Medical University of Graz

ALLGEMEINE PATHOLOGIE

Definitionen

Zell- und Gewebsreaktionen

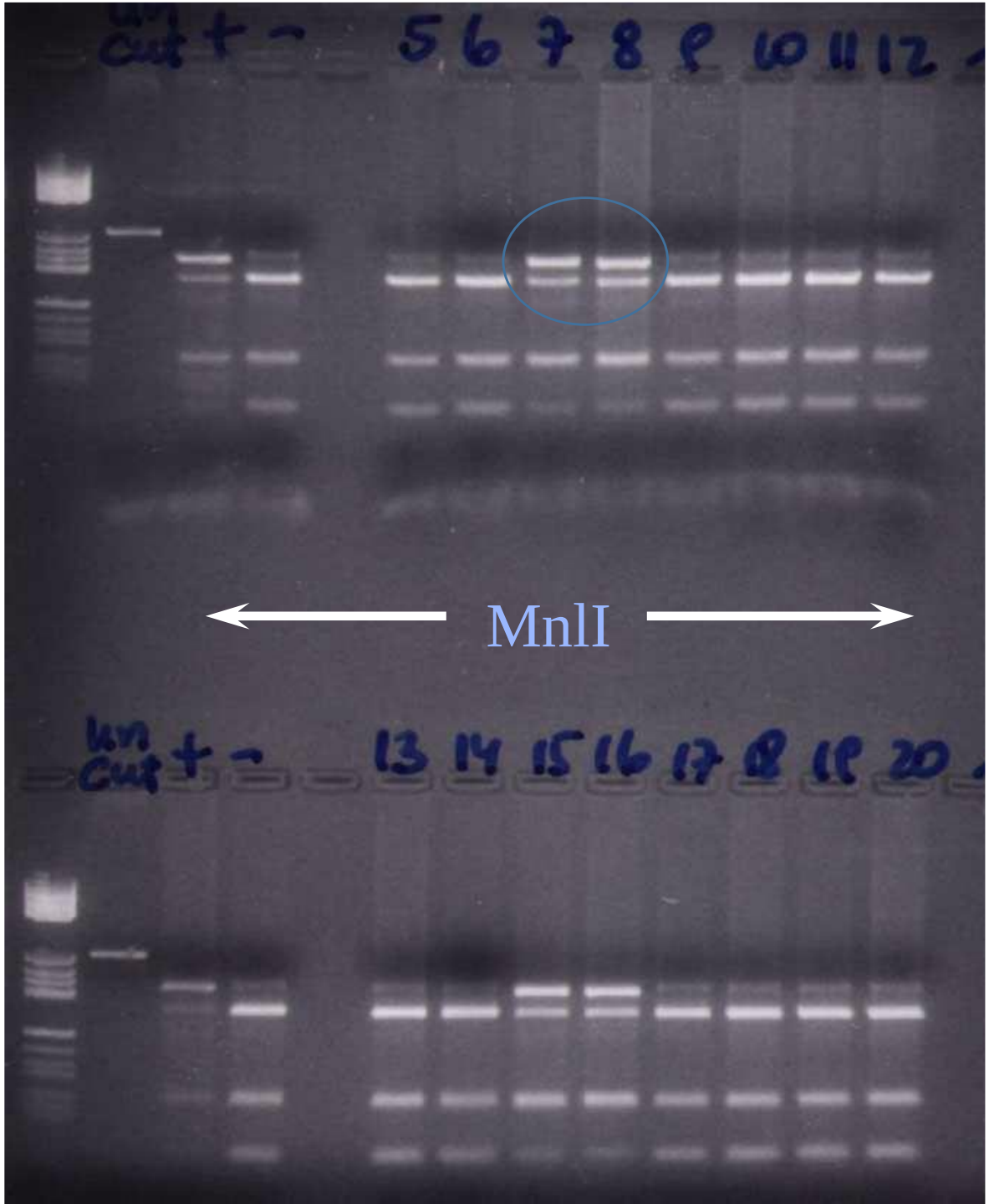
Ätiologie

- **Def.:** auslösende Faktoren, Ursachen v. Erkrankungen
  - Vererbt/genetisch bedingt (Keimbahn)
  - Erworben
    - Somatische Mutationen
    - Umweltfaktoren:
      - Mangel- oder Fehlernährung,
      - physikalische Ursachen (Trauma, Temperatur, Strahlung),
      - Chemikalien, Medikamente
      - Infektionen: Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten
      - Psychogene Faktoren

Mutation Faktor V “Leiden”

Medical University of Graz

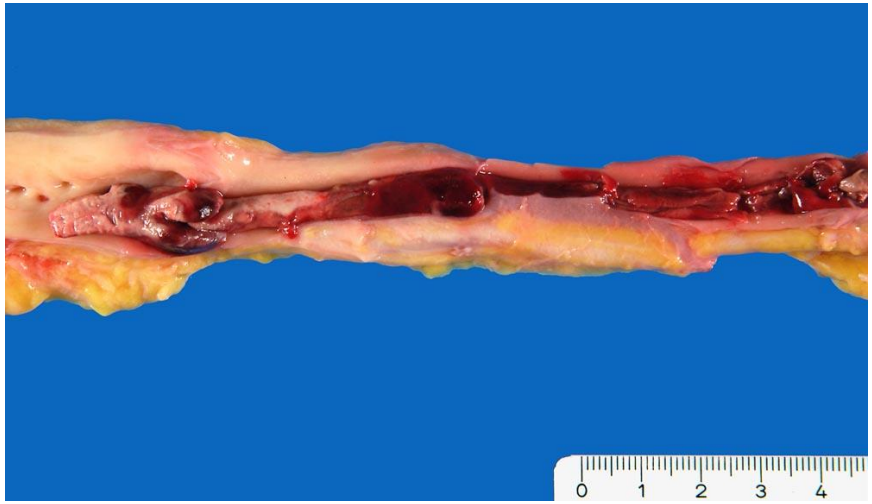
- Häufigste genetisch bedingte Ursache für venöse Thrombosen (Blutgerinnsel)
- 5-7% der Normalbevölkerung
- Punktmutation: G1691A => Arg561Gln
- Veränderung der Proteinsequenz=>APC Resistenz (akt. Protein C, Hemmstoff d. Blutgerinnung)
- Gerinnungsungleichgewicht=>erhöhte Thromboseneigung

