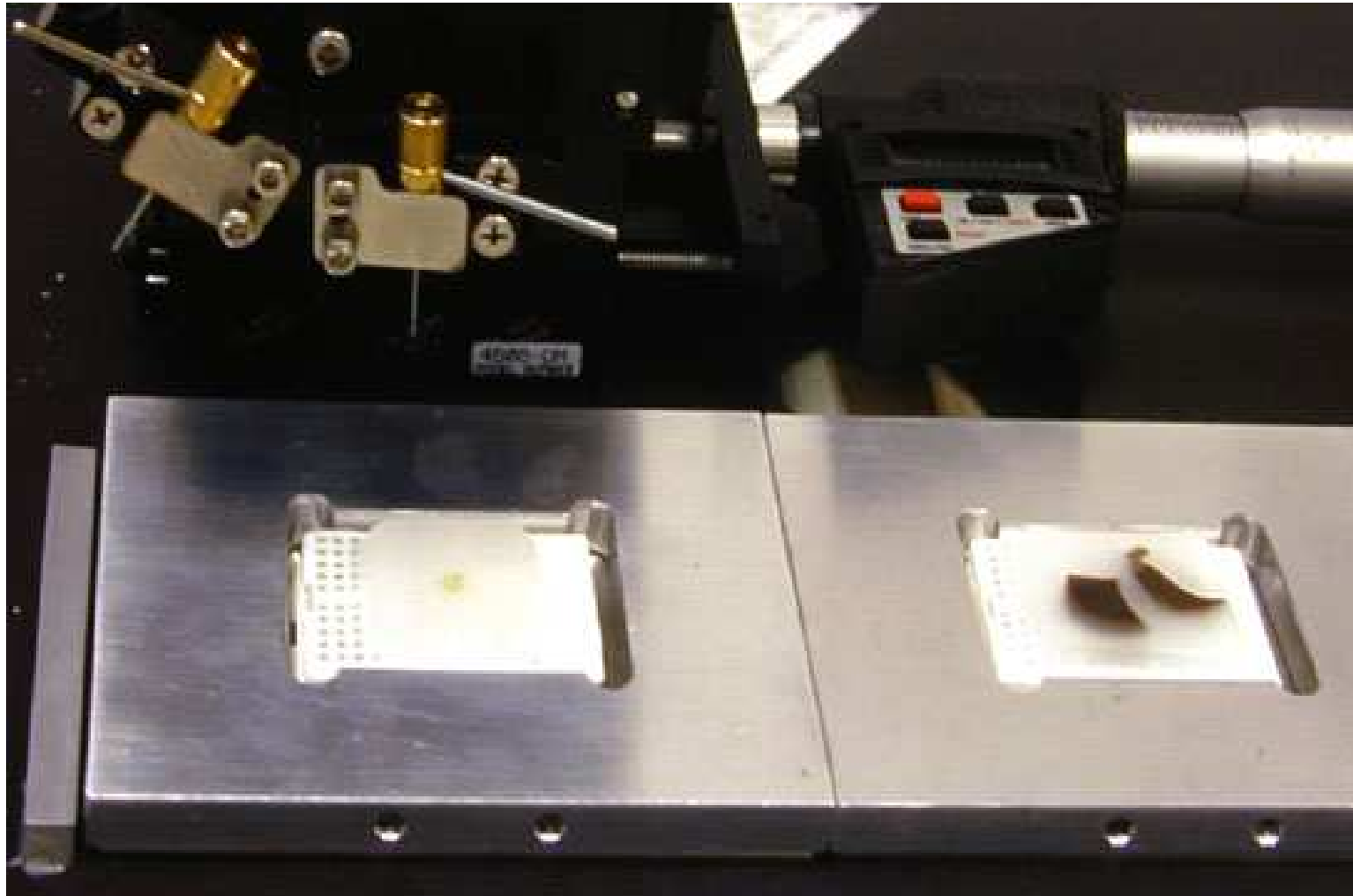
## ● Entkalkung: Säure, EDTA

## ● Polyacrylamid-Einbettung



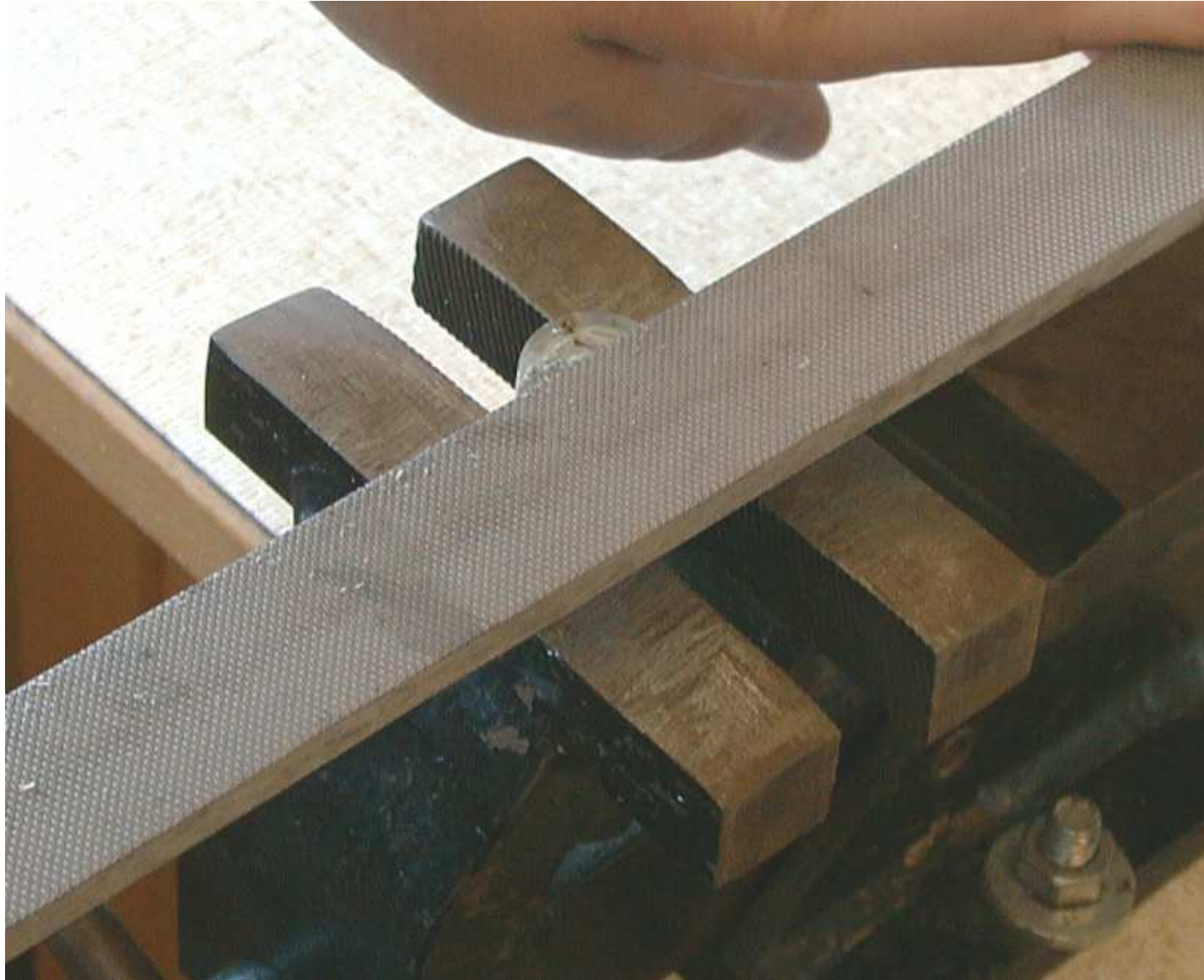


# Gewebearray





# Acrylatblock



3.11.14

# Immunhistochemie

## ● Lokalisation von Epitopen

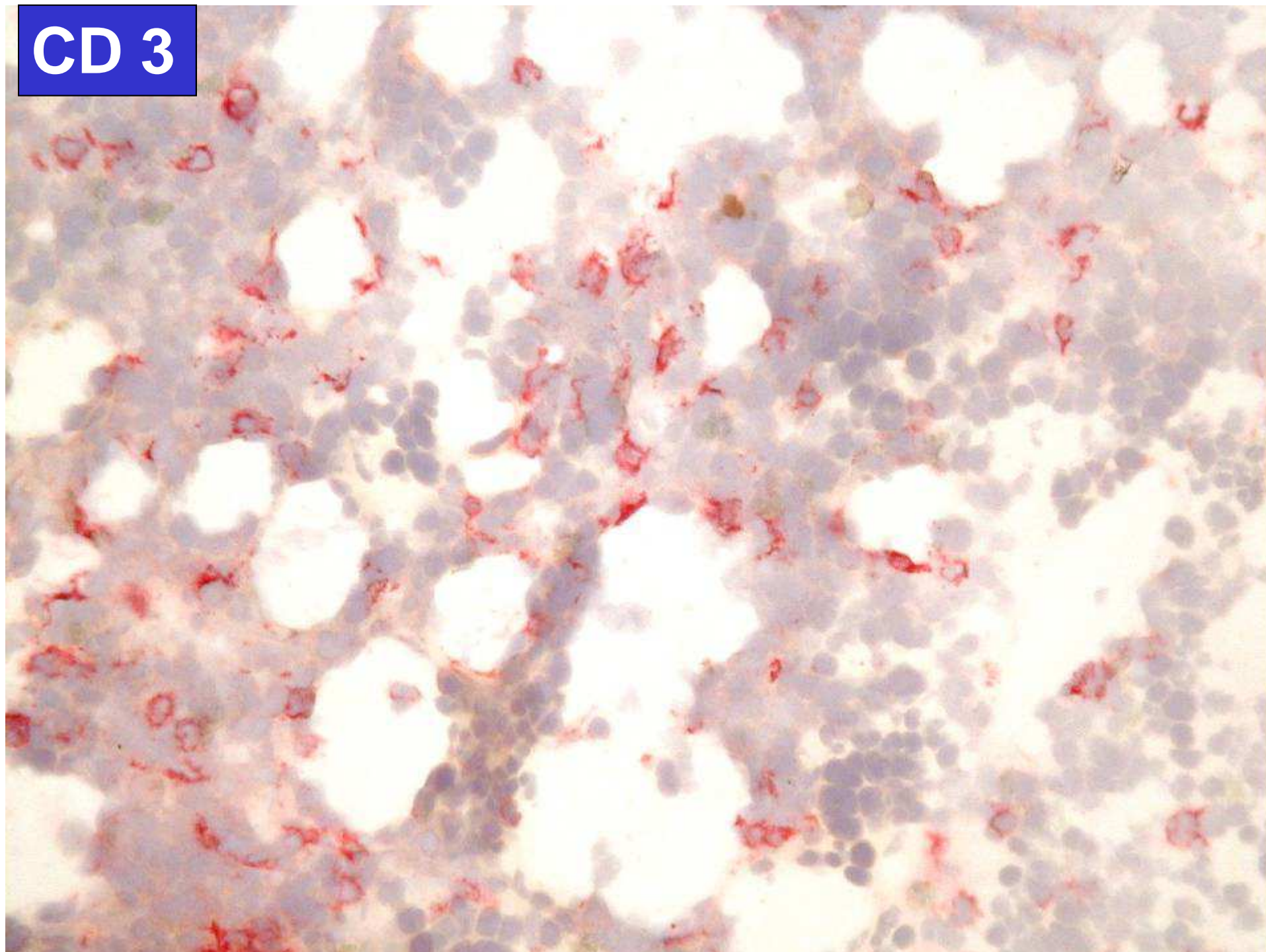
- Zellbestandteile
- Zytoskelett
- Zelladhäsionsmoleküle
- Hormone
- Rezeptoren
- Erreger

## ● Phänotypisierung von Tumoren

# Epitope

- Antigene Determinanten
- Oftmals art- bzw. individualspezifisch
- Zelltypspezifische Epitope
  - Sehr selten
- CD3: Ausnahme
  - T-Zell Rezeptor assoziierter Proteinkomplex (4 Peptidketten) – spezifisch für T-Lymphozyten
- Expressionsunterschiede zur Identifizierung von Zelltypen

CD 3

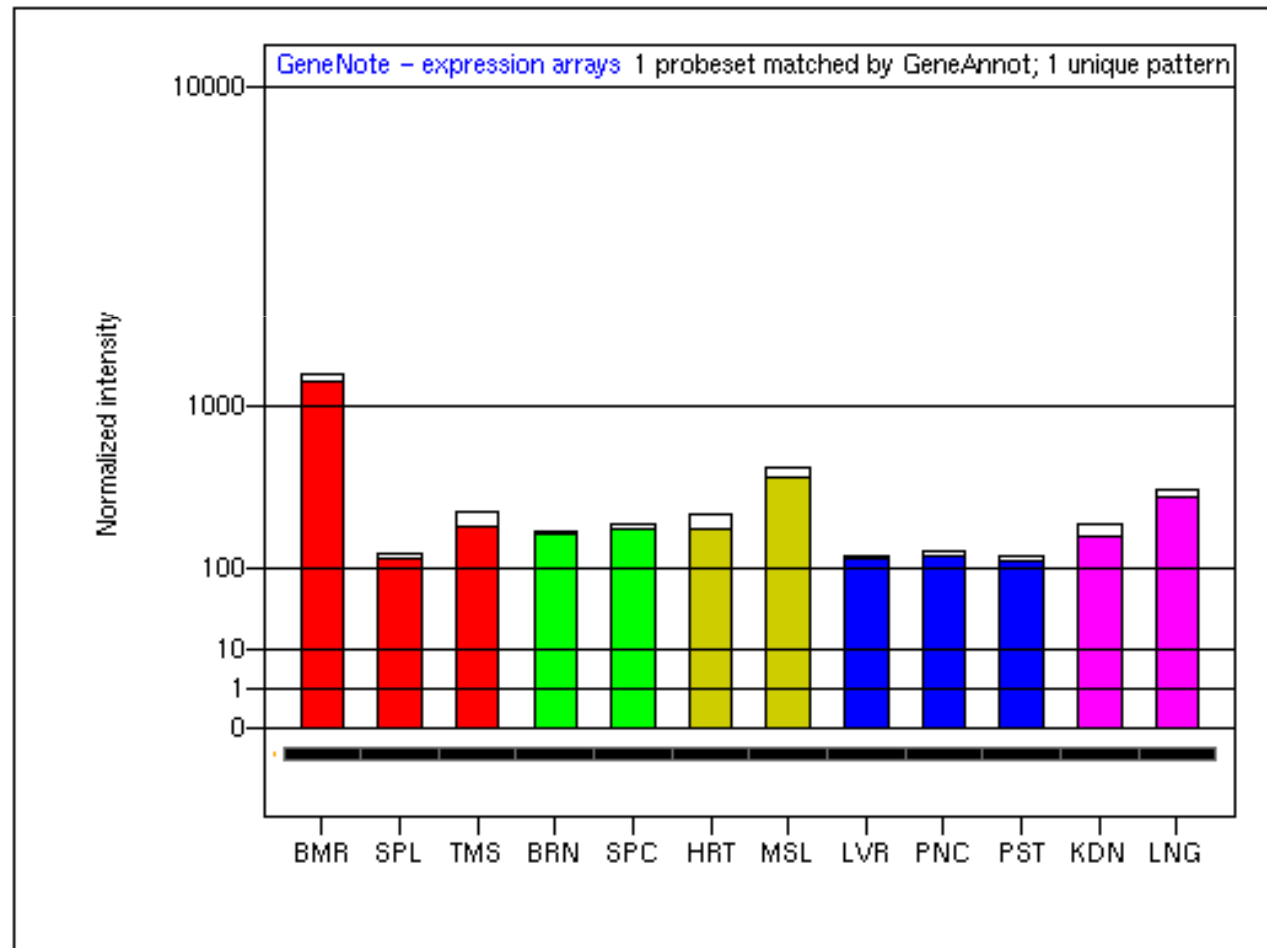


# CD71

## Transferrin Rezeptor

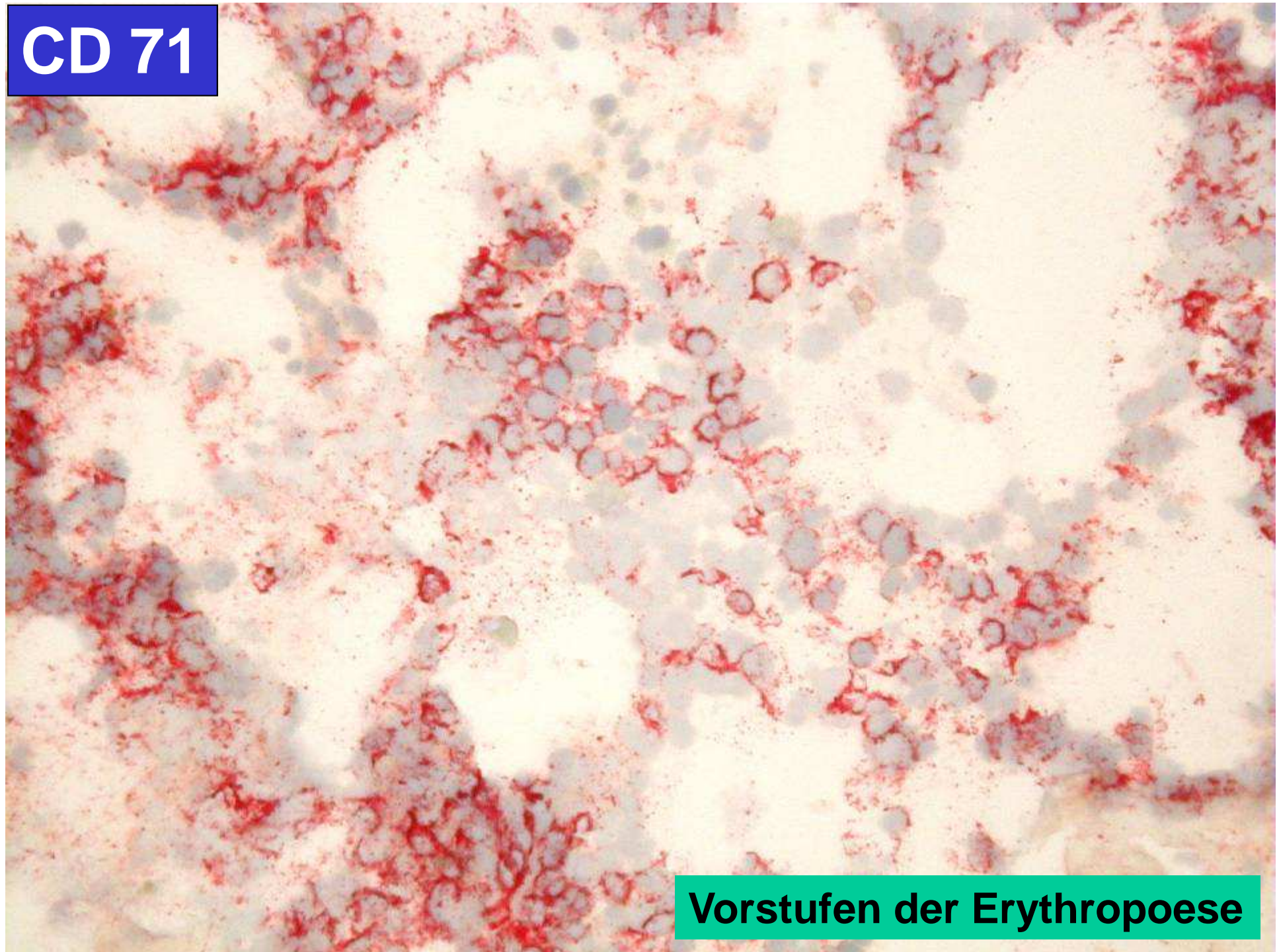
Zahlreich an der  
Zellmembran  
eisenverwendender  
Zellen