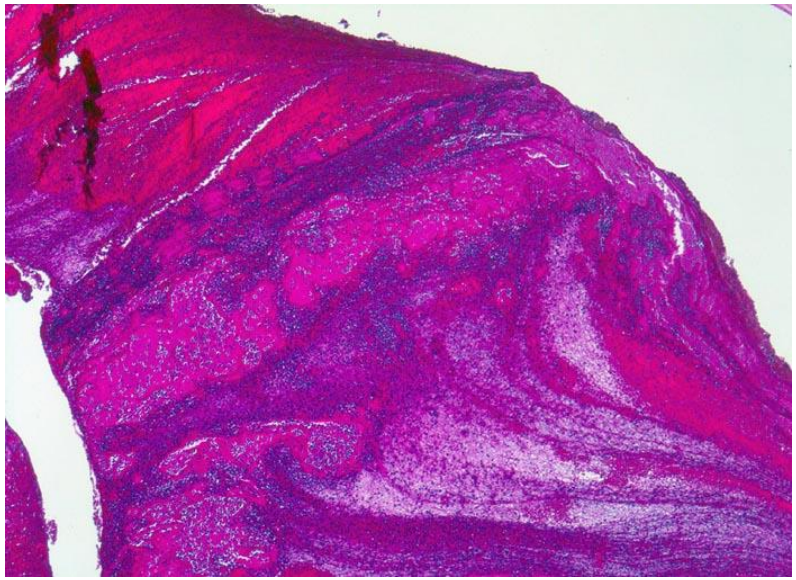


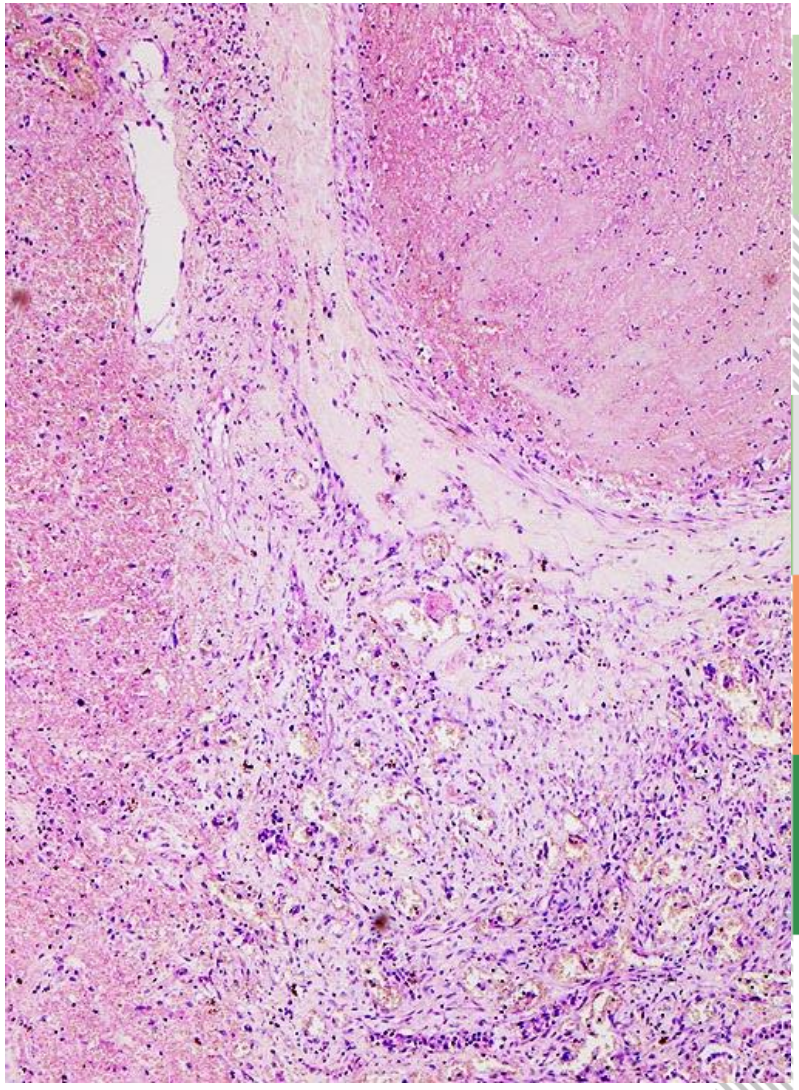
Faktor V „Leiden“

- RFLP
- DNA aus Blut, PCR
- Restriktionsenzym erkennt durch Mutation Ansatzstelle nicht
- Verschiedene lange Nukleinsäuresequenzen
- Zusätzlich Bande in Gelelektrophorese

Mögliche Folgen







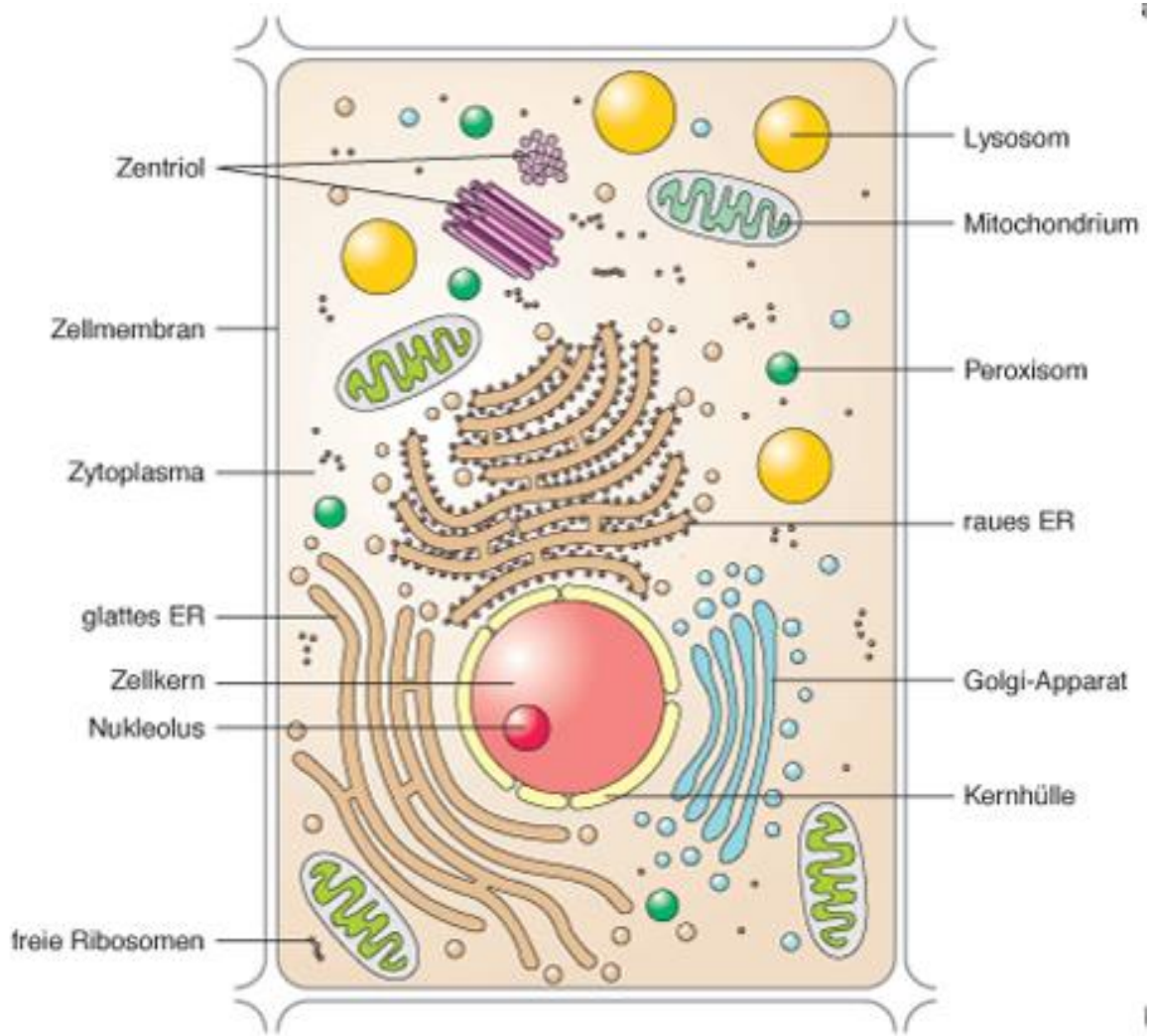
Prädisposition

- Vererbte genetische Veränderungen, die zu erhöhtem Erkrankungsrisiko führen:
  - Reduzierte Anpassungsfähigkeit gegenüber entsprechenden Pathogenen
    - Bsp. Enzymdefekt mit vermindertem Einbau von Jod in Schilddrüsenhormon in Kombination mit Jodmangel
  - Reduzierte Resistenz gegenüber Erregern
    - Bsp. angeborene Immundefekte

Pathogenese

- Entstehung und Entwicklung einer Erkrankung
- Ablauf der Reaktion des Organismus auf Schädigung
- Dauer der Reaktion auf Schaden
  - Akut: Tage bis Wochen
  - Chronisch: Wochen, Monate, Jahre
- Ausgang
  - Heilung
  - Defektheilung
  - Remission - Rezidiv
  - Tod

Aufbau einer Zelle



Böcker et al.: Pathologie, 4.A. © Elsevier GmbH. www.studentconsult.de

Zellorganellen

- Endoplasmatisches Retikulum
- Mitochondrien
- Golgi-Komplex
- Lysosomen
- Peroxisomen