## mRNA Expression - Verteilungsmuster





**CD 71**

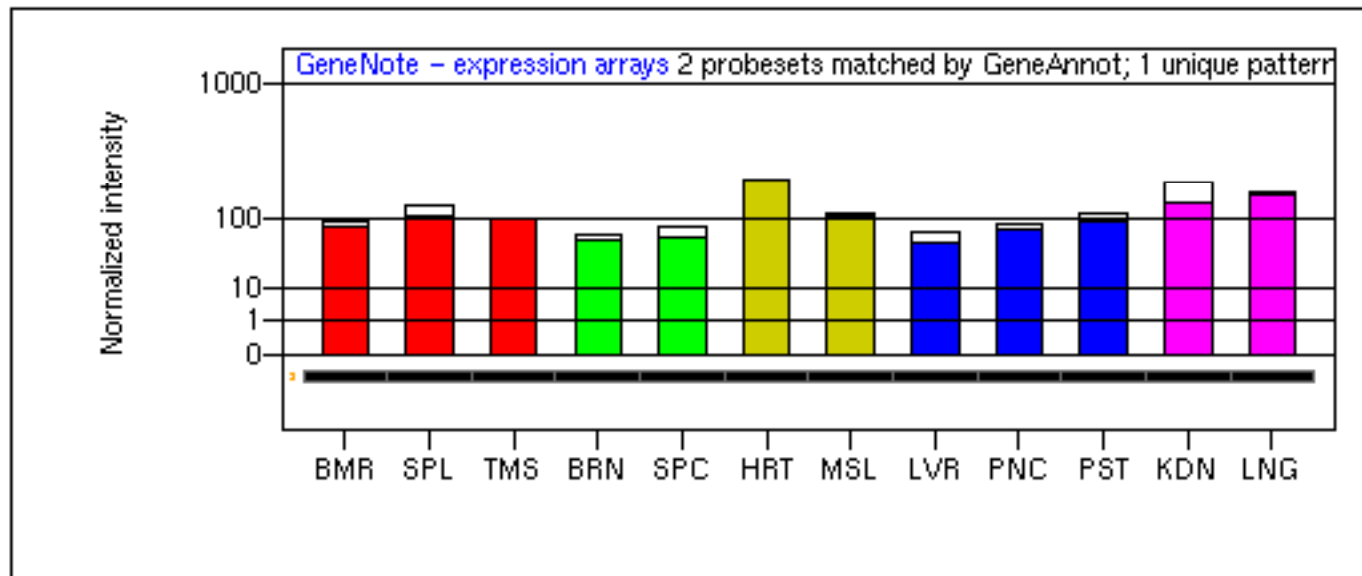


**Vorstufen der Erythropoese**

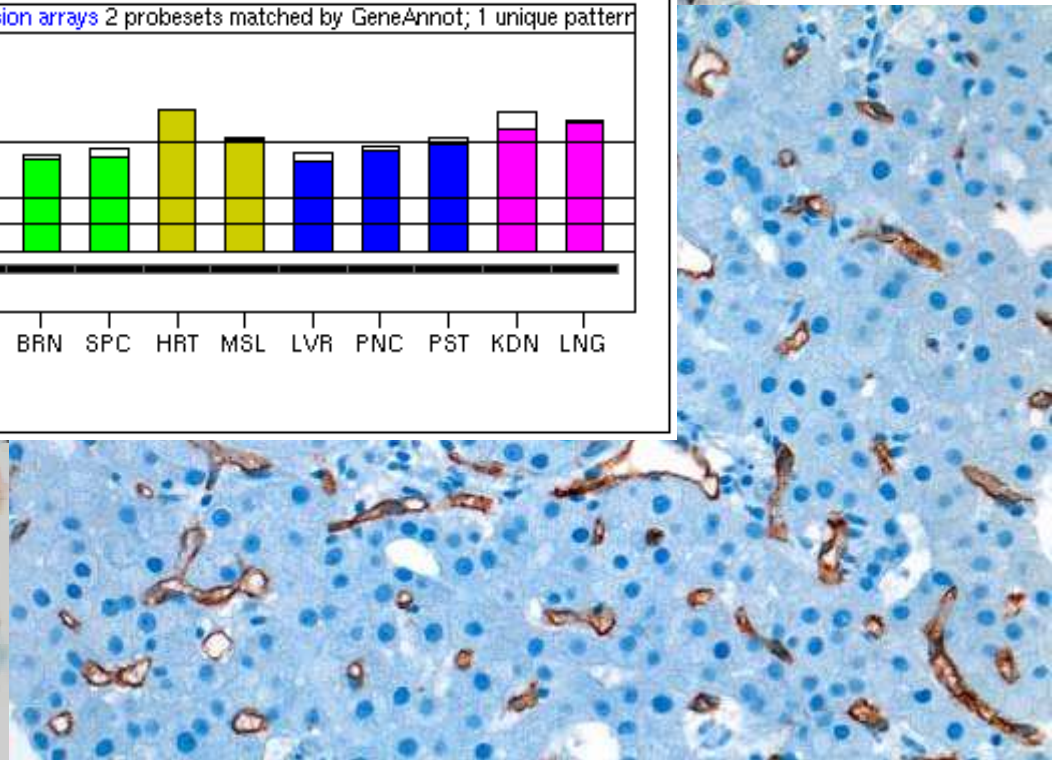
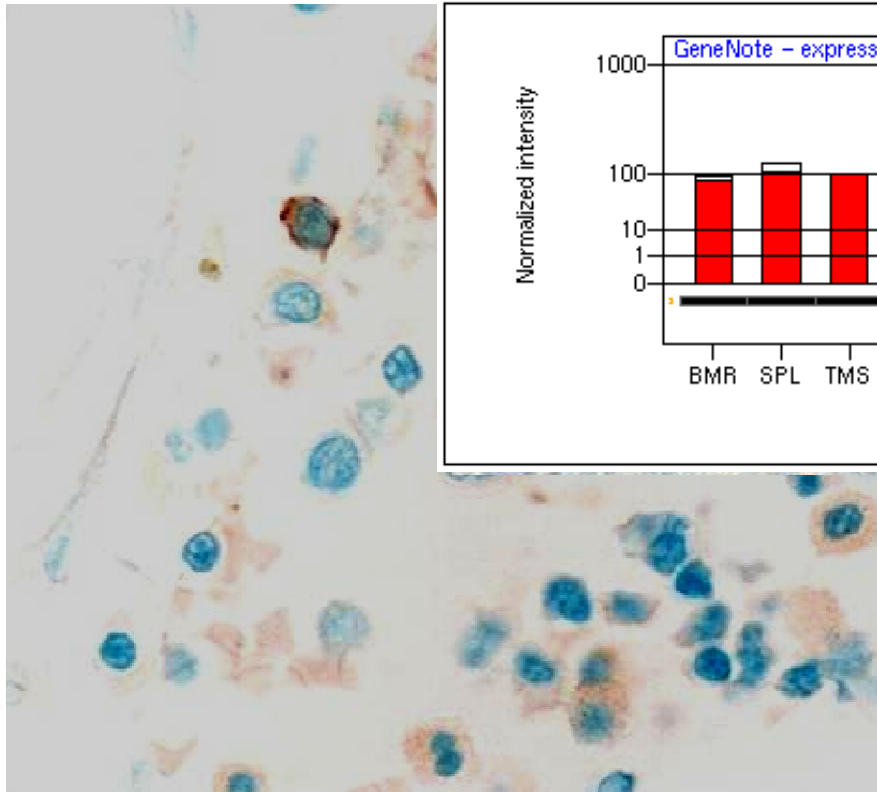
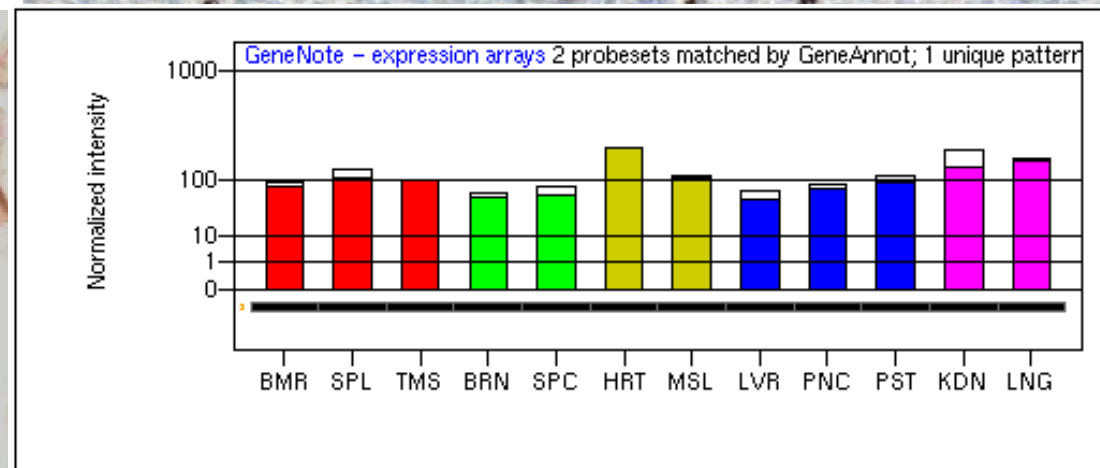
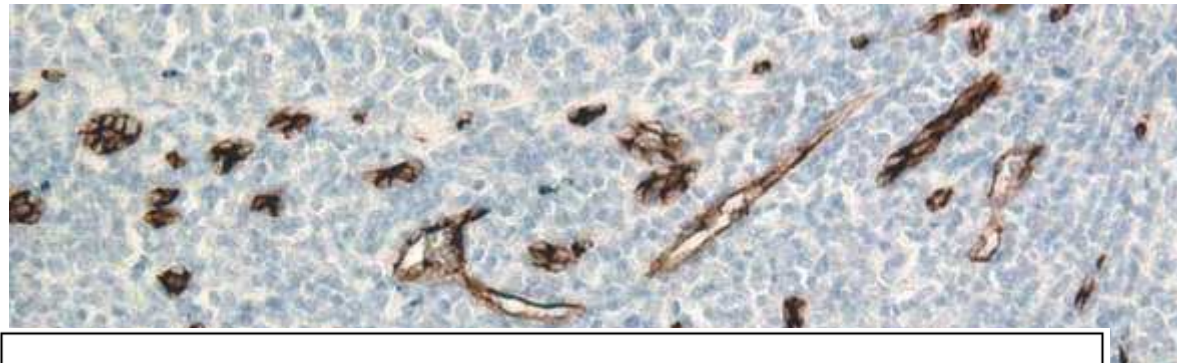


# CD34

- Marker für hämatopoetische Vorstufen



# CD34



# Welcher Antikörper?

## ● Gute Quellen?

- Kataloge
- Internet
- Firmenvertreter
- Mundpropaganda

## ● Aussagen über Verwendbarkeit zu unterschiedlichen Zwecken

- Immunoblot, Gefriermaterial, Paraffinmaterial etc.

## ● Oft nur sehr bedingt zu verwenden



## Estrogen Receptor (beta)

### Clone EMR02

1 mL Lyophilized NCL-ER-beta **P (HIER) W**

Estrogen Receptor alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) are the translated products of separate genes located on different chromosomes. Although both isoforms share a high degree of amino acid homology, the role of the conserved domains demonstrate specific functions. The A/B region, D domain and F domains are notably distinct in sequence. ER $\alpha$  is the highly characterized estrogen receptor cloned originally from a human breast cancer cell line with ER $\beta$  more recently identified in rodents and now in humans. ER $\beta$  is reported to be expressed as multiple isoforms. ER $\beta$ , unlike ER $\alpha$ , is widely expressed being found in normal adult tissues of ovary, fallopian tube, lung, kidney, brain, heart, prostate and testis.

## Ets-1 Oncoprotein

### Clone 1G11

1 mL, 0.1 mL Lyophilized NCL-ETS-1 **F P (HIER) W**

The proto-oncogene c-Ets-1 is a transcription factor known to regulate expression of a number of genes involved in extracellular matrix remodelling. The processes of tumor invasion and metastasis are thought to depend on the increased proteolytic activity of the invading tumor cells which may involve matrix metalloproteinases, cathepsins B and D and plasminogen activator in the metastatic cascade. Ets-1 interacts with the urokinase-type plasminogen activator gene enhancer and with the promoters of stromelysin-1 (MMP3) and collagenase-1 (MMP1) gene which may implicate it in this process. Ets-1 is reported to be absent from normal gastric epithelium, but is expressed in approximately 60 percent of gastric carcinomas and oral squamous cell carcinomas. In situ hybridisation studies have reported Ets-1 mRNA to be absent from normal colon mucosa but positive in endothelial cells of stromal capillaries and stromal fibroblasts, often with increased expression in fibroblasts adjacent to neoplastic cells.

## Estrogen Receptor

### Clone 6F11

2 mL Lyophilized NCL-ER-6F11/2 **F P (HIER) W C**

1 mL, 0.1 mL Lyophilized NCL-ER-6F11 **F P (HIER) W C**

2 mL Liquid NCL-L-ER-6F11/2 **F P (HIER) W C**

1 mL Liquid NCL-L-ER-6F11 **F P (HIER) W C**

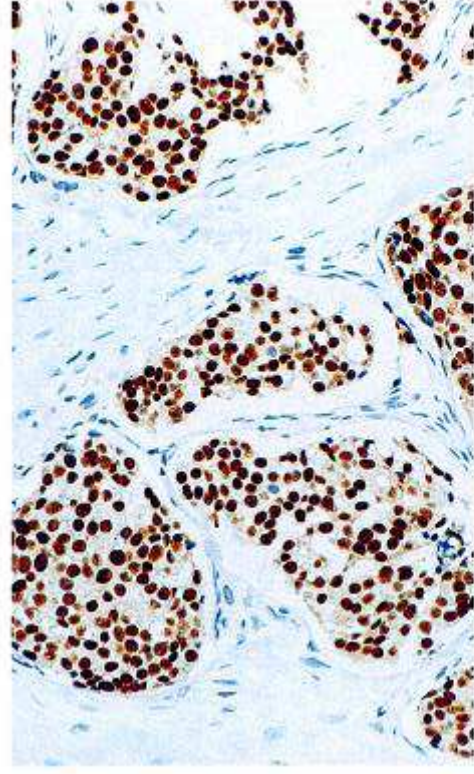
7 mL ready-to-use RTU-ER-6F11 **F P (HIER) W**

7 mL Bond ready-to-use PA0151 **P (HIER)**

Estrogen receptor (ER) content of breast cancer tissue is an important parameter in the prediction of prognosis and response to endocrine therapy. Traditionally, ER status has been determined using the dextran coated charcoal (DCC) method, carried out only in specialised centers. The introduction of monoclonal antibodies to ER has allowed the determination of receptor status of breast tumors to be carried out in routine histopathology laboratories. Initially, monoclonal antibodies recognising ER were only effective on frozen material.

### product specific information

Clone 6F11, raised to the full length alpha form of the estrogen receptor molecule. Clone 6F11 has been extensively tested (Bewitt D ) et al. Journal of Pathology, **183** : 228-232 (1997)). NCL-ER-6F11/2 and NCL-L-ER-6F11/2 are more economic options for high volume users of clone 6F11.



Human breast carcinoma: immunohistochemical staining for estrogen receptor using NCL-ER-6F11. Note intense nuclear staining of tumor cells. Paraffin section.

# Polyklonale vs. monoklonale Antikörper

## ● Vorteile

- Erkennen mehrere Epitope
- Weniger anfällig auf Fixierungsunterschiede, pH
- Meist billiger

## ● Nachteile

- Häufiger unspezifische Reaktionen
- Begrenzte Reproduzierbarkeit
- Begrenzte Liefermöglichkeit
- Oft nicht aufgereinigt (Gelfiltration), häufiger Hintergrund
- Ascitesflüssigkeit: hoher Anteil an unspezifischen Proteinen

# IHC – Durchführung, Interpretation

- Gewebeasservierung
- Gewebeaufarbeitung
  - Tissue arrays
- IHC Durchführung, Detektionsmethoden
  - Pitfalls, Qualitätskontrollen
  - Geräte, Automatisierung
- Reaktionsmuster
- Spezielle Anwendungen

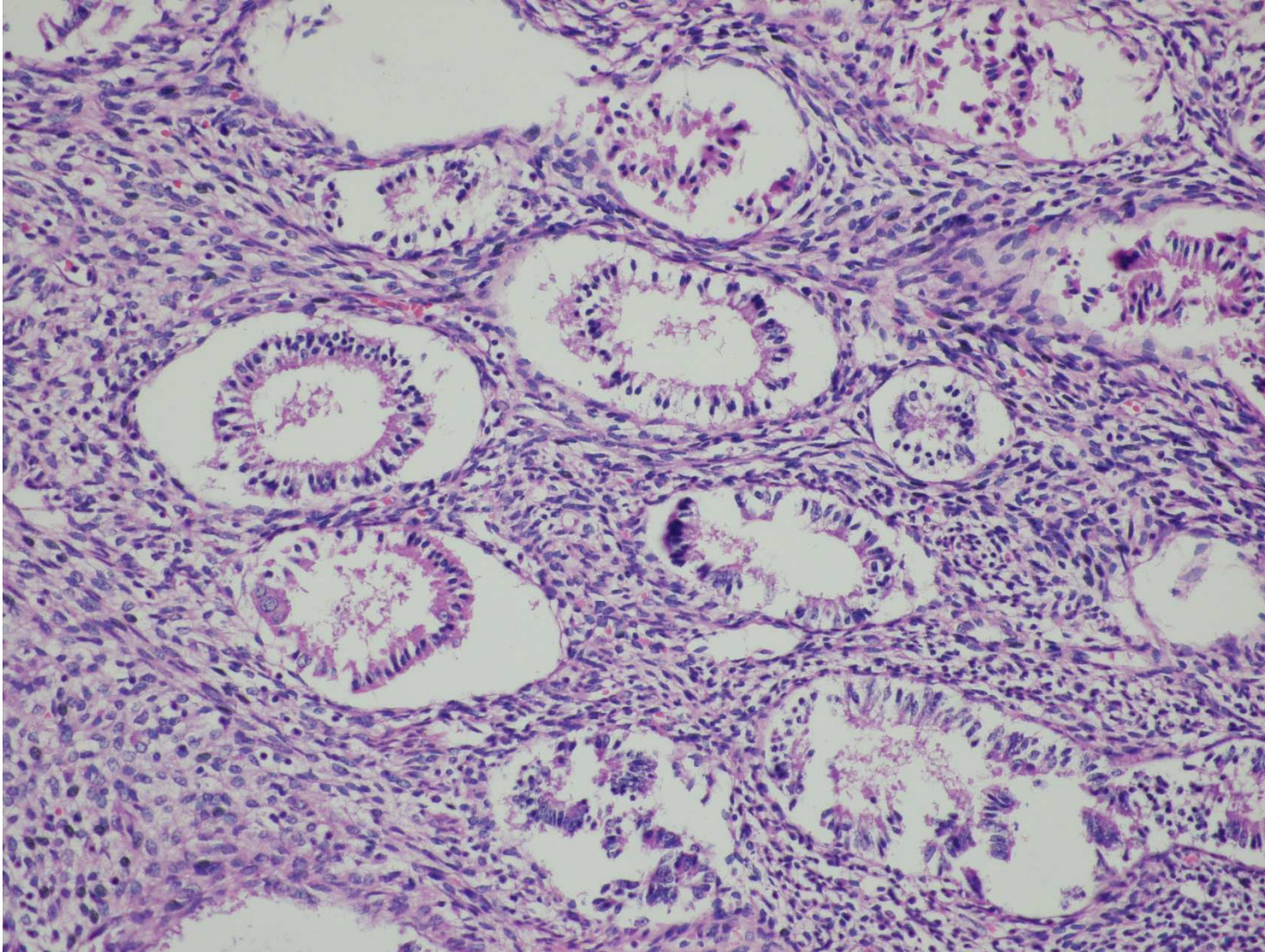


Zu wenig Formalin...