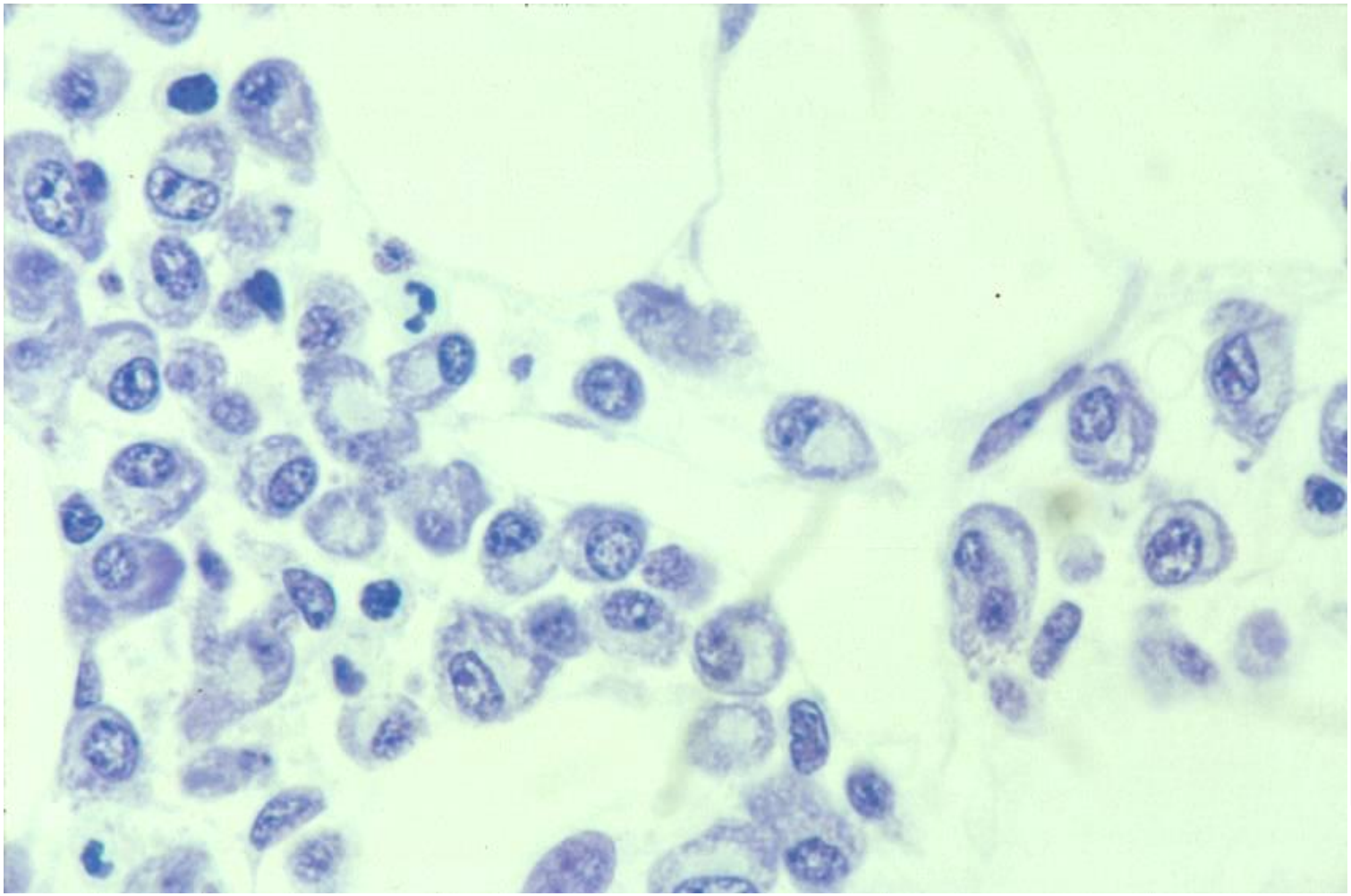
Endoplasmatisches Retikulum

- Kontinuierliches intrazytoplasmatisches Membransystem
- Rauhes (granuläres) ER
  - Proteinbiosynthese
  - Membranproduktion
- Glattes (agranuläres) ER
  - Hormonsynthese
  - Kohlenhydratspeicherung
  - Entgiftung
  - Calciumspeicher, Signaltransduktion

Plasmozytom:

Basophile Färbung des Zytoplasmas->

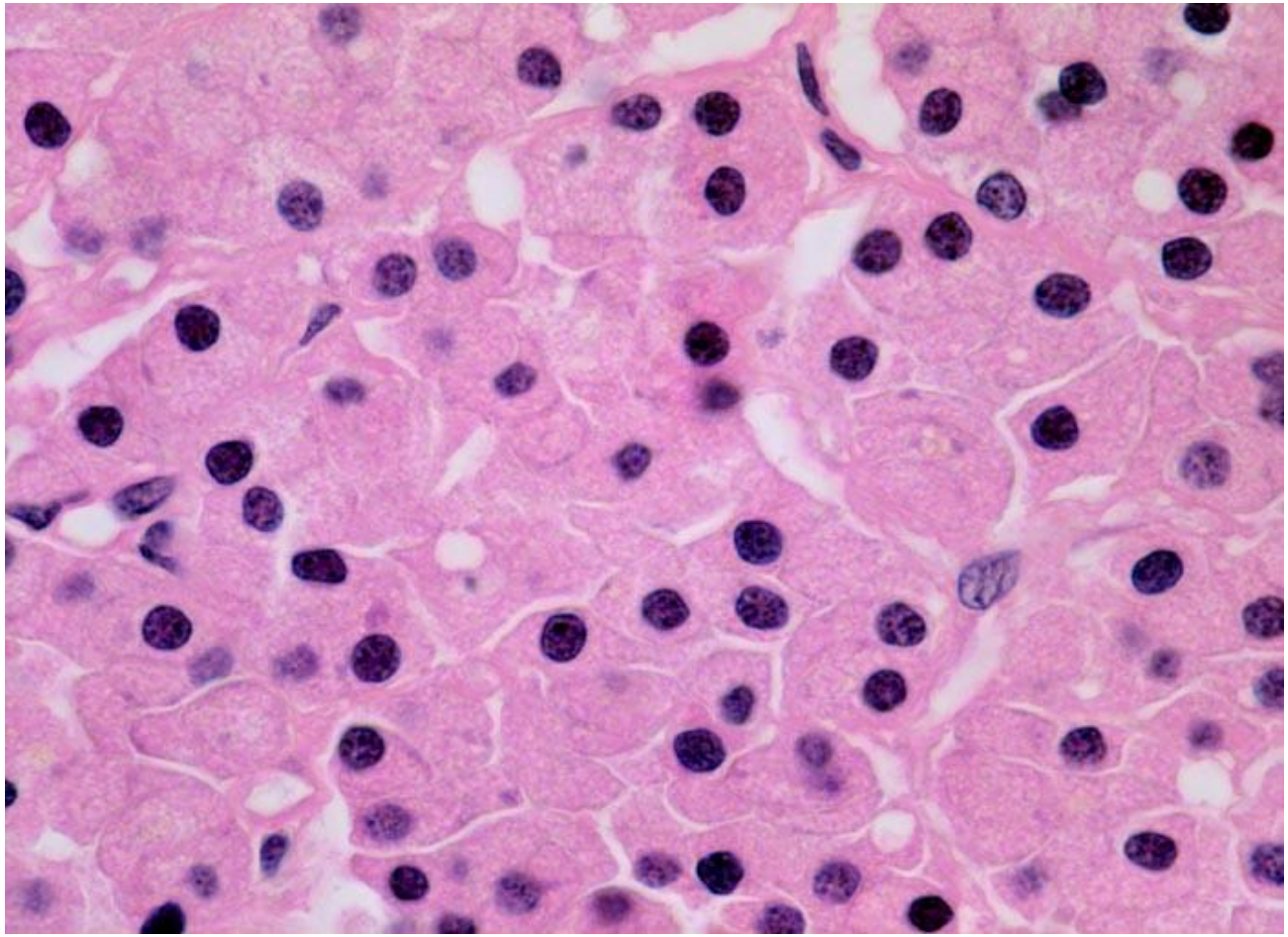
Hinweis auf starke Proteinproduktion



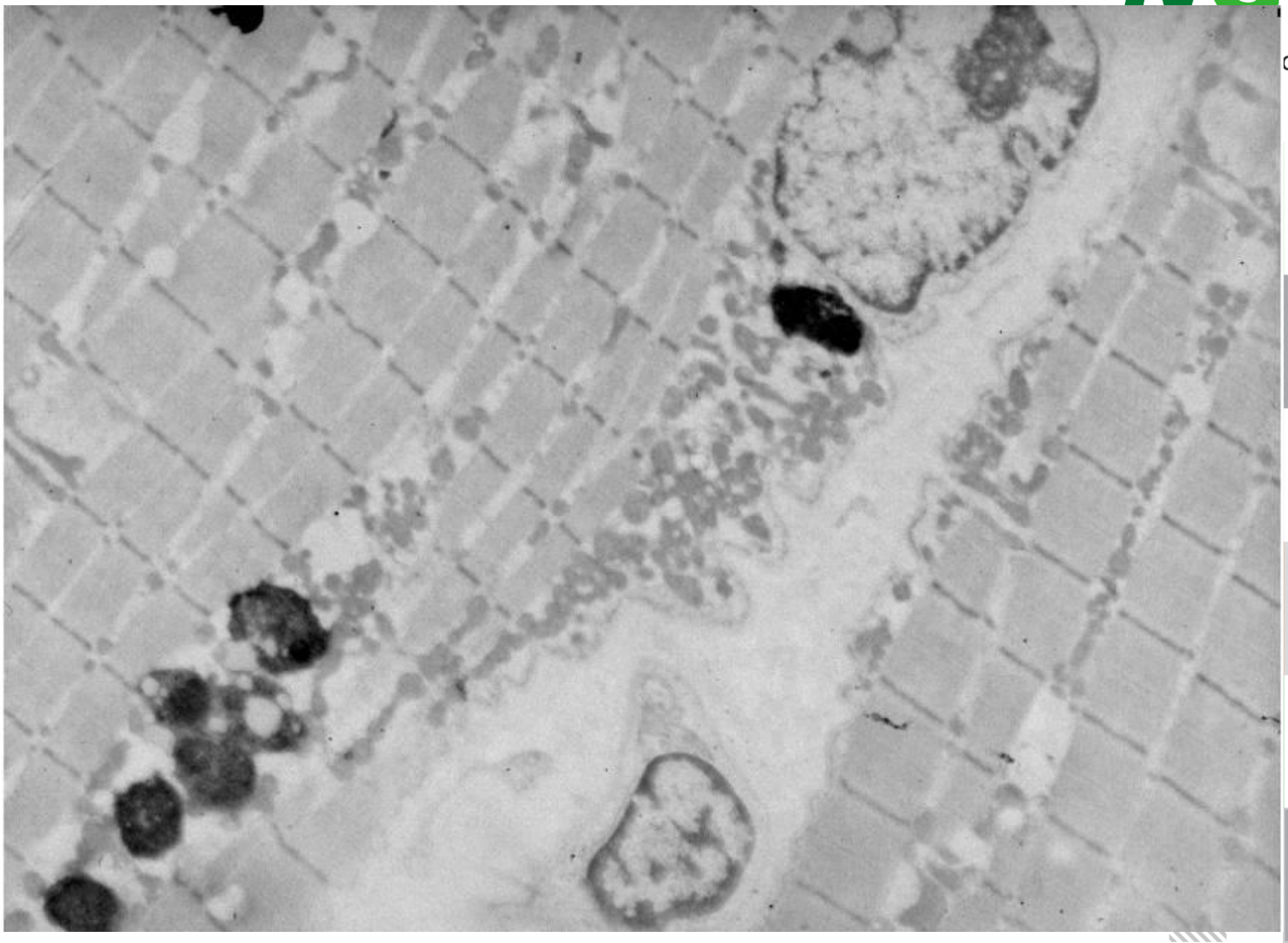
Mitochondrien

- Zentrale Organellen des Energiestoffwechsels, „Kraftwerk“
  - Oxidation von KH und Fettsäuren zu H_2O, CO_2
- Innere Membran: gefaltet
- Äußere Membran
- Matrix
- Eigene DNA: maternal, kodiert nicht für alle mitochondrialen Enzyme
- Vermehrt in Zellen mit großem Energiebedarf
  - Muskulatur: Kontraktion
  - Drüsen: Pumpfunktion
  - HE: eosinophil, feingranuläres Zytoplasma

Oxyphile Zellen



Vermehrung von Mitochondrien

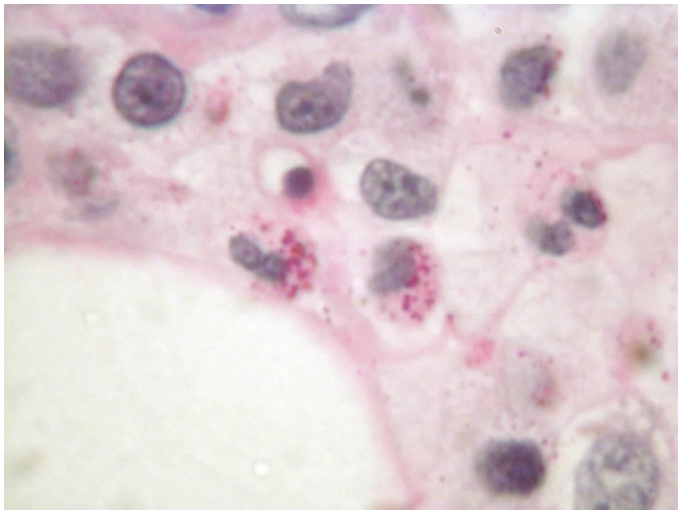


Graz

Golgi-Komplex

- Membranöse Zisternen
- Besonders ausgeprägt in sekretorisch aktiven Zellen
  - Becherzellen
- Modifikation von Proteinen
  - Glykosylierung
- „Targeting“ durch „Adressierungsmoleküle“

Lysosomen



- Einfache Membran
- Zahlreiche hydrolytische Enzyme mit saurem pH-Optimum
  - Nucleasen, Proteasen, Glykosidasen, Lipasen, Phosphatasen
- Abbau des durch Pinozytose, Phagozytose aufgenommenen Materials
  - z.B. Makrophagen

Peroxisomen

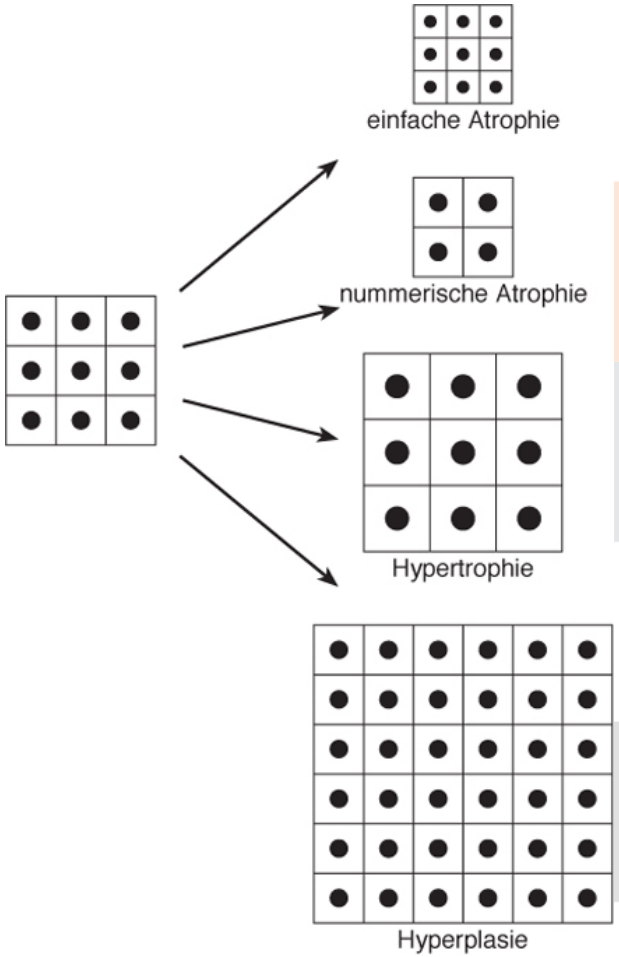
- Einfache Zellmembran
- Entstehen durch Teilung
- Enzyme für Fettsäureoxidation, zahlreiche katabole Funktionen
- Katalase
- Vermehrung:
  - Lipidsenker
  - Fettreiche Ernährung, Alkohol
- Verminderung:
  - Fettleber, Bakterientoxine
- Störungen
  - Biogenesestörung: Zellweger-Syndrom (Cerebro-hepato-renales Syndrom, AR)

Zell- und Gewebsreaktionen

- Adaption
- Zellschädigung
- Zelltod

Adaptation

- Reaktion auf physiologische oder pathologische Reize
- Vermehrte oder verminderte Belastungen
  - Organe
  - Zellen
  - Zellorganellen



Böcker et al.: Pathologie, 4.A. © Elsevier GmbH. www.studentconsult.de

Zellschädigung

- Funktionsstörungen
  - Vorübergehende **(reversible)**
  - Permanente **(irreversible)**
- Interaktion zwischen Noxe und Zelle
- **Störung:**
  - Zellmembranen, Energiehaushalt, Syntheseleistungen
- Morphologische und funktionelle **Folgen**
- **Reparatur:**
  - Biotransformation, Phagozytose

Mechanismen der Zellschädigung

- Sauerstoffmangel (Ischämie, Hypoxie)
  - wenn irreversibel – Nekrose
- Viren
  - Zytopathischer Effekt
  - Induktion einer Immunantwort
  - Zytoskelettschäden
  - Riesenzellen
- Chemische Substanzen und Medikamente
- Physikalische Faktoren
- Mangel an “essentiellen Faktoren”

Zelltod

- Irreversibles Endstadium einer Zellschädigung
- Folge hypoxischer, toxischer, physikalischer, immunologischer oder mikrobieller Ursachen
- Physiologischer Vorgang im Rahmen der Embryonalentwicklung und des normalen Gewebeumsatzes
- **Apoptose:** programmierter Zelltod
- **Nekrose:**
  - Denaturierung **(Koagulation)** von Proteinen und/oder
  - enzymatische Auflösung/Verflüssigung **(Kolliquation)**
- **Autophagie:** Abbau von Bestandteilen und Organellen