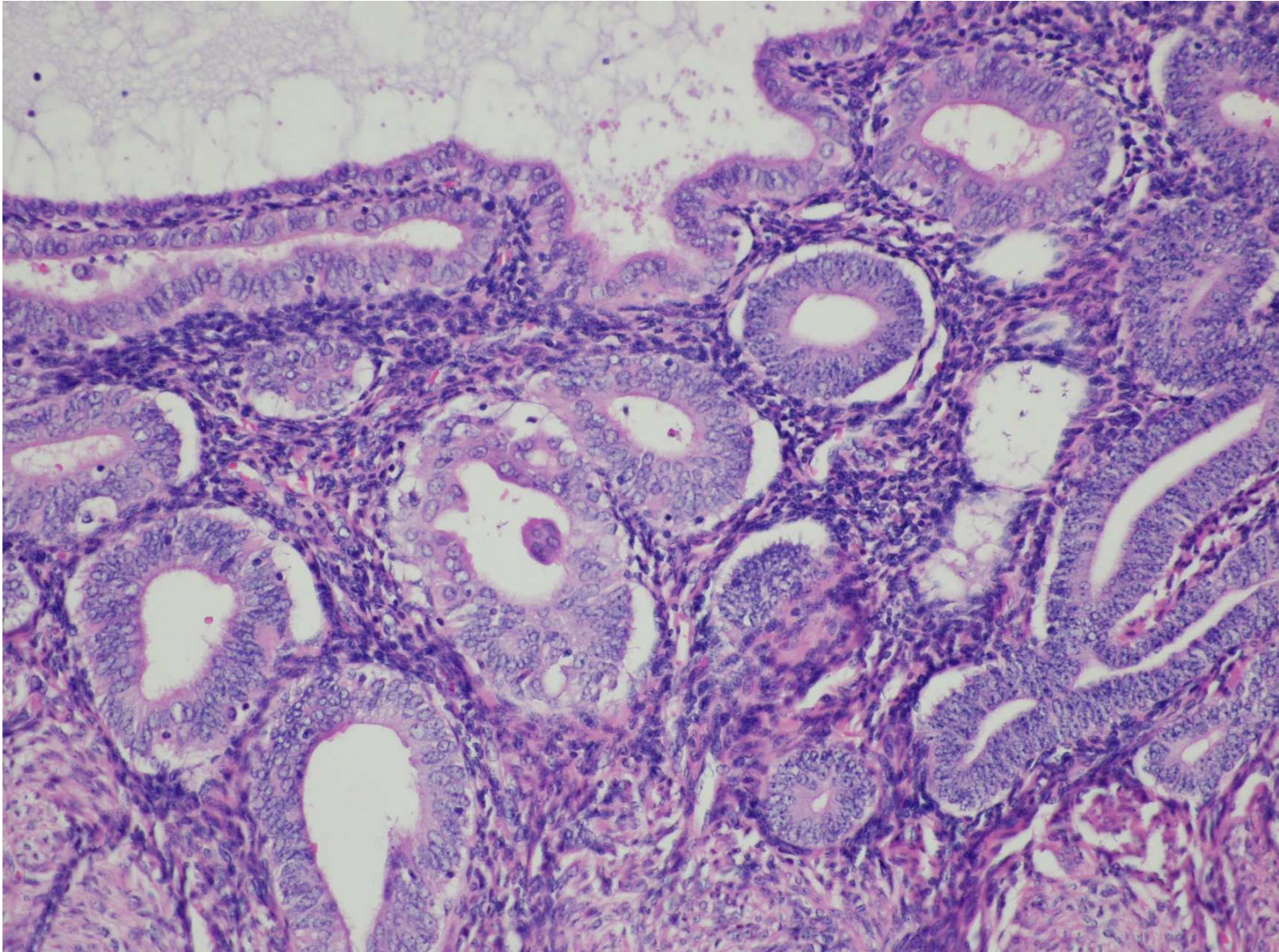
# Resultat:



**Dickdarm-  
schleimhaut**



# Gute Fixierung



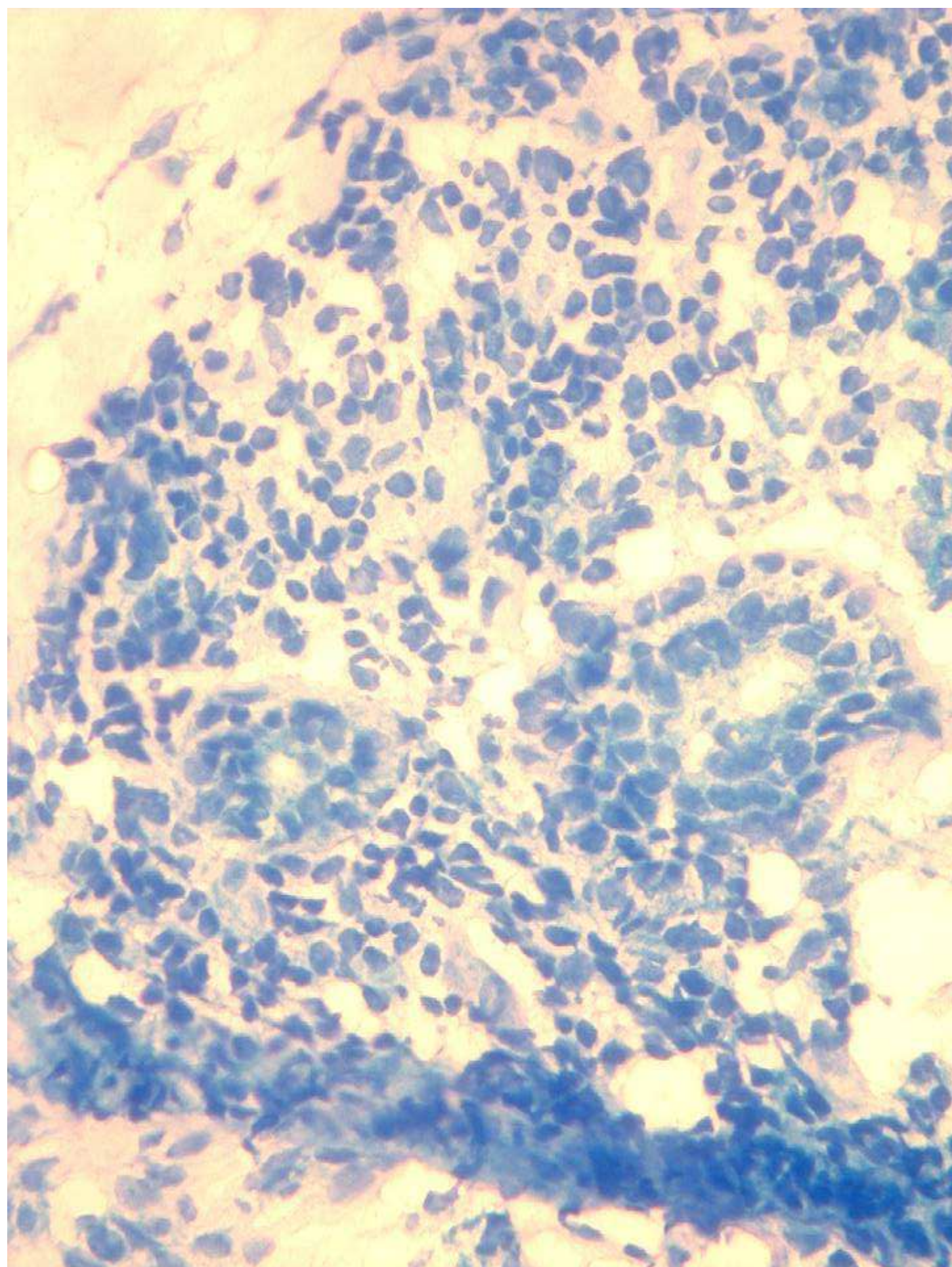
# Gewebeaufarbeitung

- Einer der entscheidenden Schritte der IHC
- Fixierung – Antigen retrieval
- Gefrierschnitte
  - Schlechtere Qualität der Morphologie
  - Höherer Aufwand
  - Teure Aufbewahrung
  - Für einige Epitope trotzdem derzeit die einzige Methode

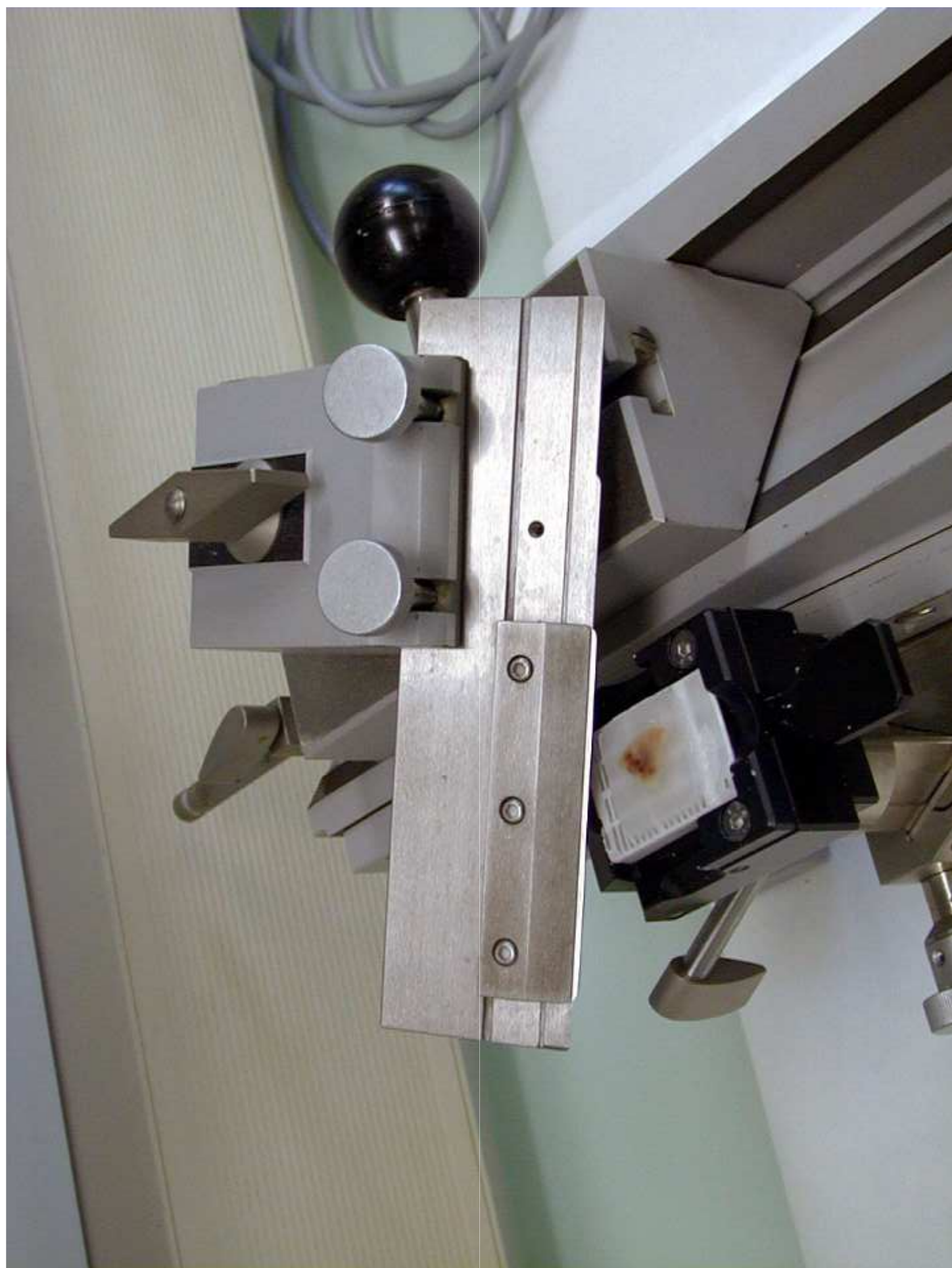


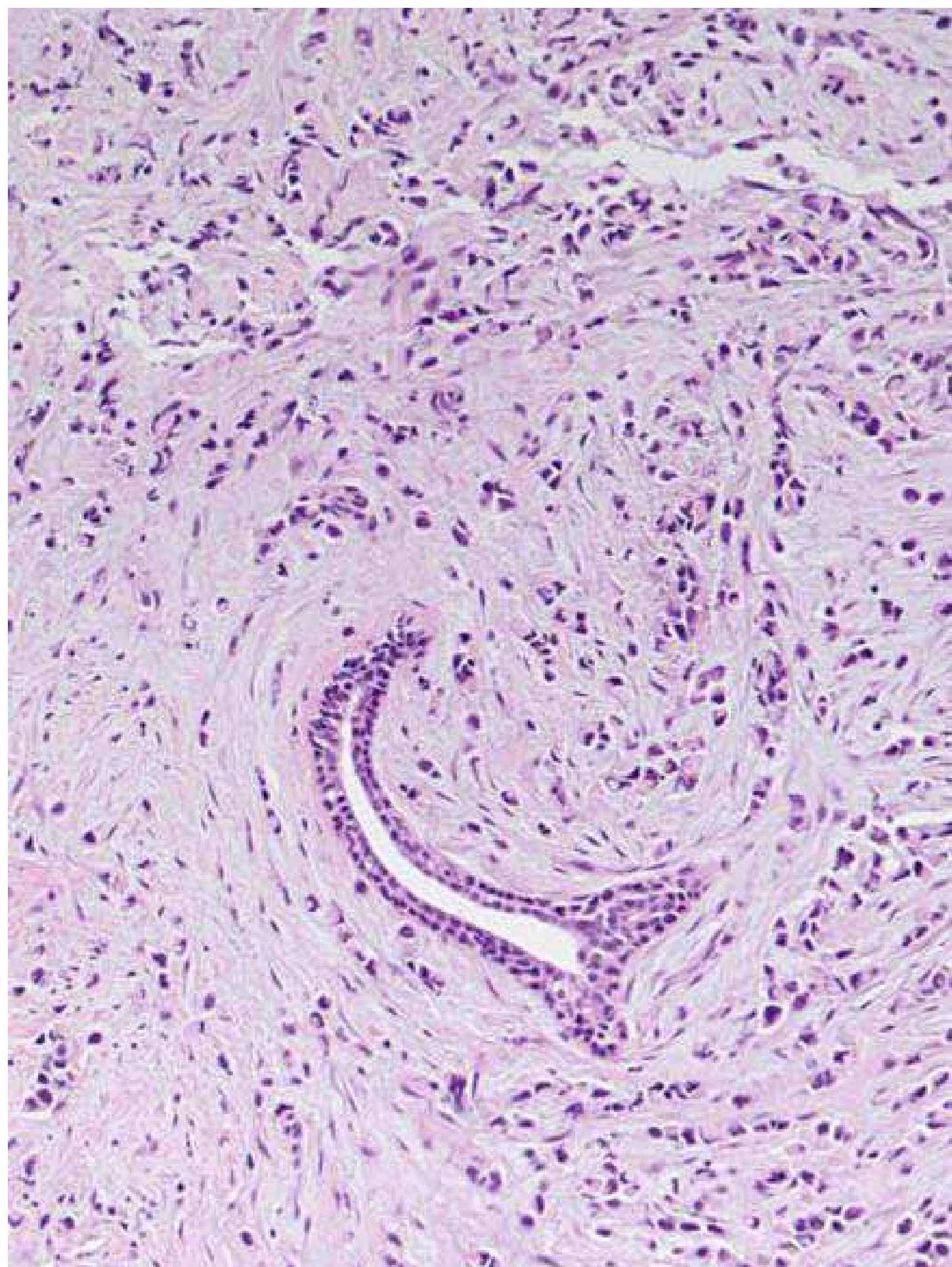














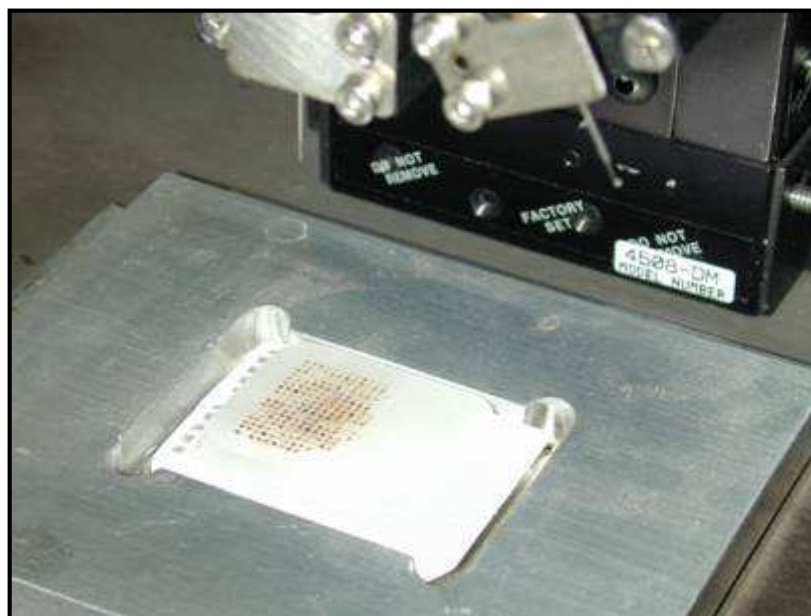
# Gewebe-Mikroarray

## ● Vorteile:

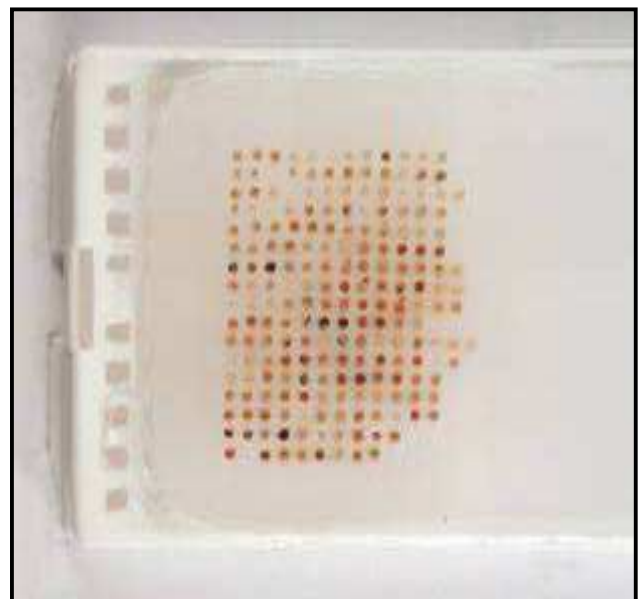
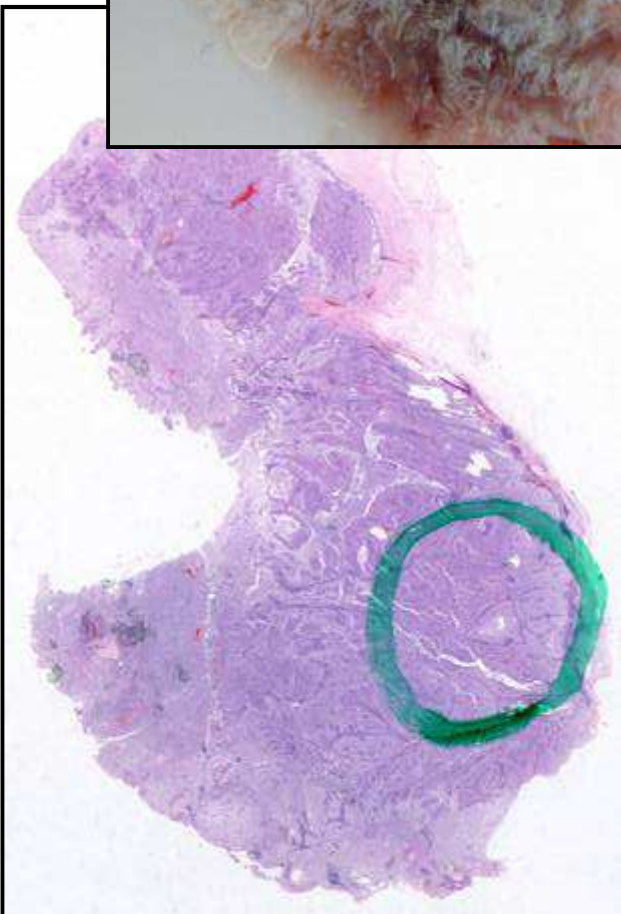
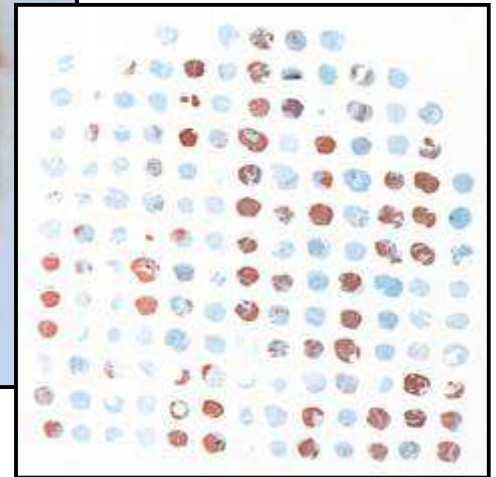
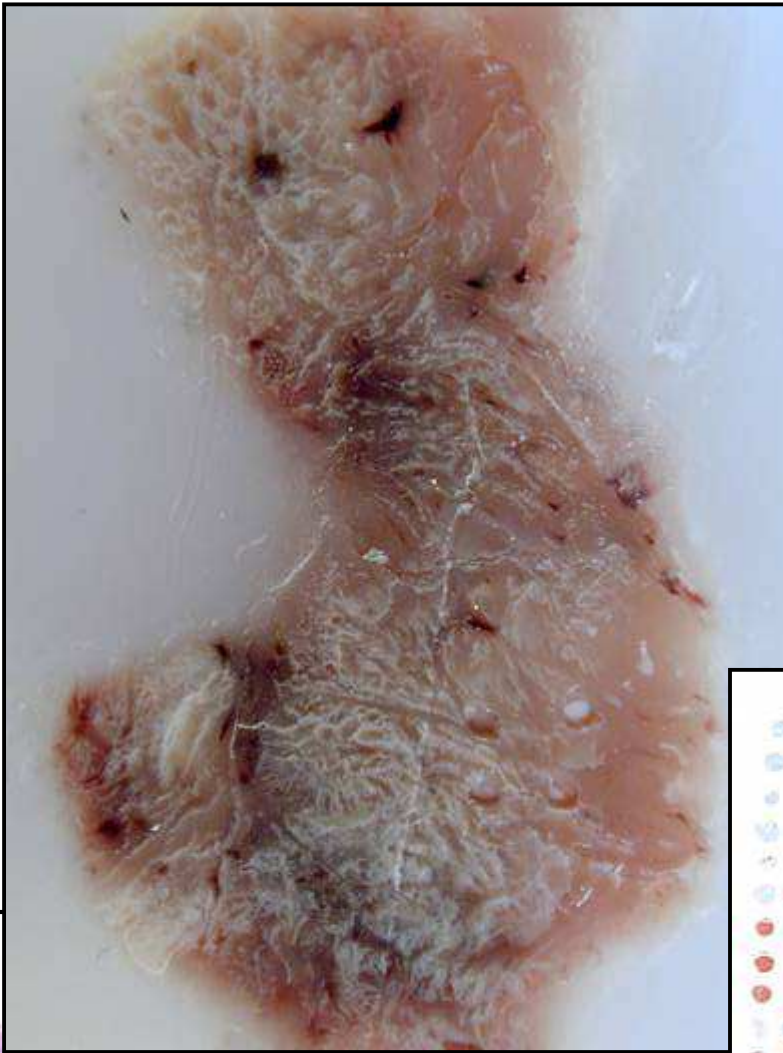
- Mehrere hundert Gewebeproben in einem Paraffinblock
- Gute Vergleichbarkeit in technischer Hinsicht
- Geringere Kosten für IHC

## ● Nachteile:

- Hoher Aufwand in der Herstellung
- Wesentlich kleinerer Gewebsausschnitt zur Beurteilung









# Antigen Demaskierung (antigen retrieval)

## ● Hitzeverfahren

- Mikrowelle: 20-30min
- Druckkochtopf
  - Citratpuffer pH 6.0
  - TRIS-EDTA pH 9.0

## ● Proteolytischer Verdau

- Proteinase K, Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Pronase etc.

## ● Kombinationsverfahren

## ● Hexenzauber



# IHC Durchführung

- Blockieren
- AK Bindung
- Waschen
- Visualisierung der Immunreaktion

# Visualisierung der AG-AK Reaktion

- Enzym – Farbstoffumsetzung

- Peroxidase (1966)
- Alkalische Phosphatase (1978)

- Fluoreszenzfarbstoff

- Kolloidales Gold

- Radioaktive Markierung





Library

**Coons et al 1941** - developed the **fluorescence antibody** technique - they labeled antipneumococcal antibodies with anthracine allowing them to detect both the organism and the antibody in tissue using **UV excited blue fluorescence**

## Manuscript:

Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group

Albert H. Coons, Hugh J. Creech and R. Norman Jones

Department of Bacteriology and Immunology, Harvard Medical School, and the Chemical Laboratory, Harvard University  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47:200-202, 1941

*Albert H. Coons*

# Detektionsmethoden

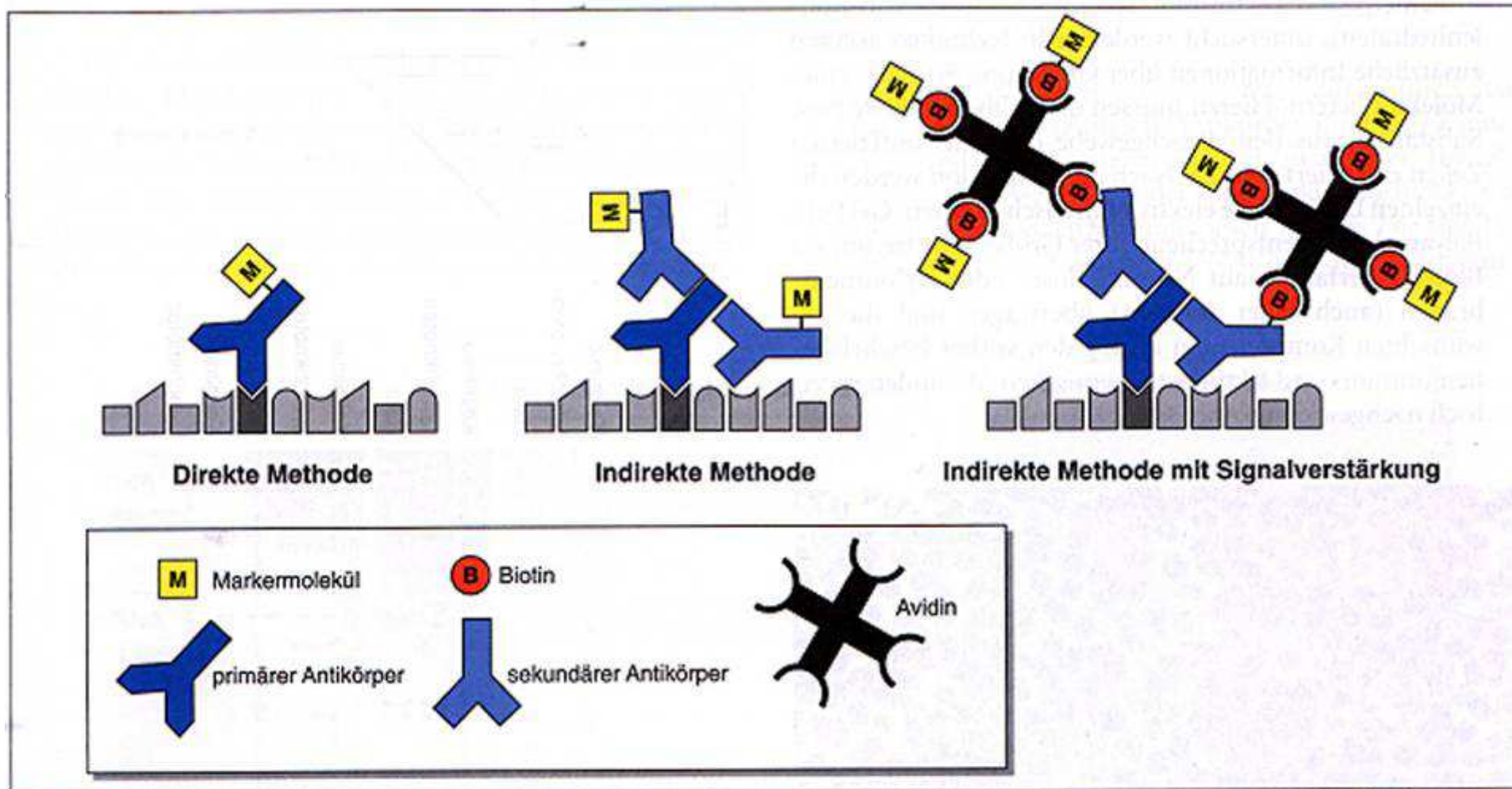


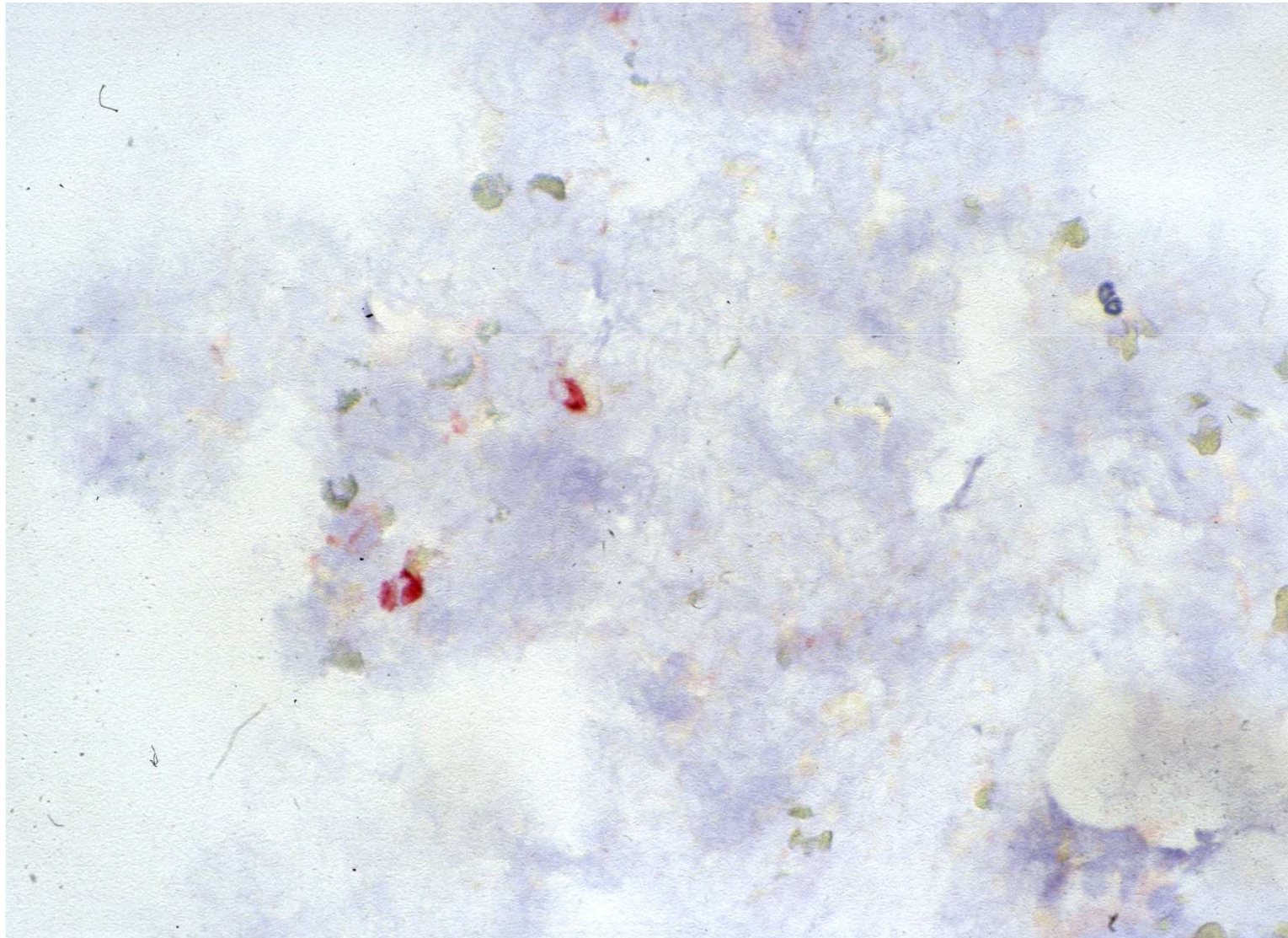
Abb. 1-7 Immunologische Verfahren zur spezifischen Darstellung von Proteinen in Gewebe und Zellen (Immunhistologie) oder in Extrakten (Western-Blot).