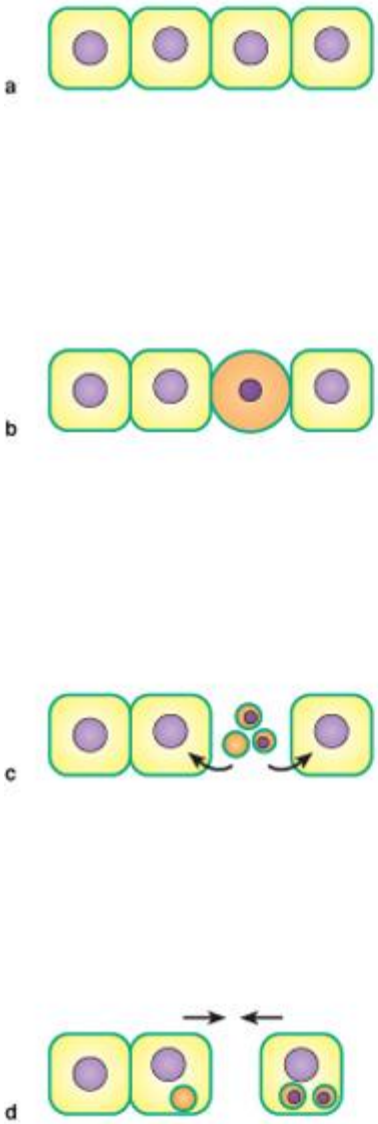
Apoptose:

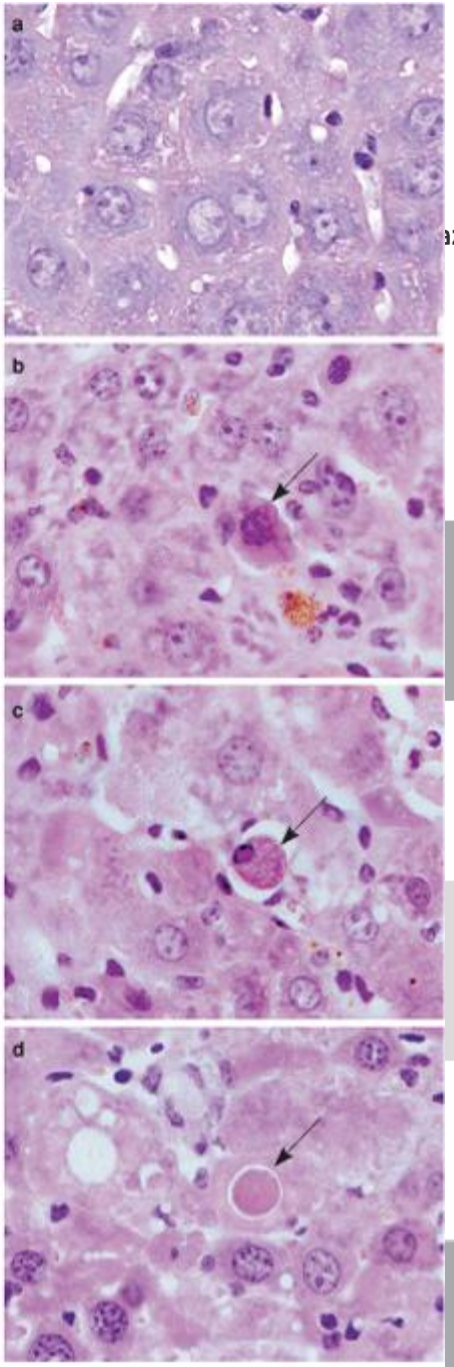
a) Normaler Zellverband

b) Lösung der Zellverbindungen und Kondensation des Chromatins

c) Fragmentierung und Pyknose des Zellkerns in der apoptotischen Zelle

d) Entzündungsfreie Elimination der apoptotischen Zellteile durch Phagozytose



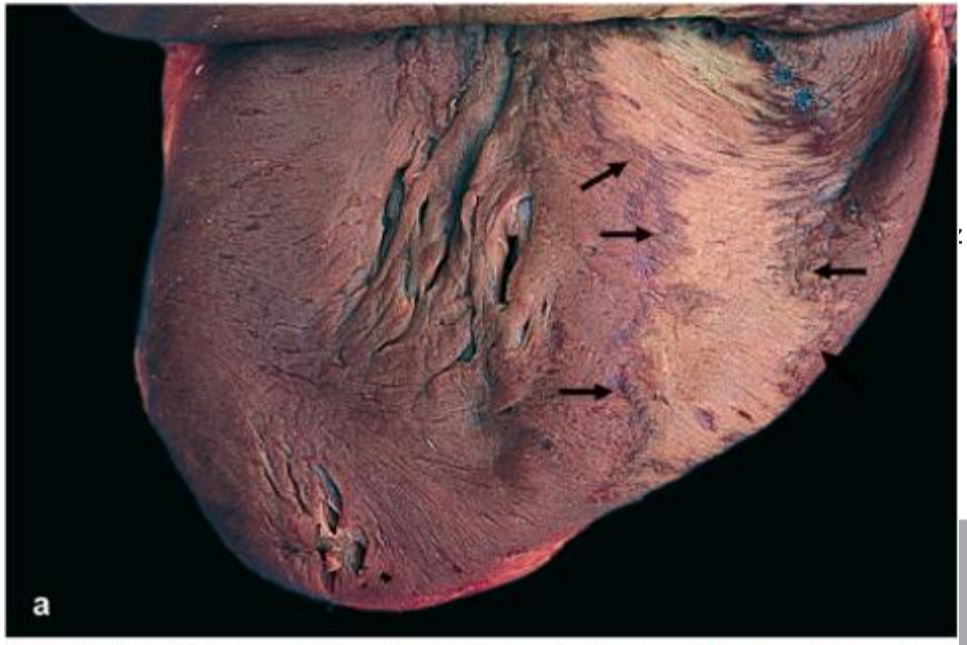


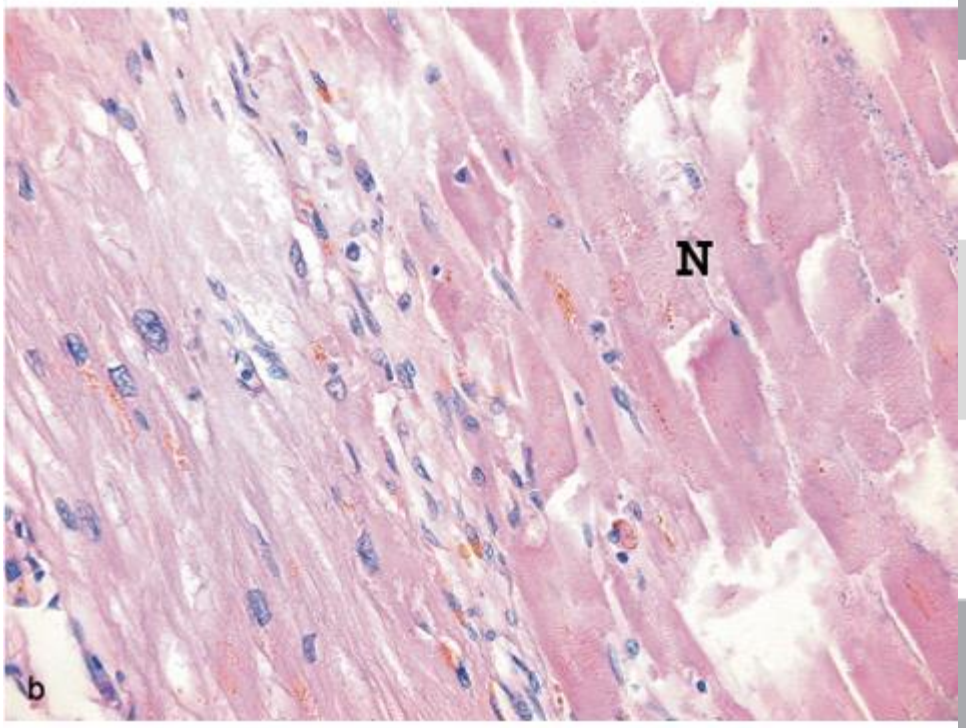
Myokardinfarkt

Koagluationsnekrose

a) lehmfarbene Abblassung des Myokards im Infarktgebiet und rötliches, resorptives Granulationsgewebe im Randbereich (Pfeile)