# Häufige Fehler

- Fixierung
- Schnittqualität
  - Dicke, Falten etc.
- Unzureichende oder zu aggressive Antigendemaskierung
- Antrocknen während der Immunreaktion
- Zeitdauer der Inkubation
- Unzureichende Hemmung endogener Enzyme
  - Peroxidase, alkalische Phosphatase etc.
- Substratlösungen zu alt



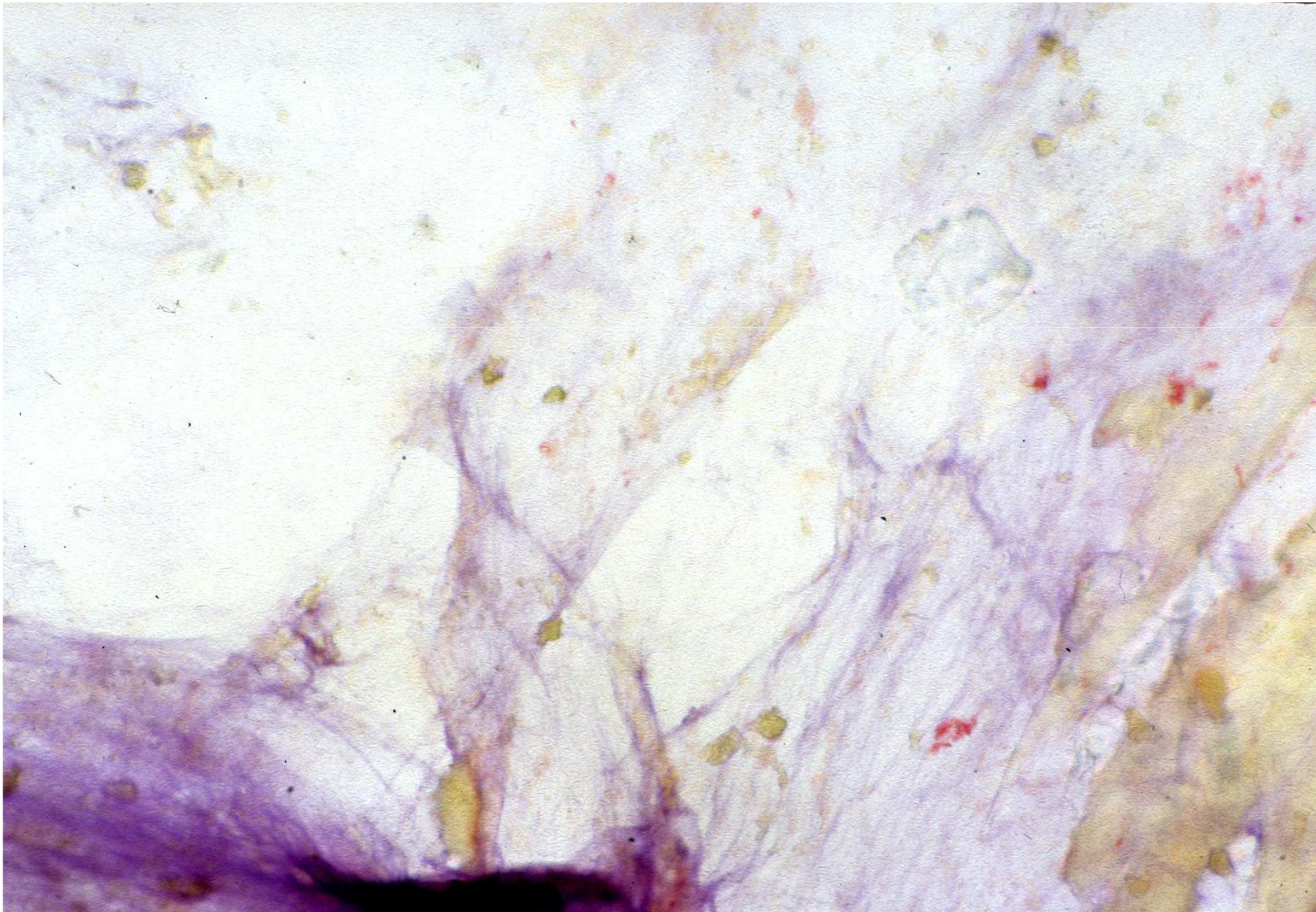
# Unzureichende Fixierung



**Knochenmark  
IG Leichtkette  
kappa**

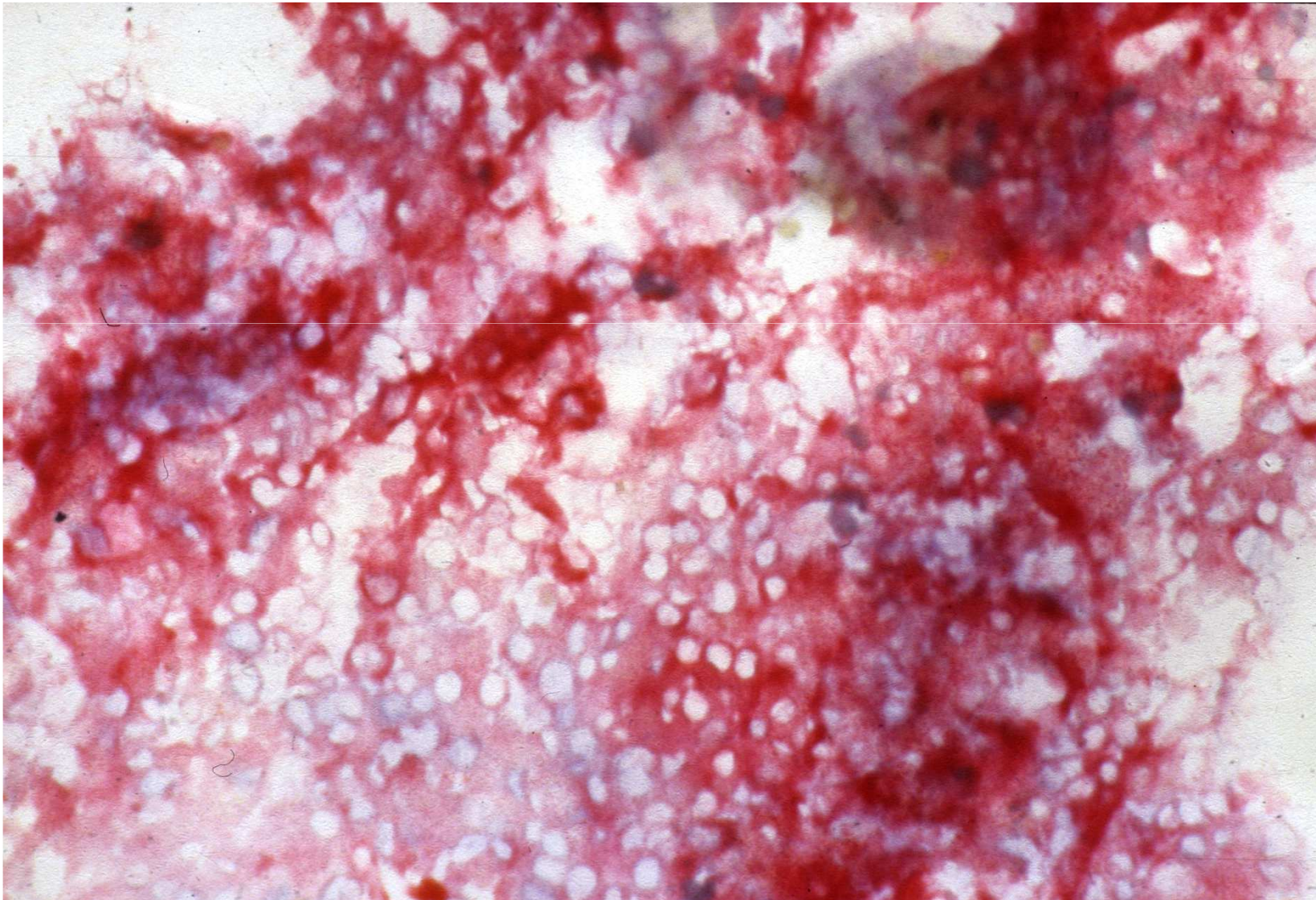


## Zu intensive Mikrowellenbehandlung





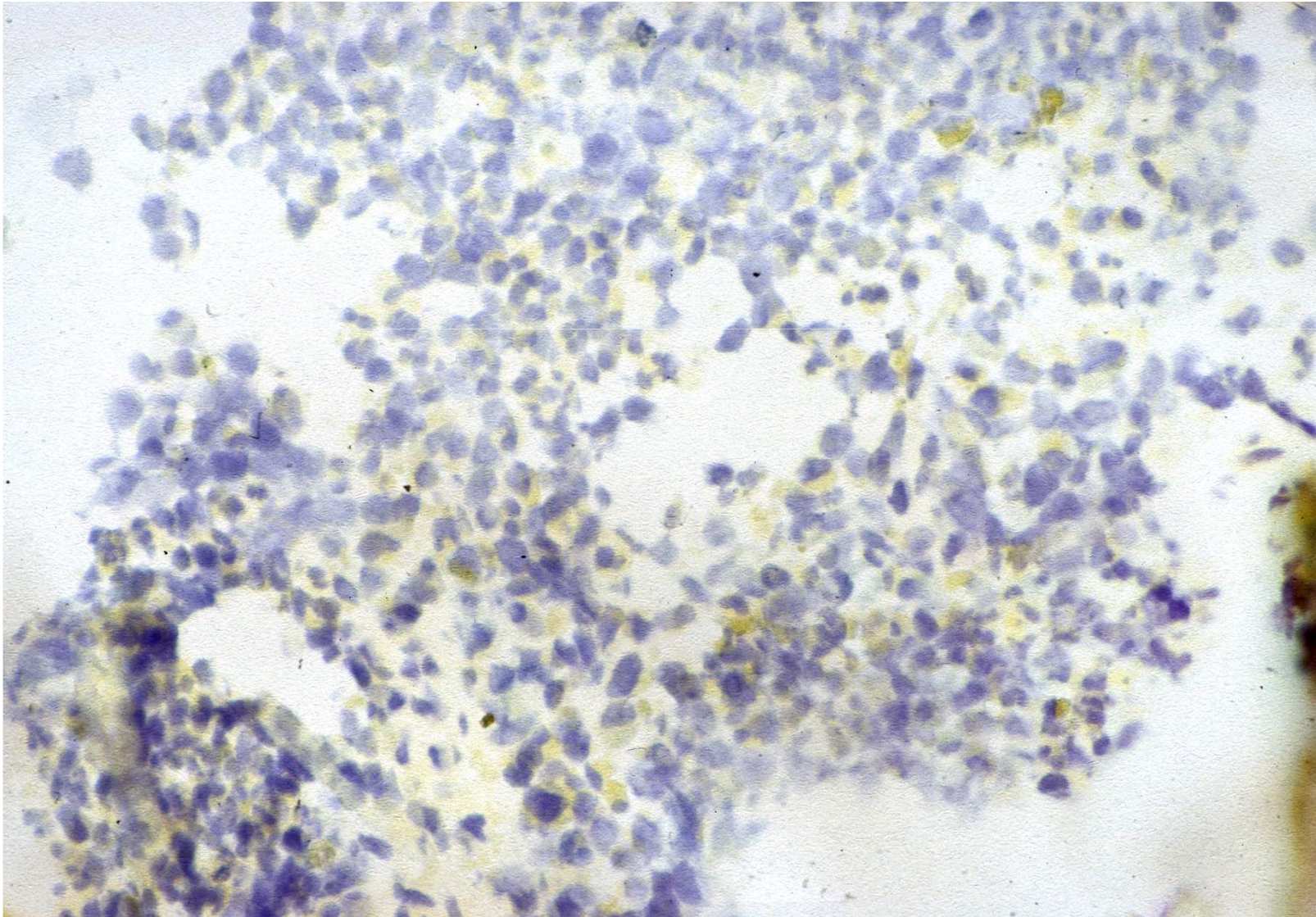
## Unzureichende Enzymhemmung (APAAP)



**Knochen-  
mark**



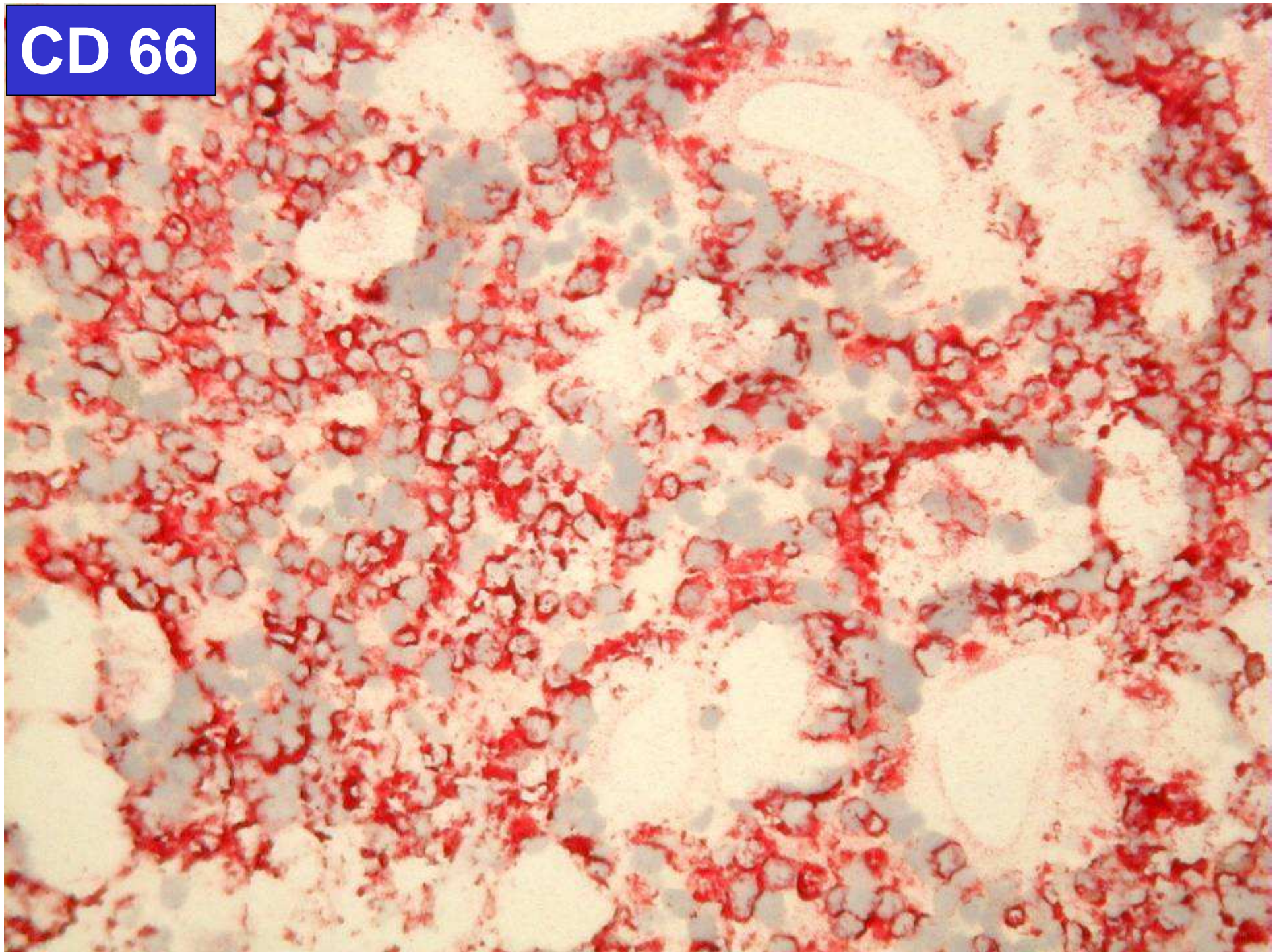
# Substrat zu alt



**Knochen-  
mark**



**CD 66**



# Automatisierung

## ● Vorteile

- Hoher Durchsatz
- Arbeitersparnis
- Konstante Qualität
- Exaktes Einhalten der Inkubationszeiten
- Reproduzierbarkeit
- Horizontal vs. vertikal

## ● Nachteile

- Kosten
- Keine “individuelle” Behandlung von Schnittpräparaten und Antikörpern
- Kein manueller Stopp der Farbreaktion





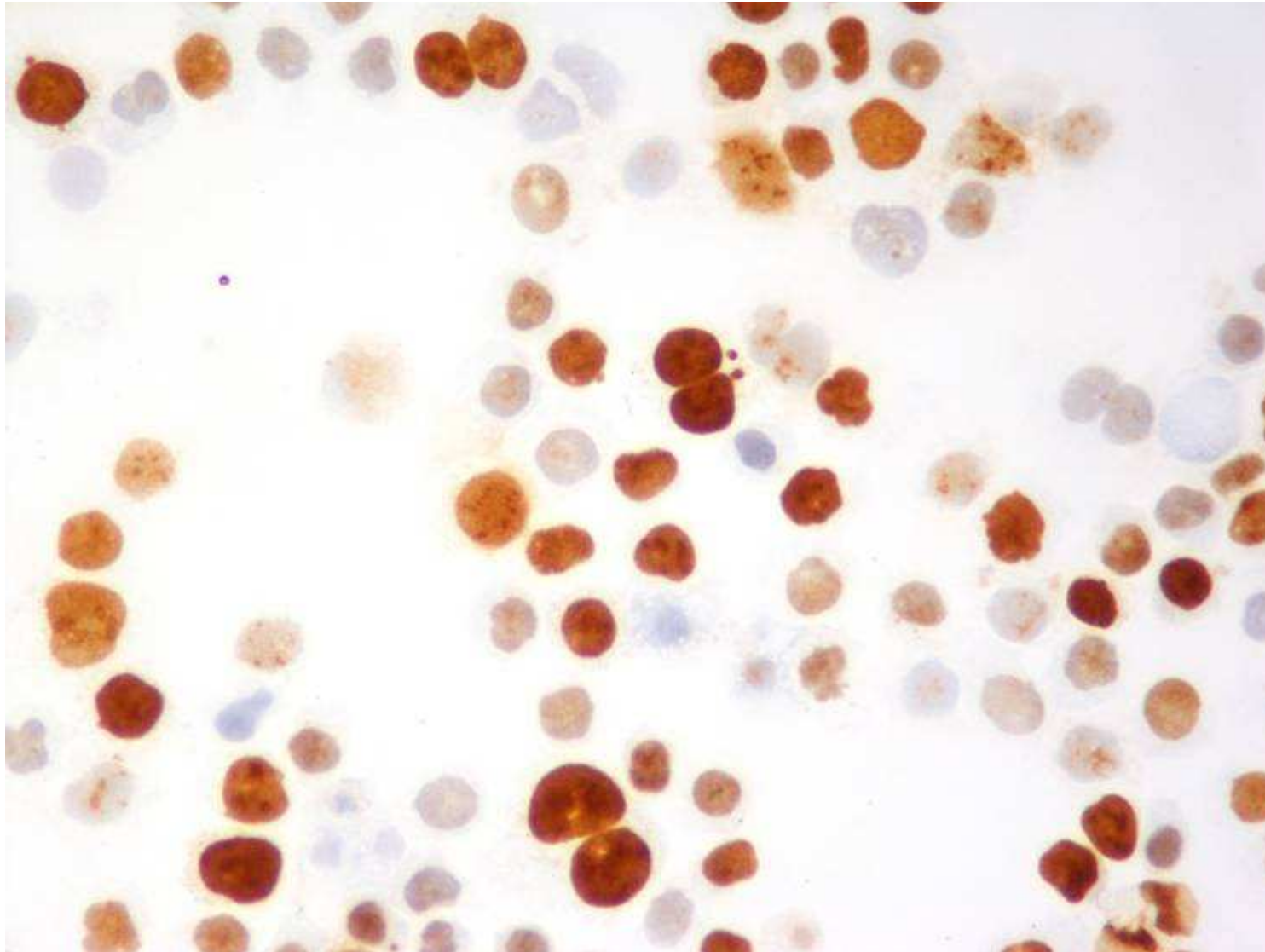




# Reaktionsmuster

- Nukleär
- Zytoplasmatisch
- Membranständig
- Golgi
- Endoplasmatisches Retikulum
- Kombinationen

# Nukleäres Reaktionsmuster

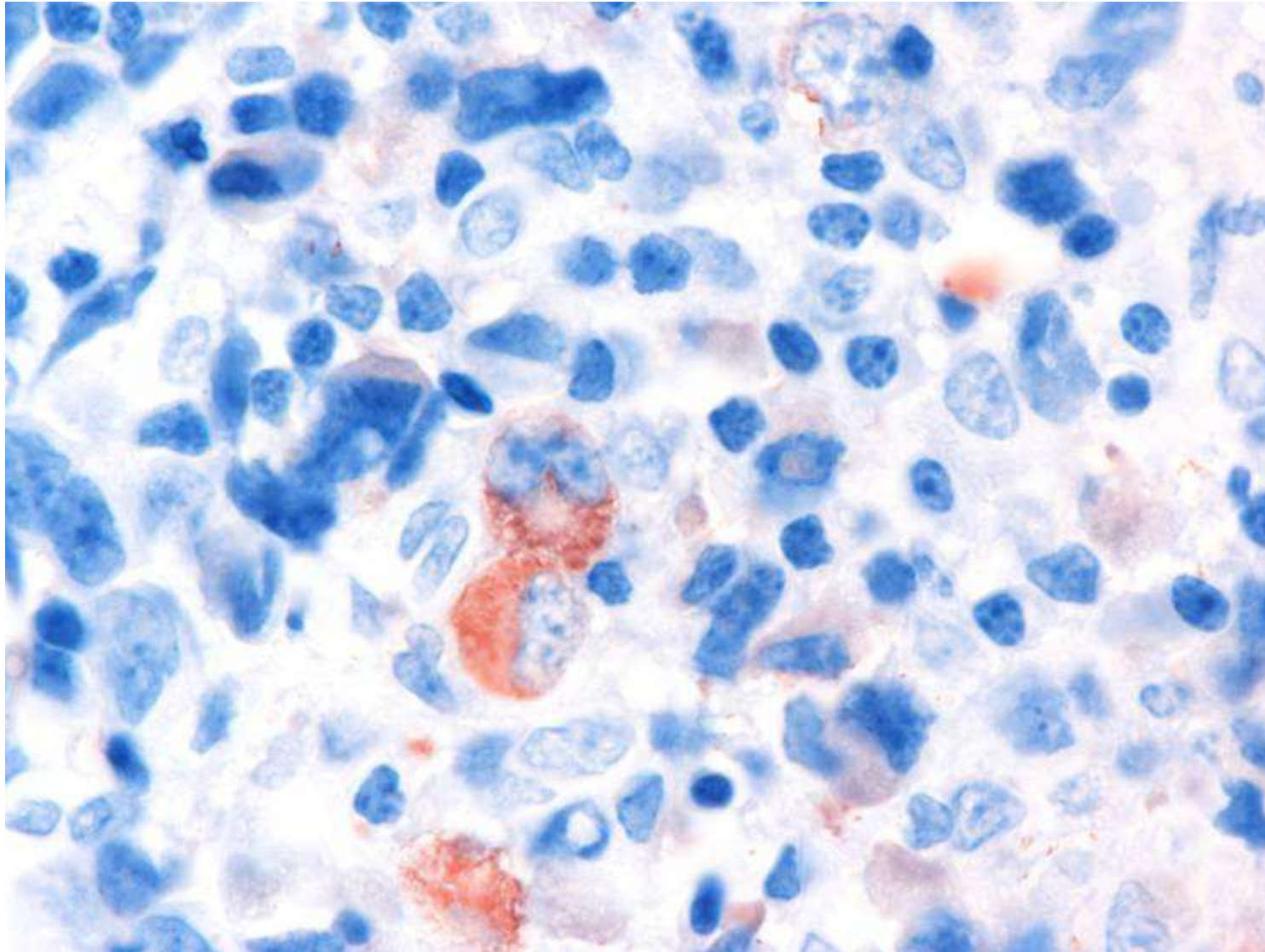


**Ki-67 (MIB-1)**

**Proliferation**



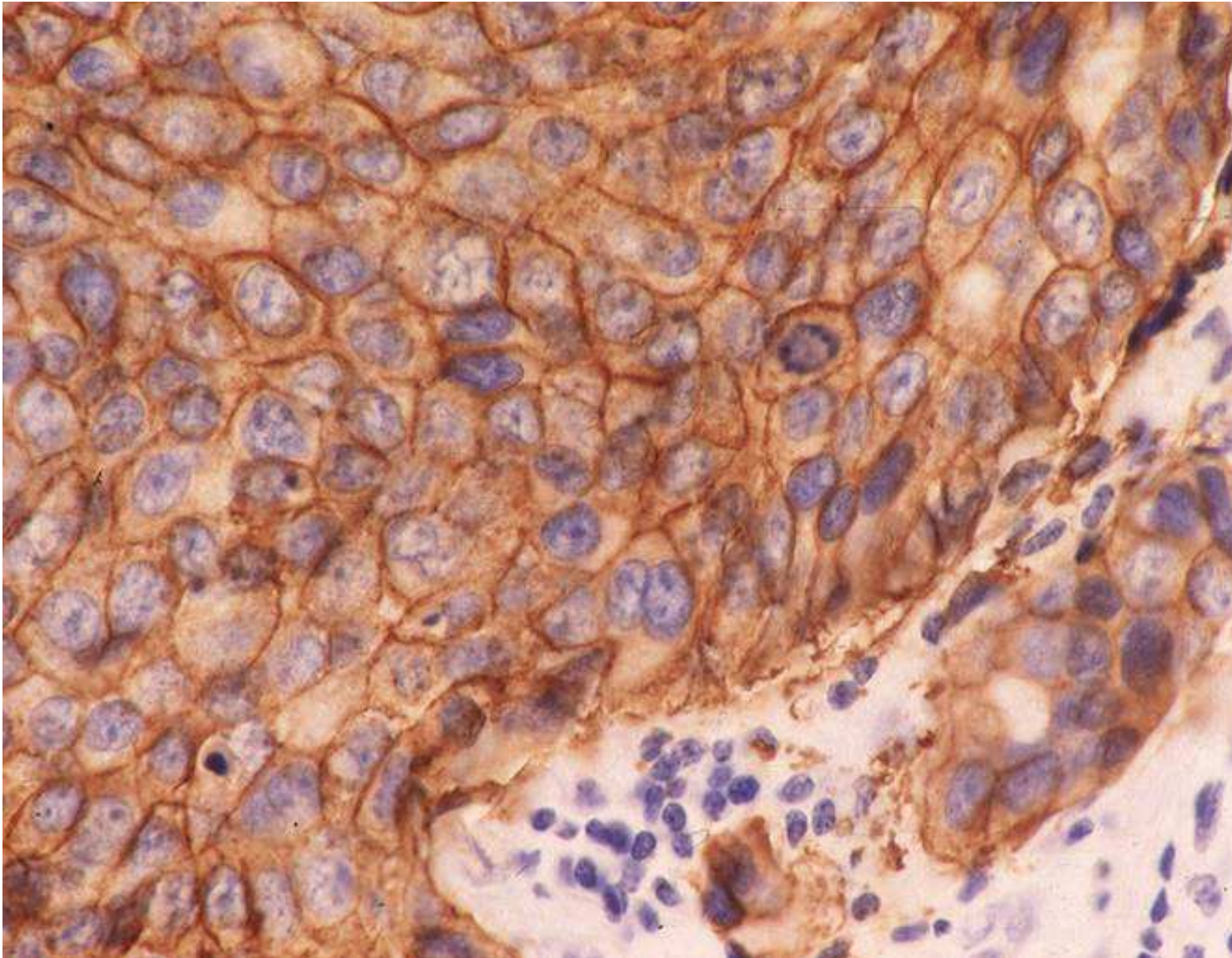
# Endoplasmatisches Retikulum



**RPS6K**

**Ribosomal  
protein S6  
kinase**

# Membranständig

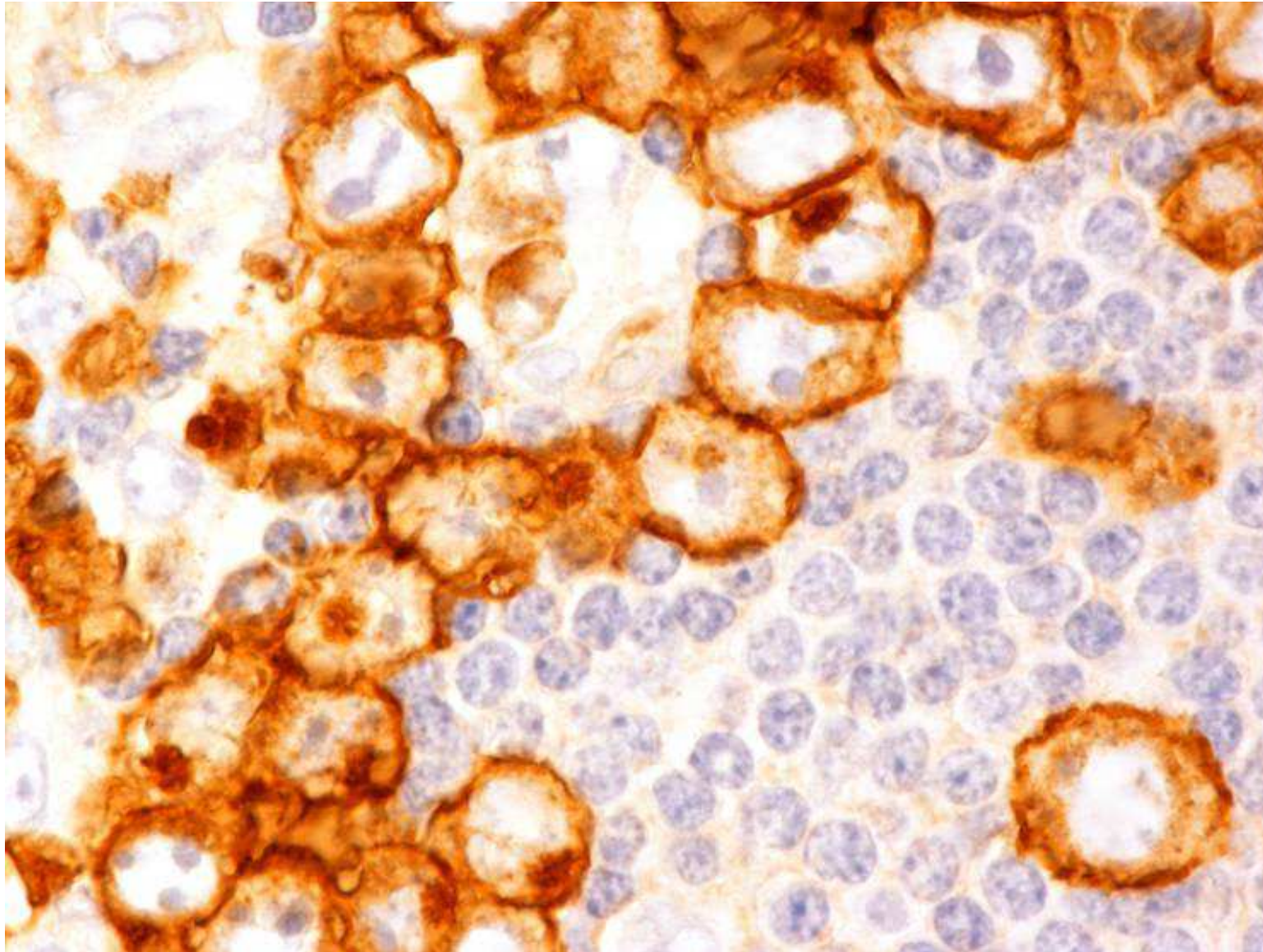


**Her2**

**Wachstums-  
-faktor-  
rezeptor**



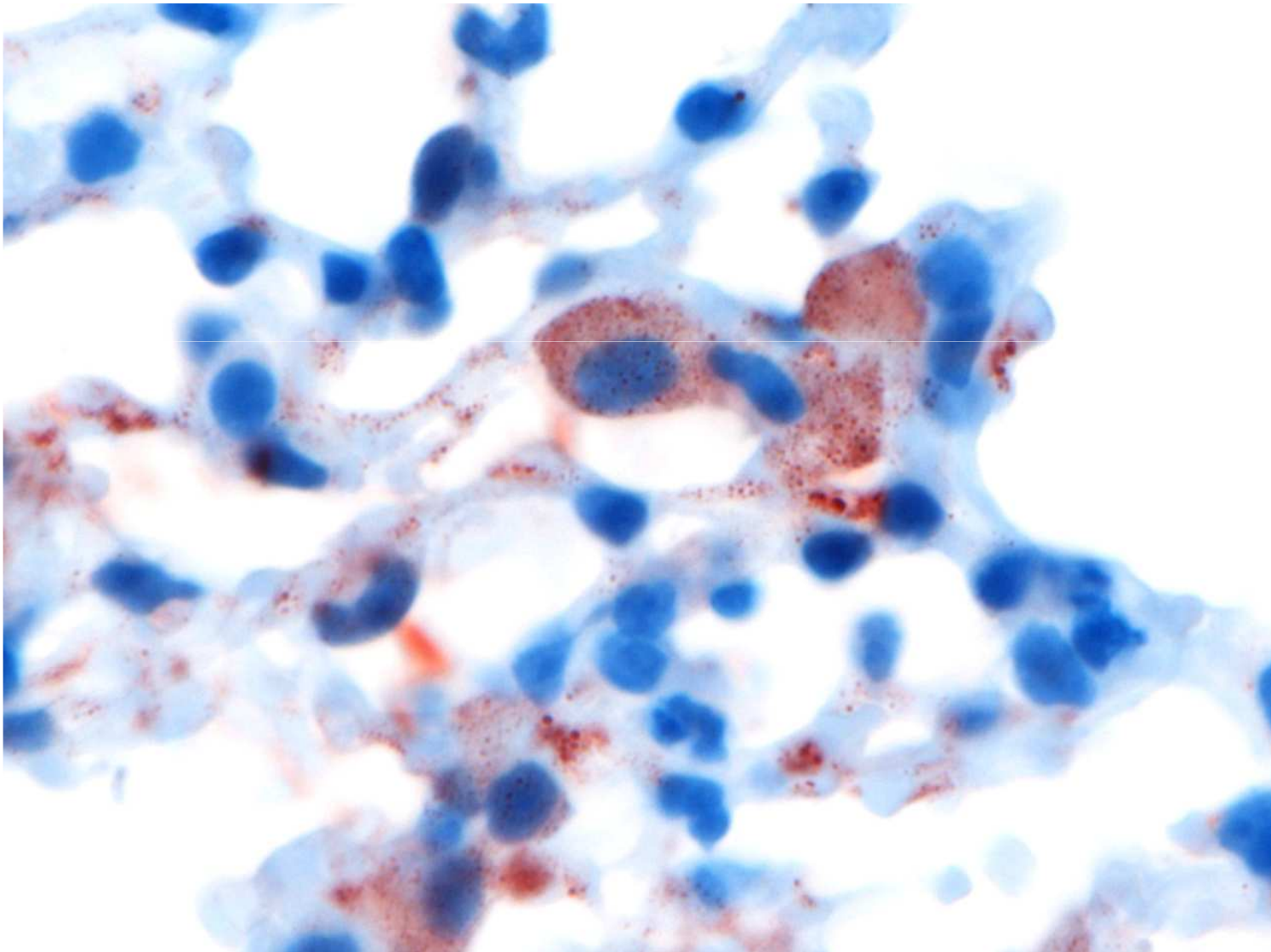
# Membran und Golgi



CD30

TNFR Familie  
Induktion von  
Apoptose via  
CD95/CD95L

# Endoplasmatisches Reticulum ?

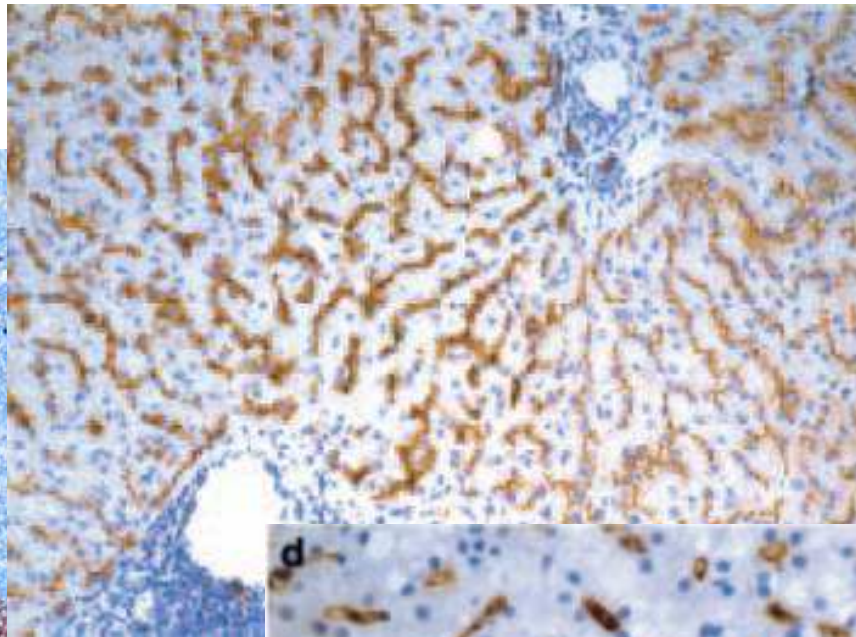
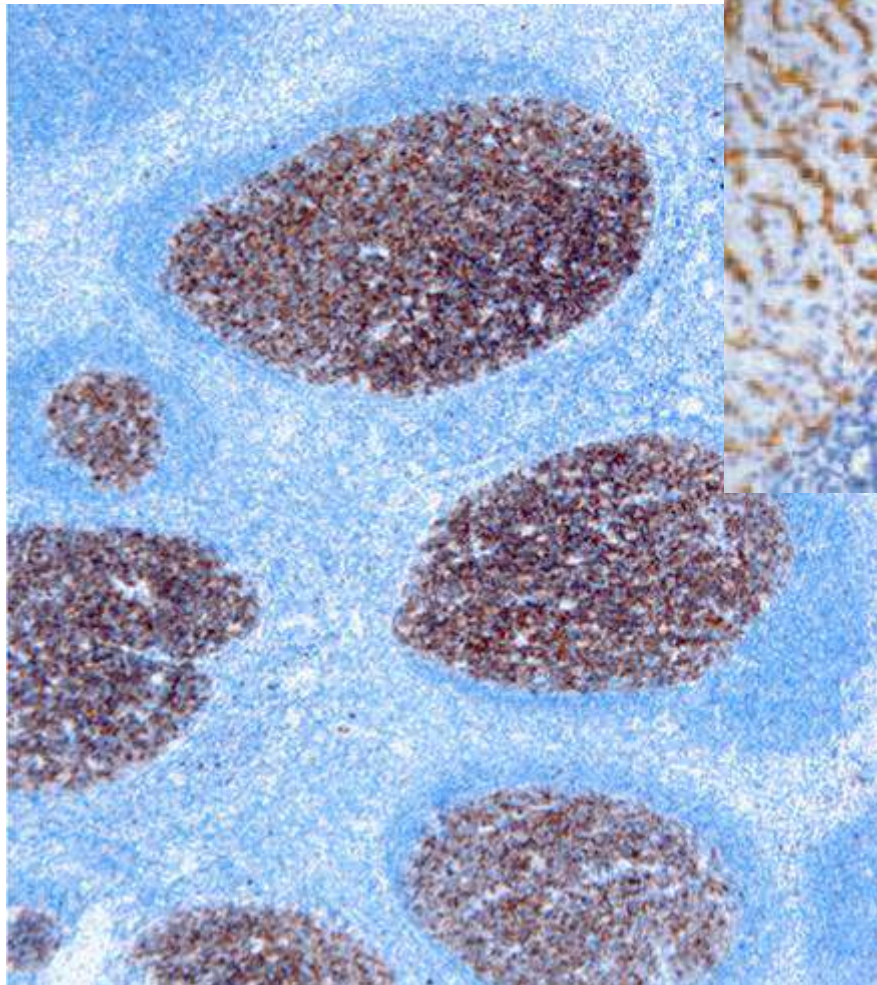


Cholesterin-  
Transporter ?