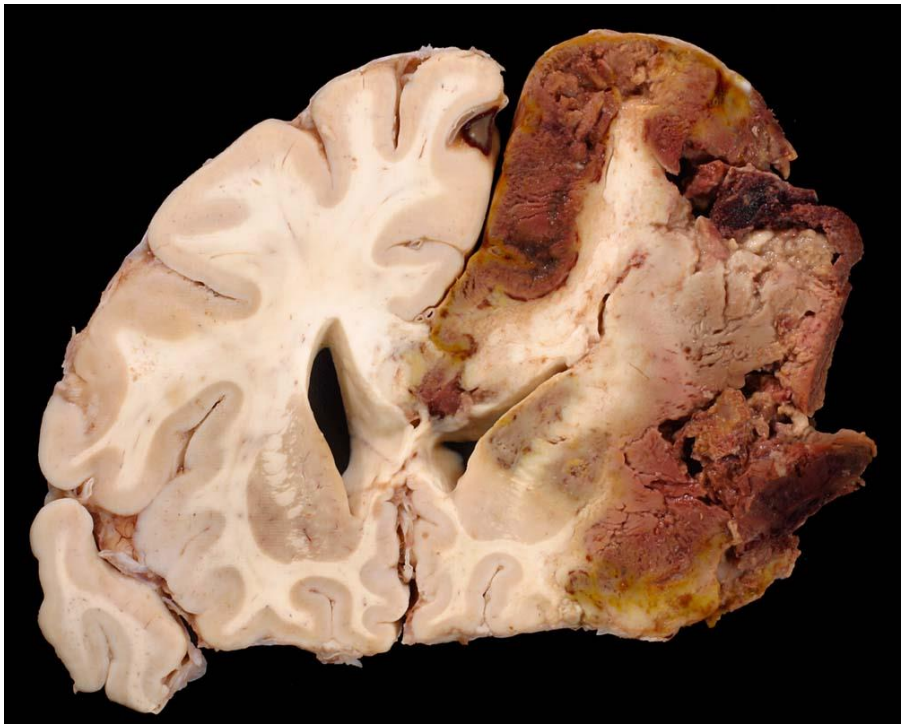
b) eosinophile Nekrosen (N) des Infarkts





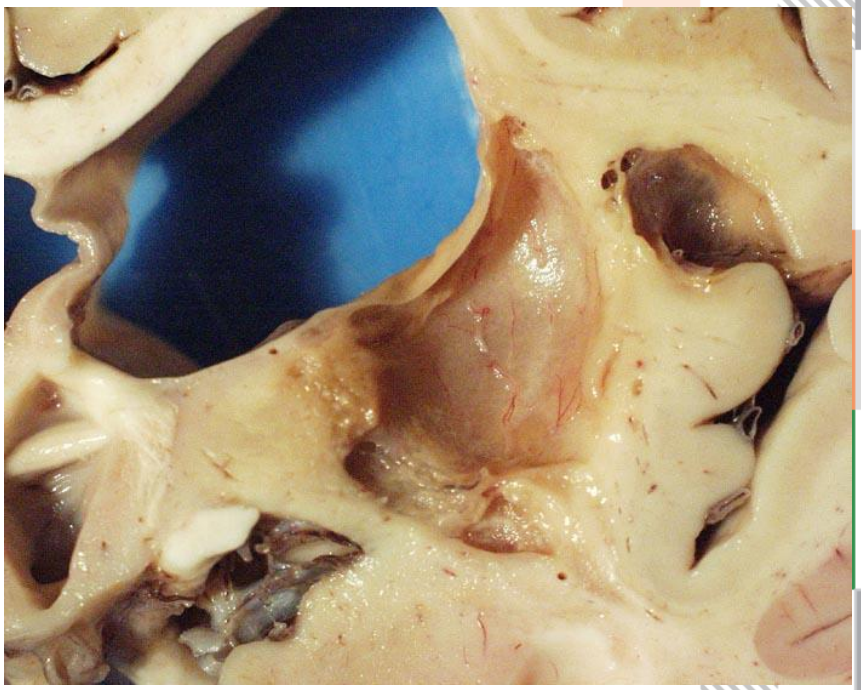
Böcker et al.: Pathologie, 4.A. © Elsevier GmbH. www.studentconsult.de

Hirninfarkt



Kolliquationsnekrose:

- Enzephalomalacia alba/rubra
- Pseudozyste



Medical University of Graz

DIAGNOSTISCHE TECHNIKEN

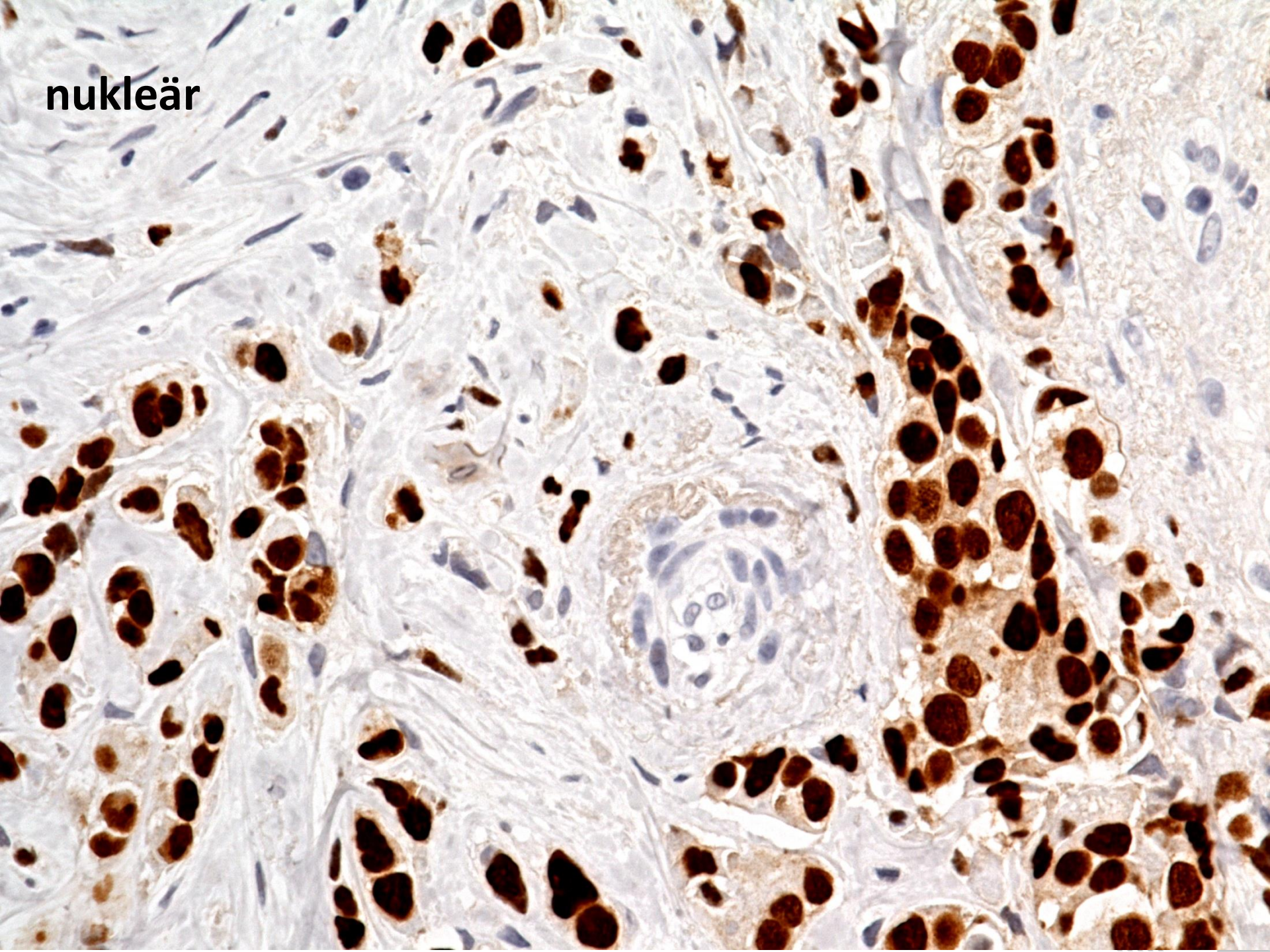
Immunhistochemie

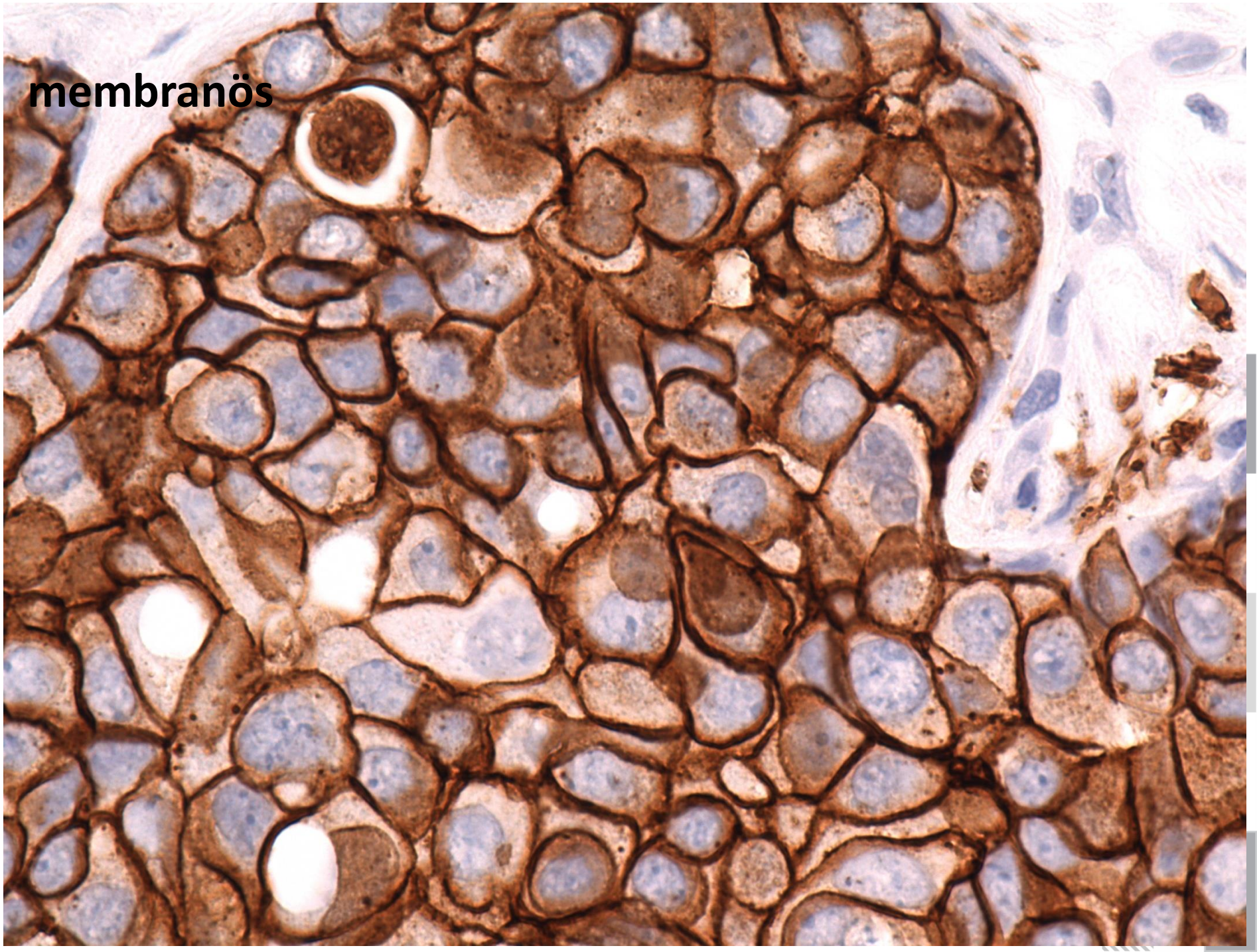
Immunfluoreszenz

Elektronenmikroskopie

Immunhistochemie

- Lokalisation v. Epitopen (Aminosäuresequenz) gesuchter Antigene
  - Zellbestandteile
  - Zytoskelett
  - Zelladhäsionsmoleküle
  - Hormone
  - Rezeptoren
  - Erreger
- Detektion und Phänotypisierung von Tumoren
- Primärer u. sekundärer Ak, Signalverstärkung
- Reaktionsmuster
- Spezifität, Sensitivität
- Epithelial, mesenchymal, neuroendokrin, hämatologisch, Proliferation…


nukleär


membranös

Detektionsmethoden

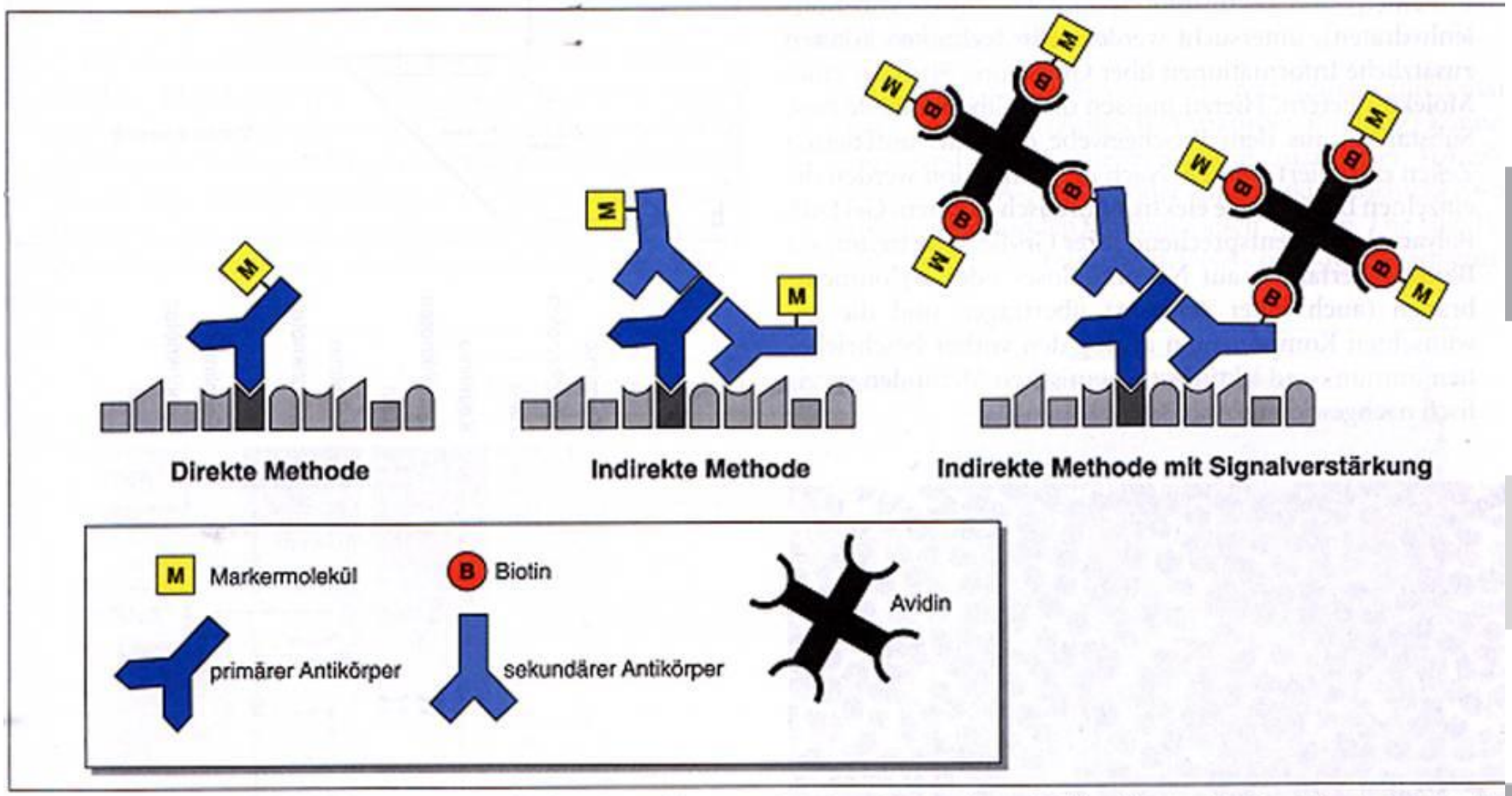
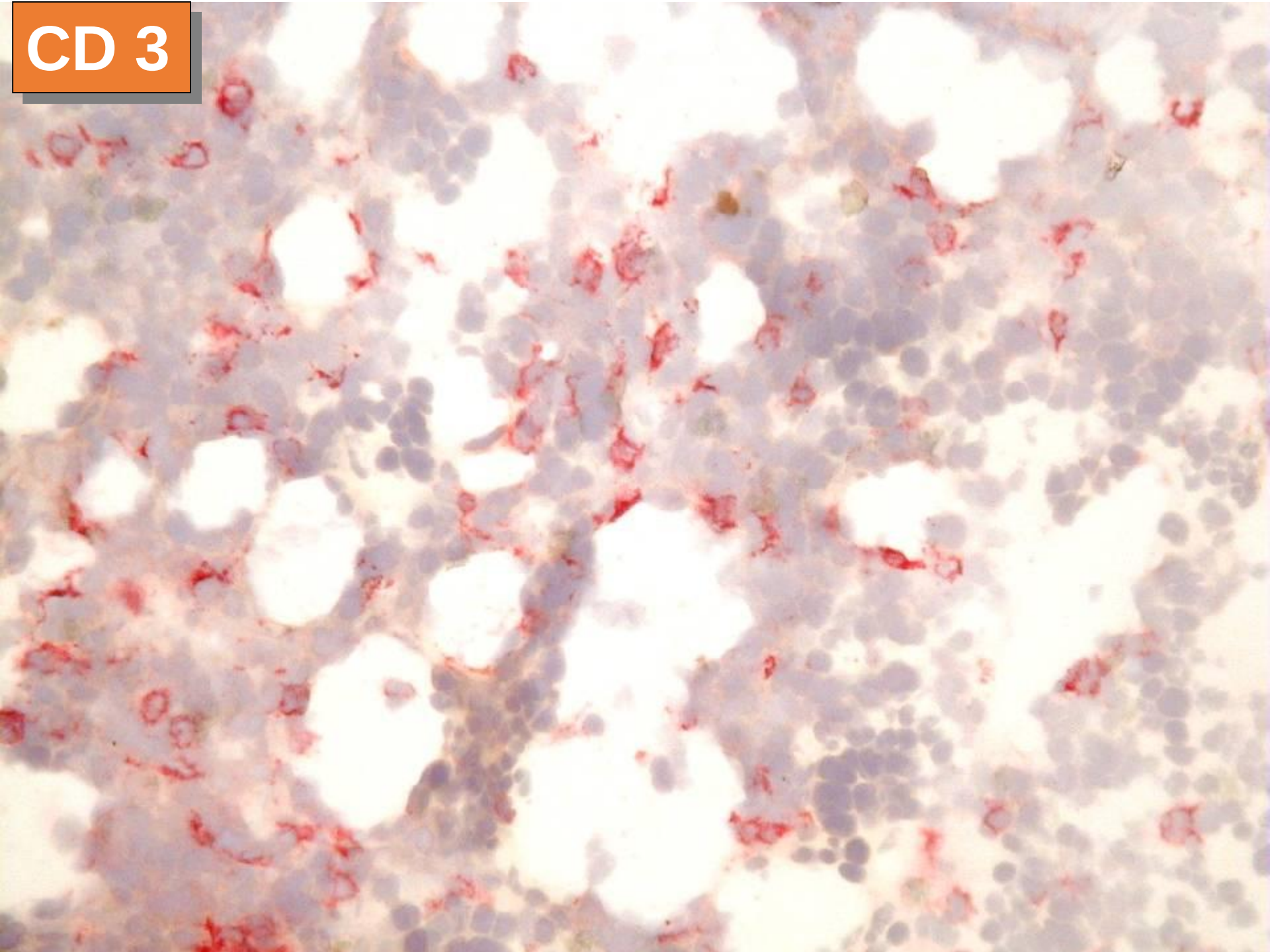