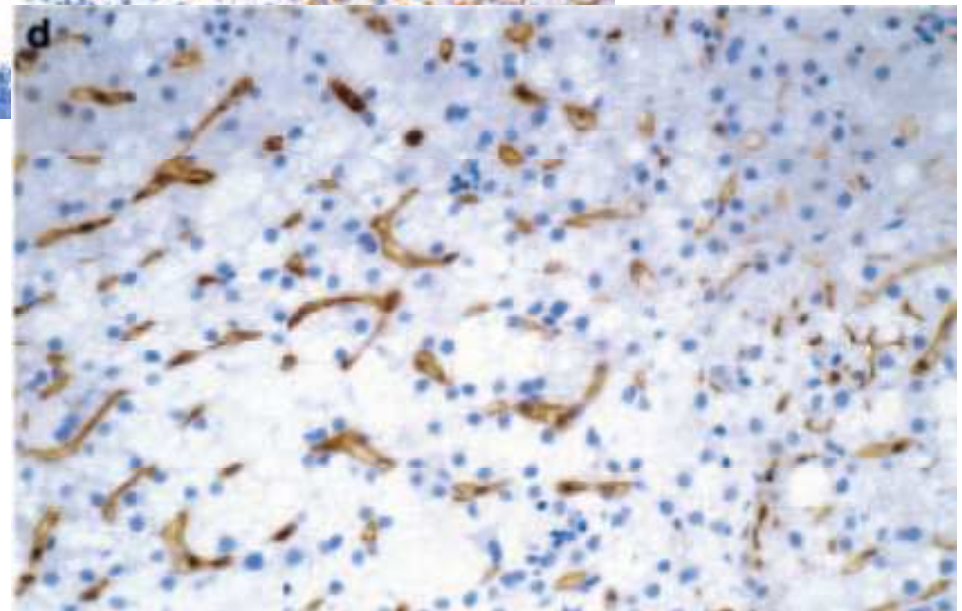


# Verteilungsmuster

Lymphknoten

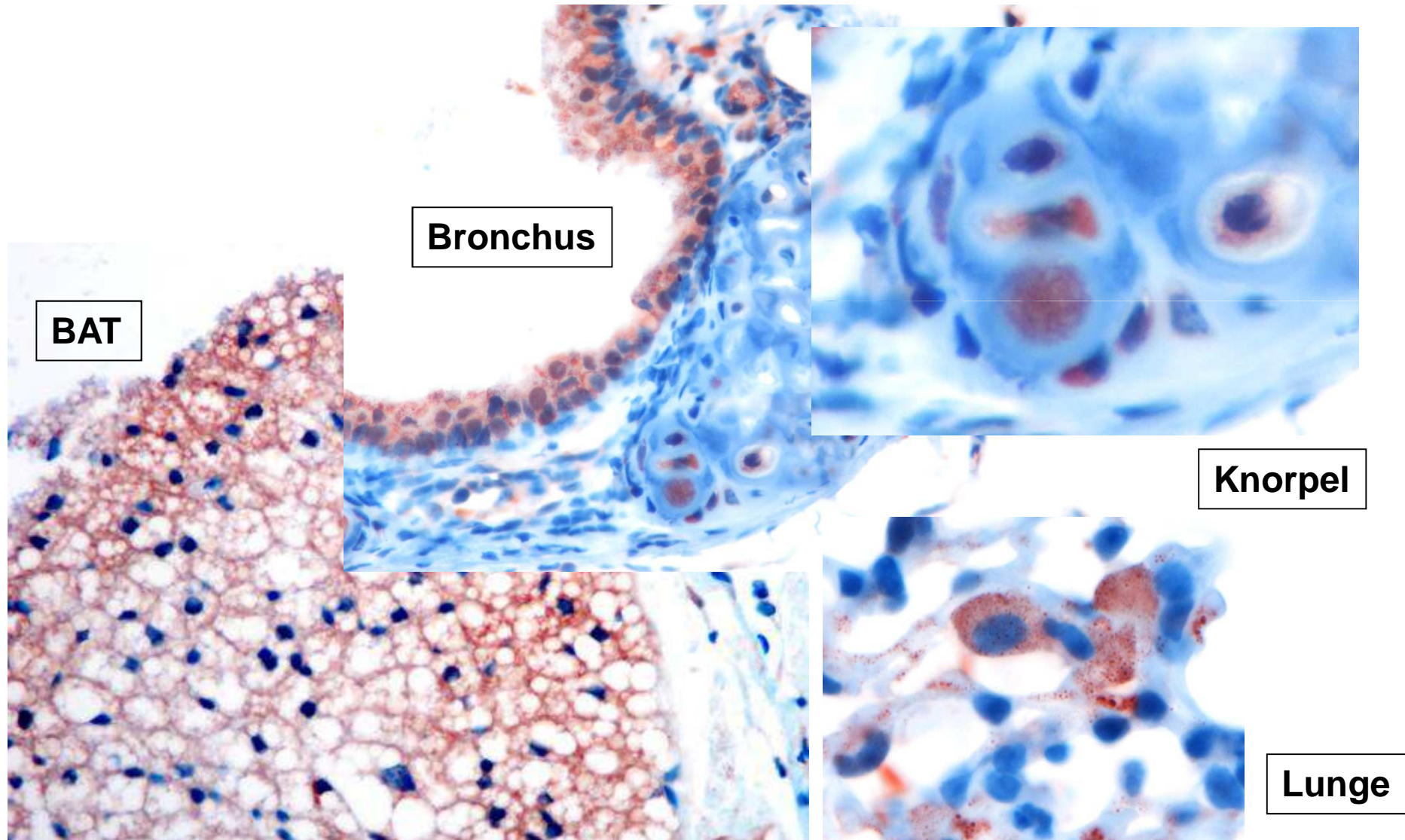


Leber





# Verteilungsmuster Cholesterintransporter?



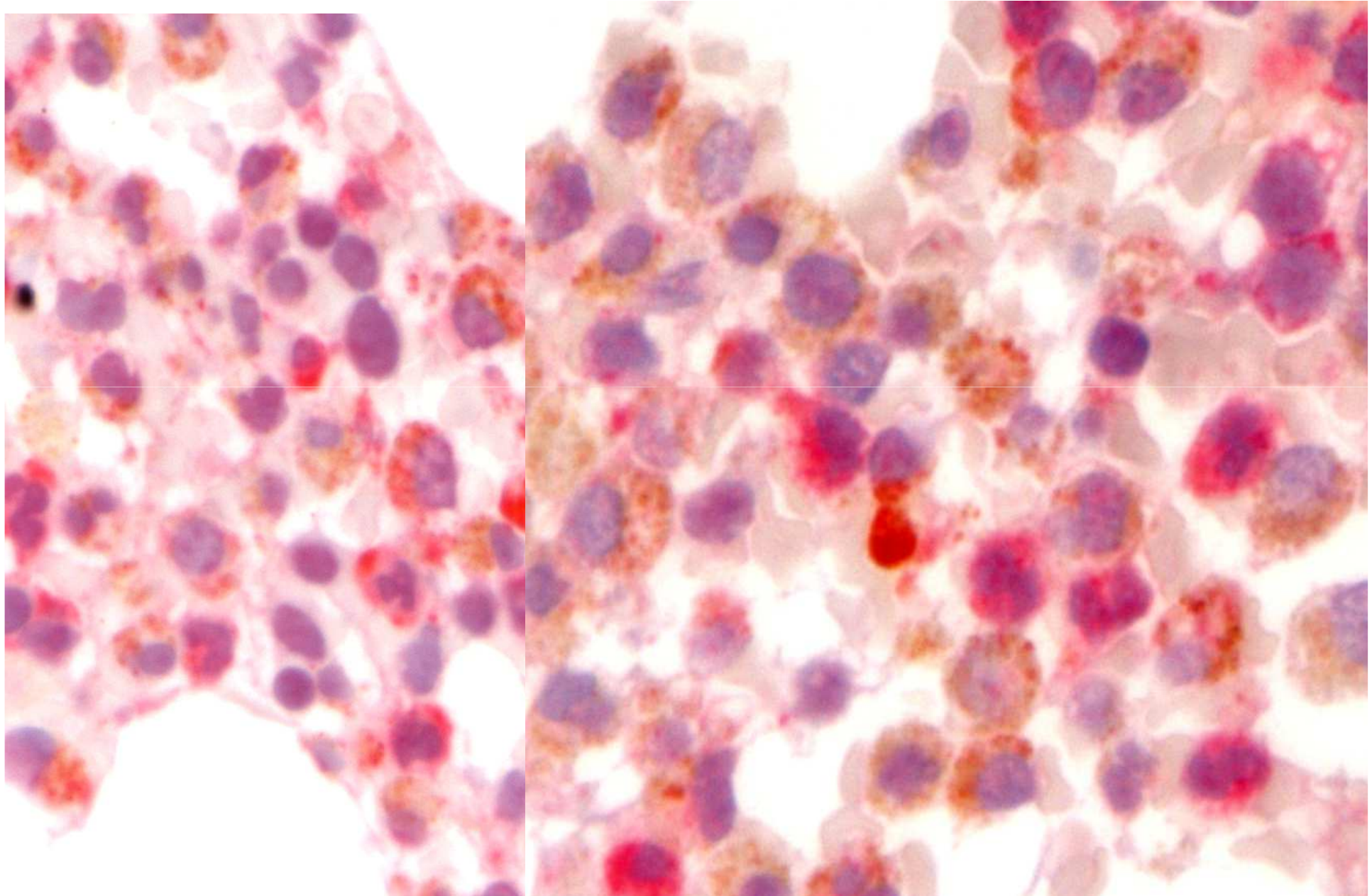


# Co-Lokalisation von Antigenen

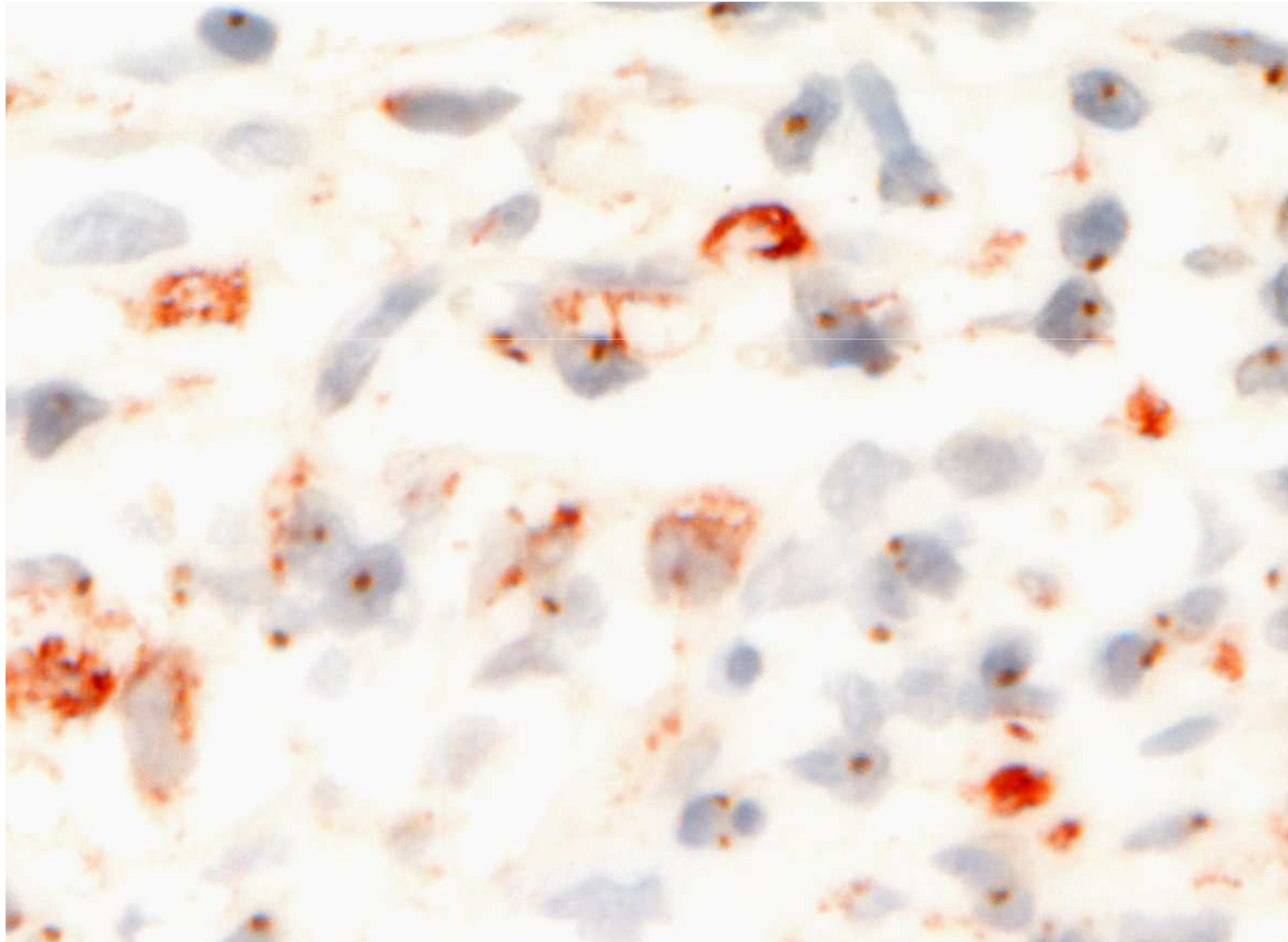
- Hohe Auflösung notwendig
- Geeignete Farbkombinationen in der Visualisierung
- Immunfluoreszenz

**CRTH2 (Prostaglandinrezeptor)**  
**braun; EPX (Eosinophile) rot**

**PG rot EPX braun**



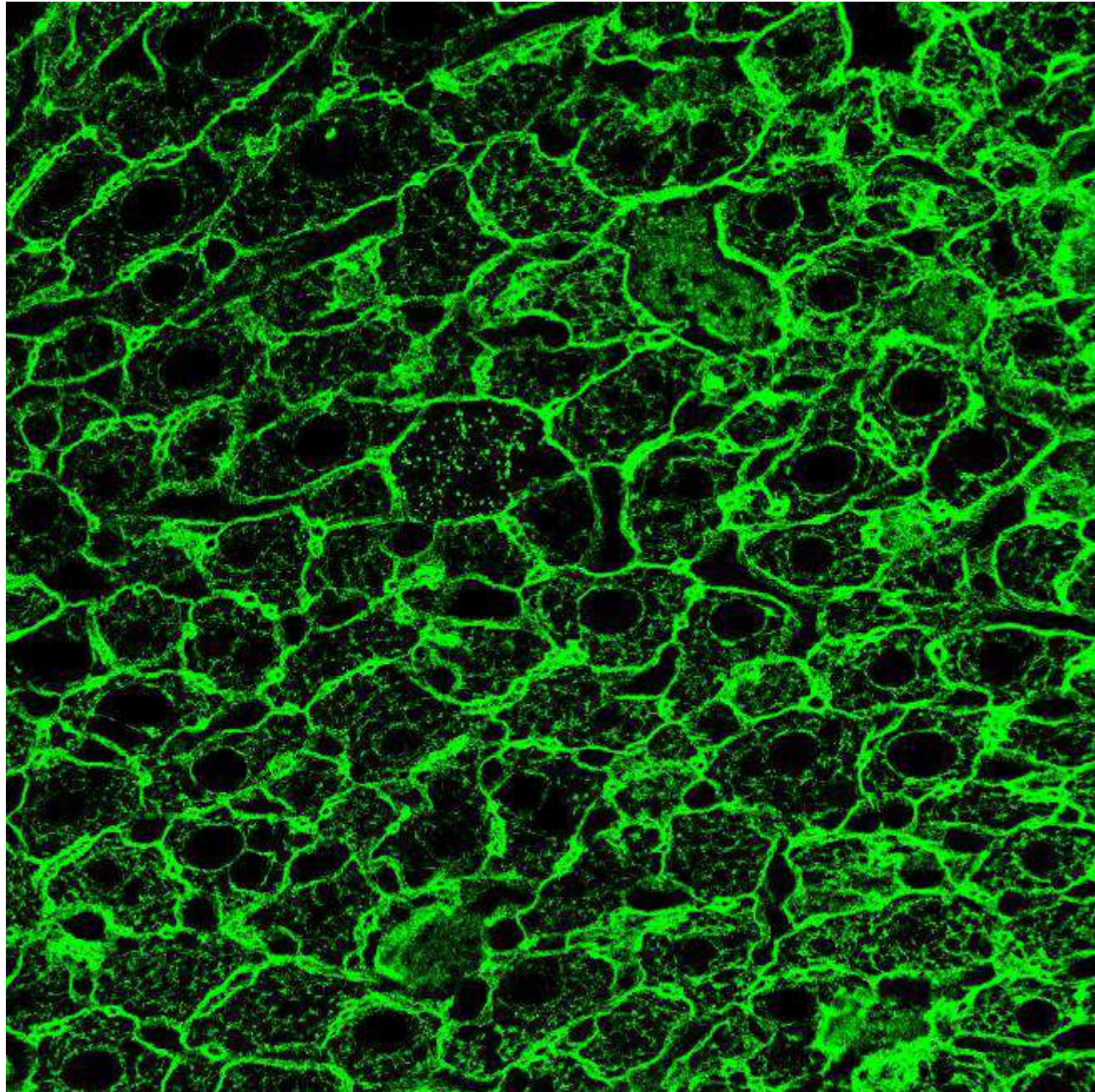
# IH + CISH



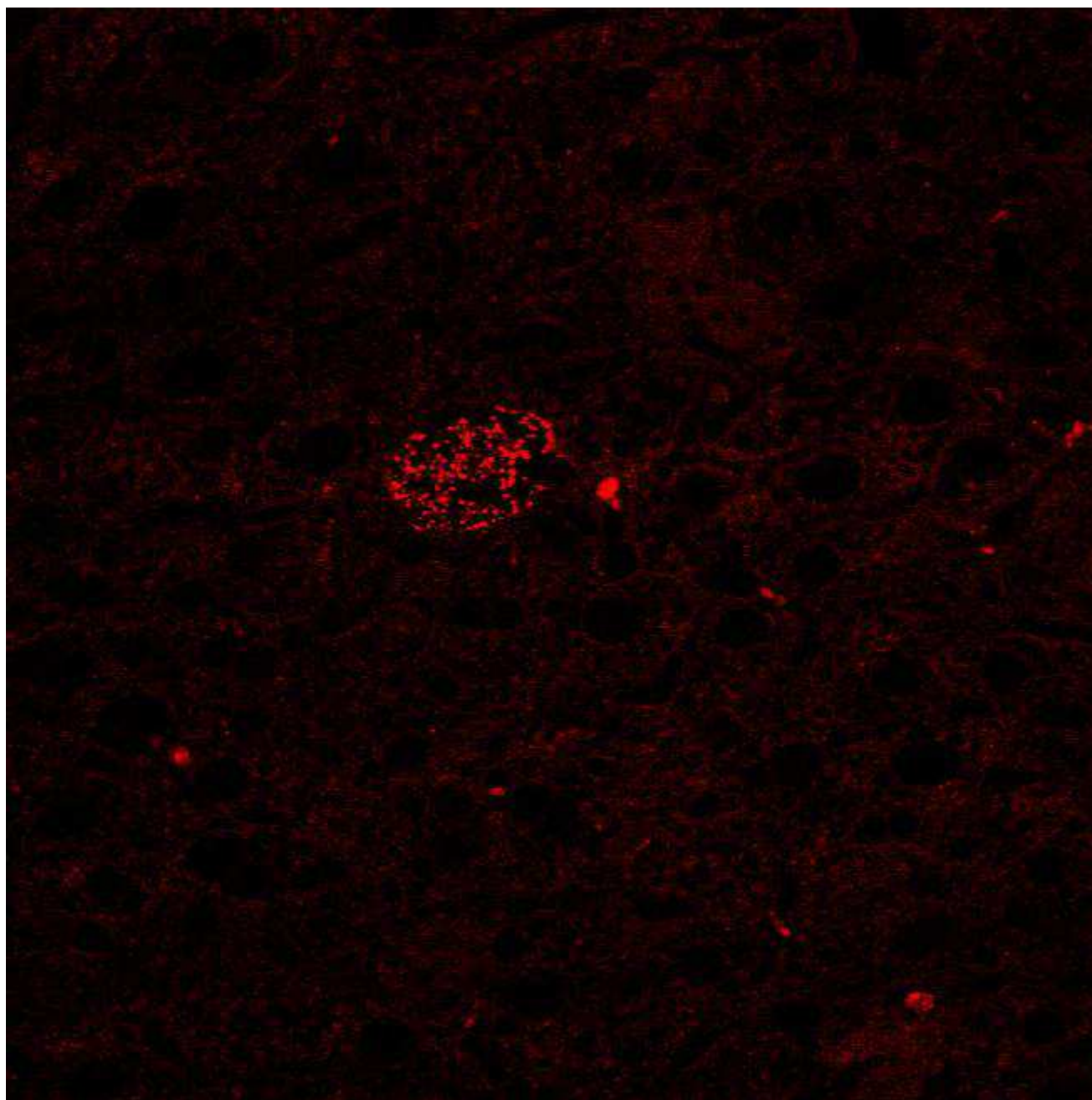
**CD68 IH (rot) –  
Makrophagen**

**Y-Chromosom  
FISH (braun)**

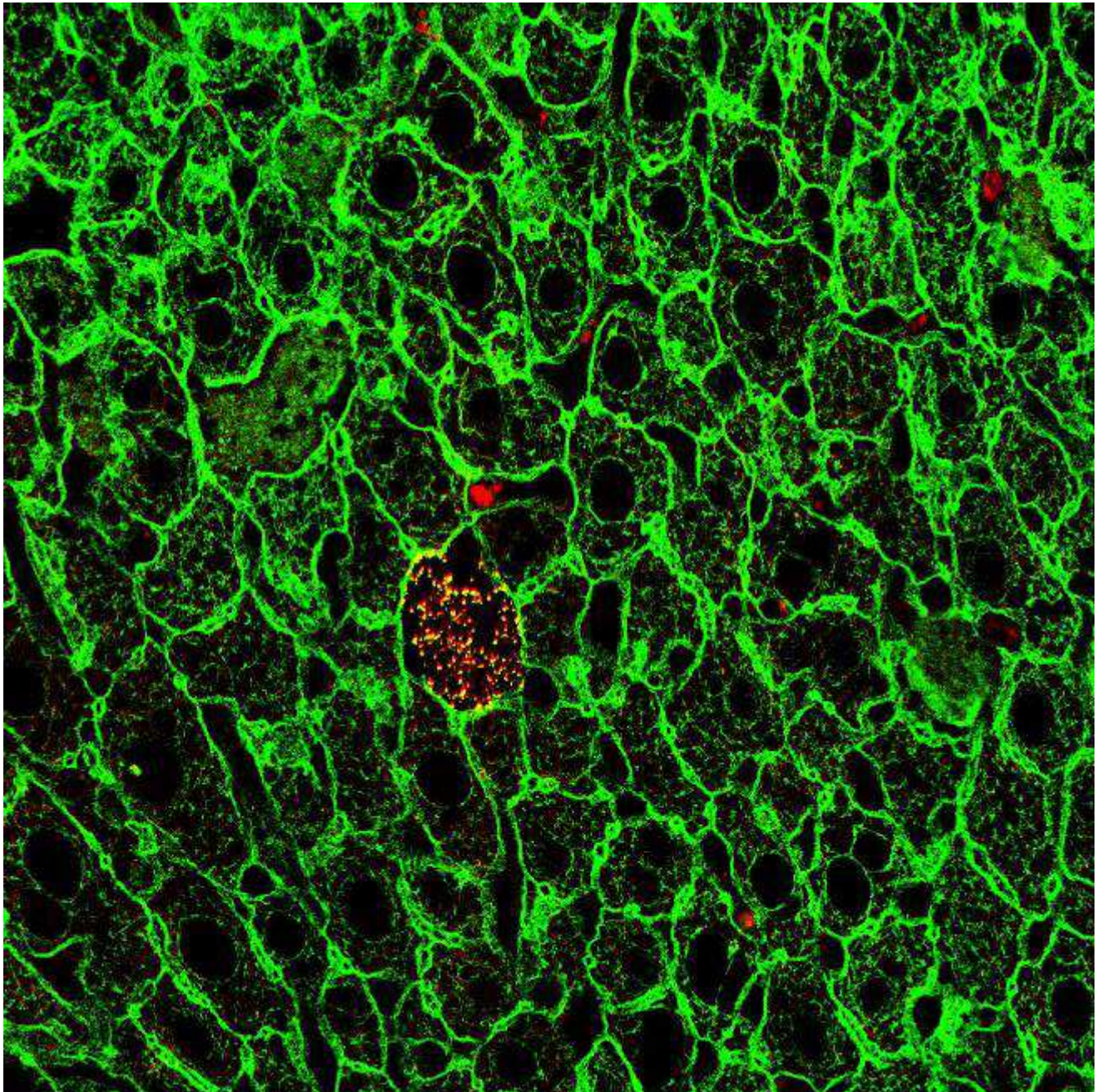












# Elektronenmikroskopie - Technik

- Glutaraldehyd u/o Paraformaldehyd – Fixierung
- Osmiumtetroxid – Nachfixierung
- Kunststoffeinbettung (Epon, Lowicryl)
- Schnittdicke 60-80nm (Diamantmesser)
- Kontrastierung: Uranylacetat, Bleicitrat



# Elektronenmikroskopie - Anwendungen

- Zellorganellen

- Mitochondrien, Peroxisomen, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi, Lysosomen

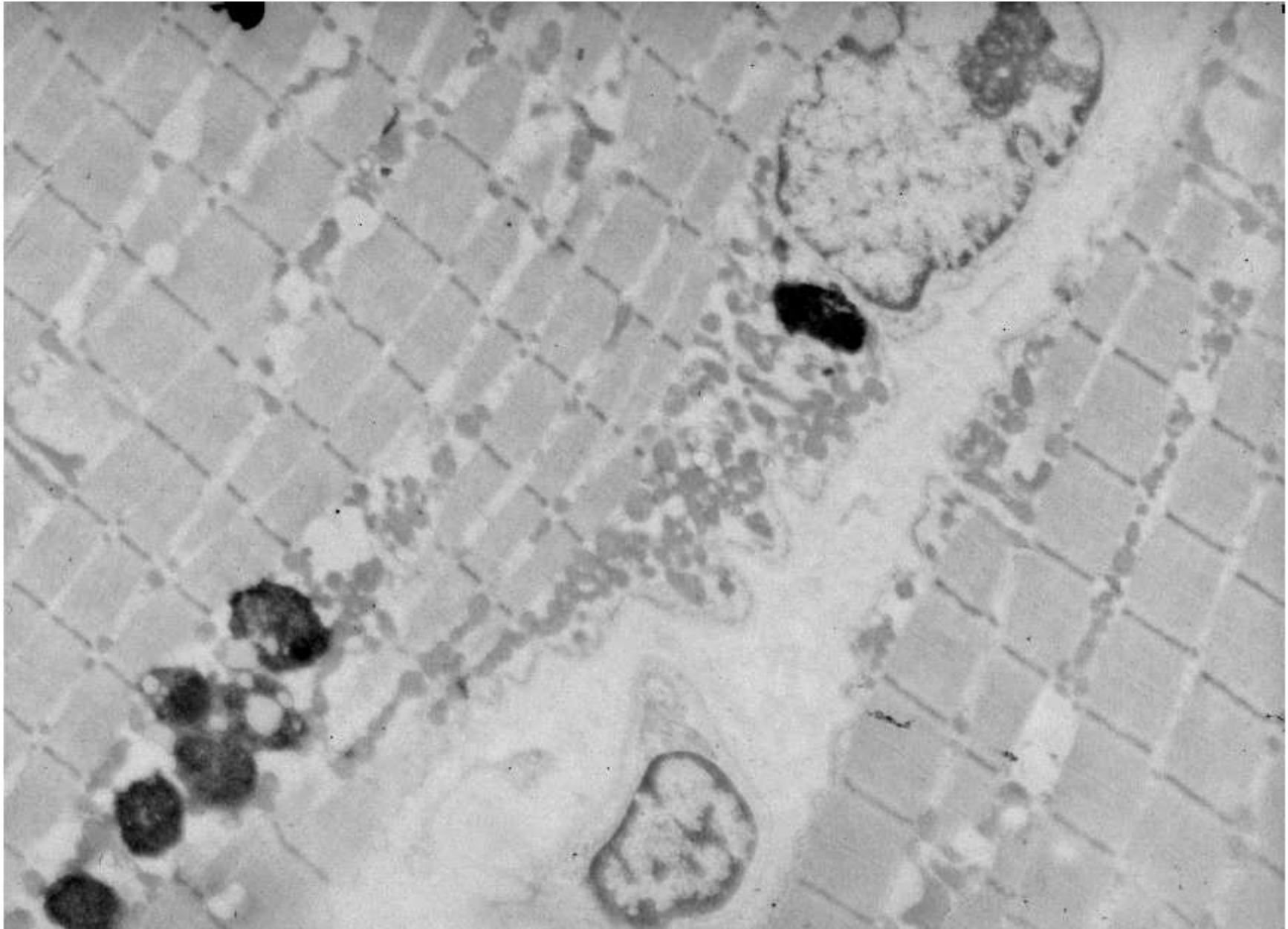
- Zellmembranen, -verbindungen

- Zytoskelett

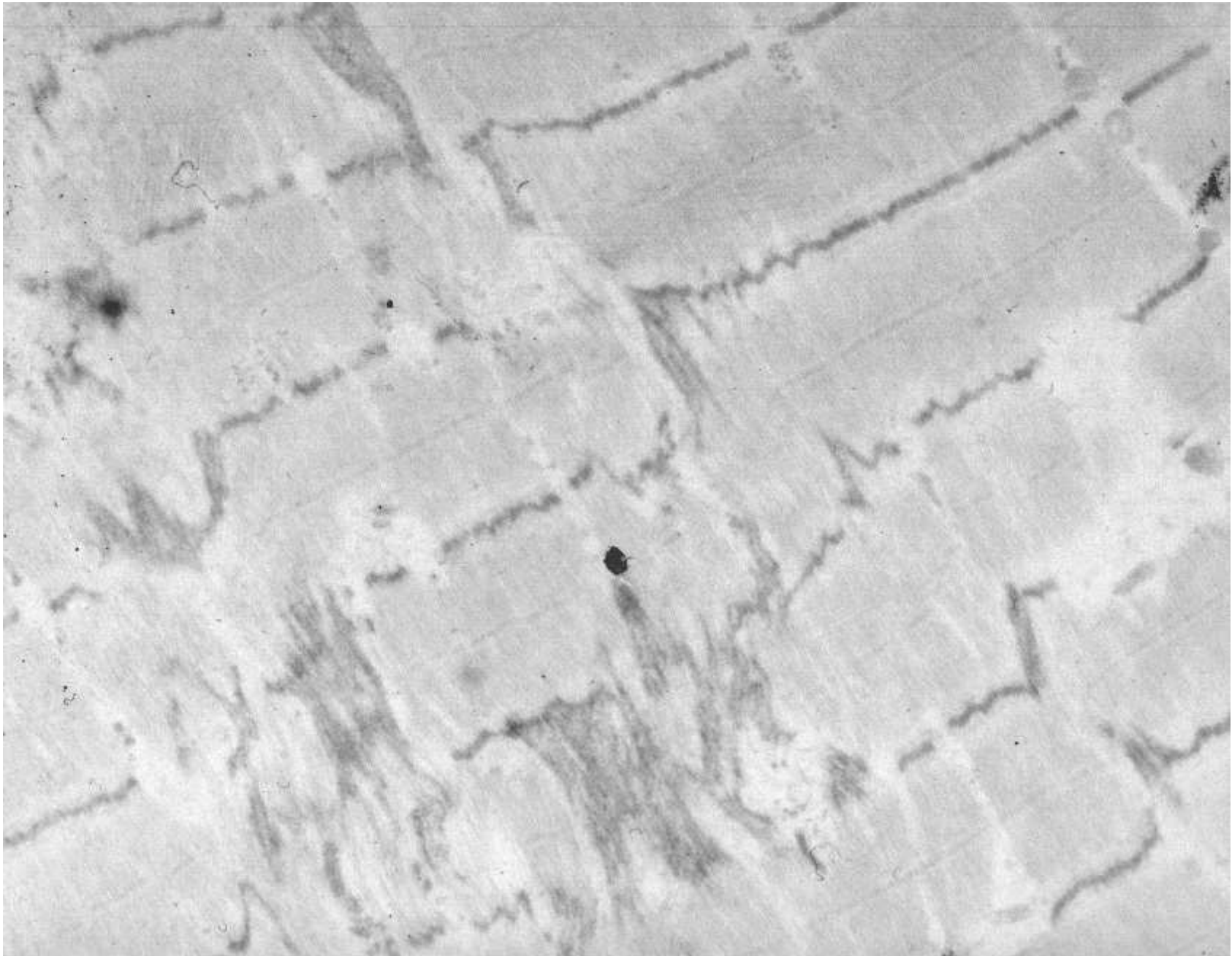
- Einschlusskörper

- Erreger: Viren

## Vermehrung von Mitochondrien

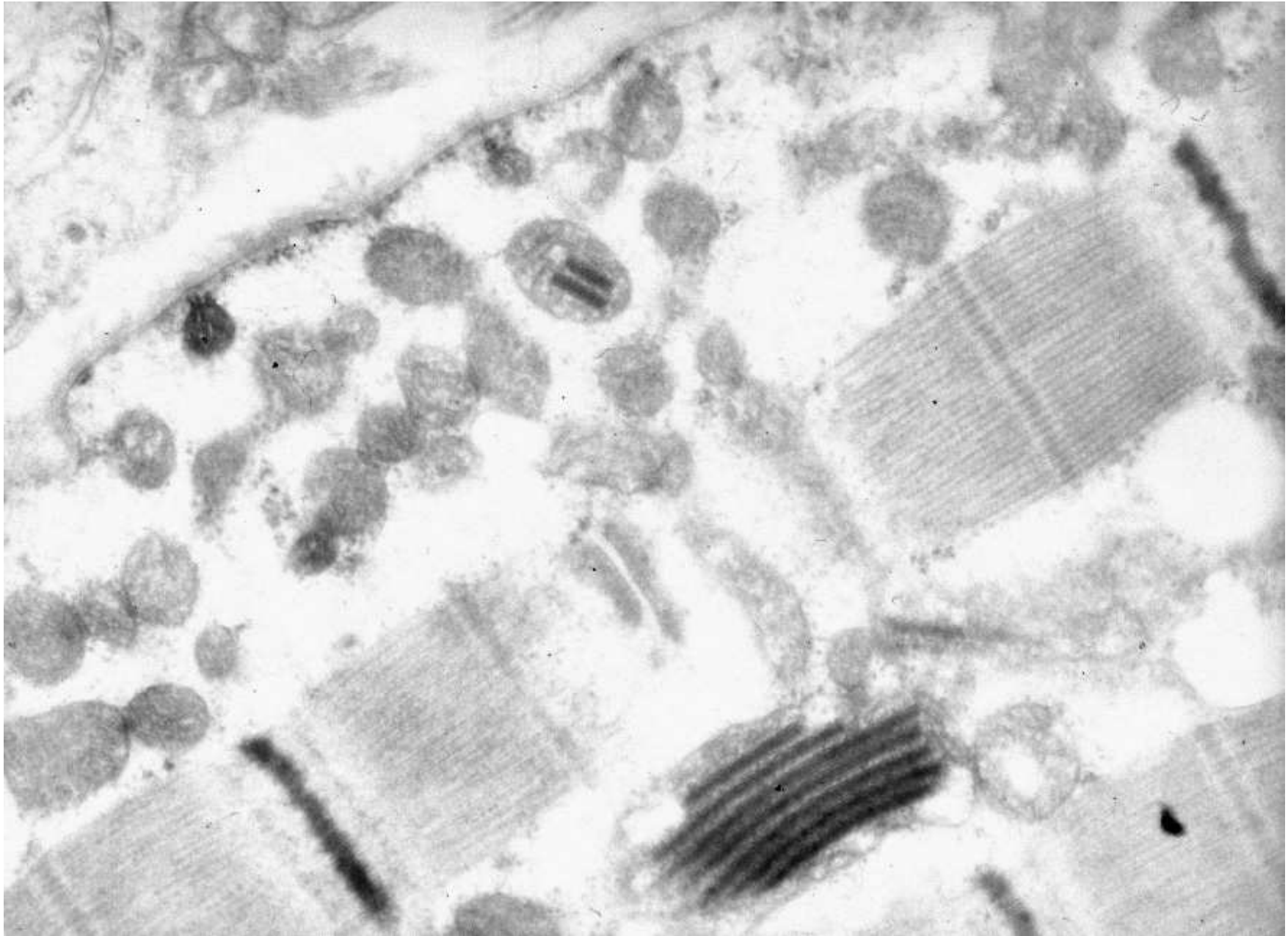


# Gestörte Z-Banden





# Kristalline Einschlüsse in Mitochondrien



# Viruseinschlußkörper (Zellkern)