Abb. 1-7 Immunologische Verfahren zur spezifischen Darstellung von Proteinen in Gewebe und Zellen (Immunhistologie) oder in Extrakten (Western-Blot).

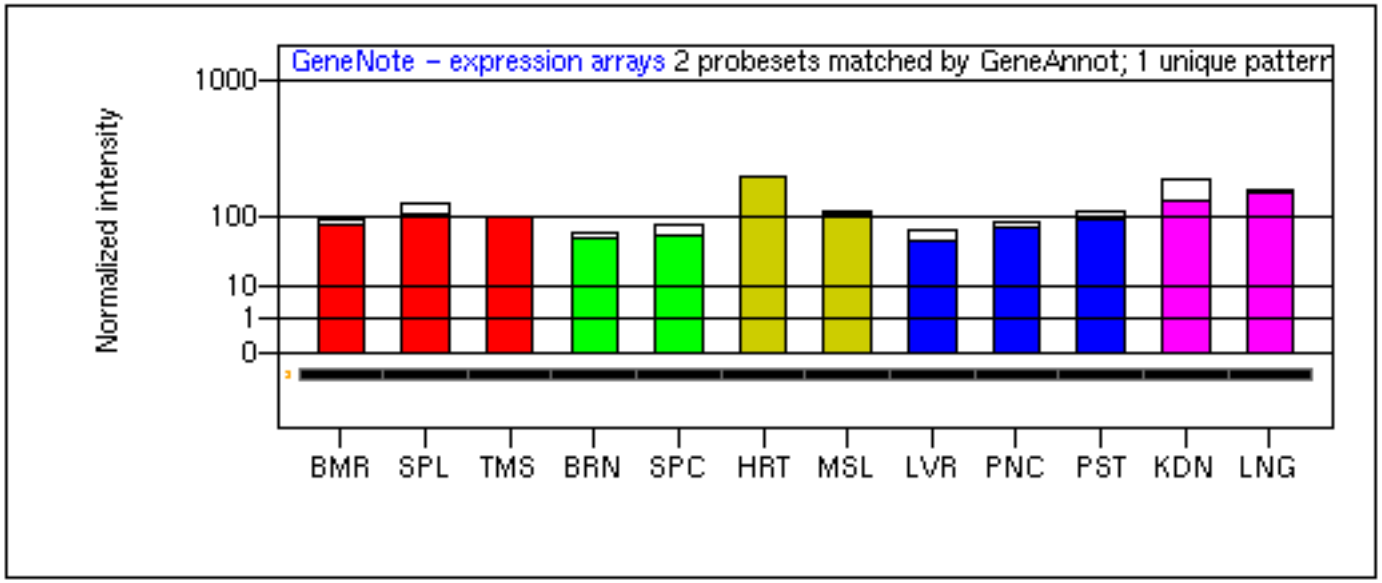
Epitope

- 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 verschiedenen Zelltypen


CD 3

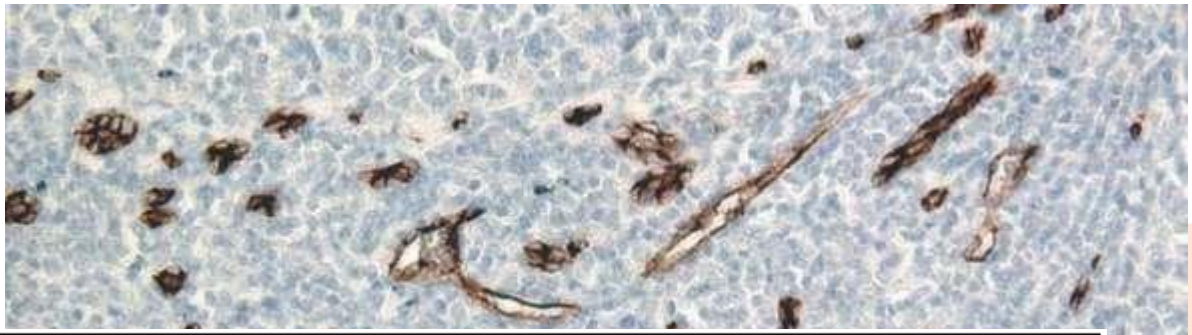
CD34

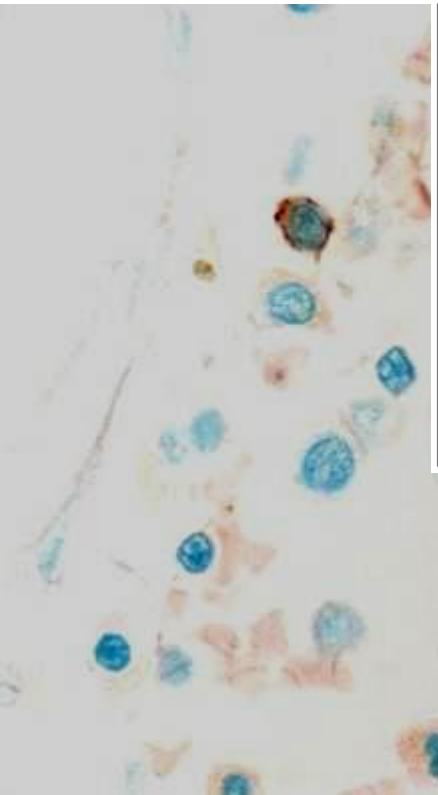
- Marker für hämatopoetische Vorstufen (Stammzellmarker)
- Endothelmarker

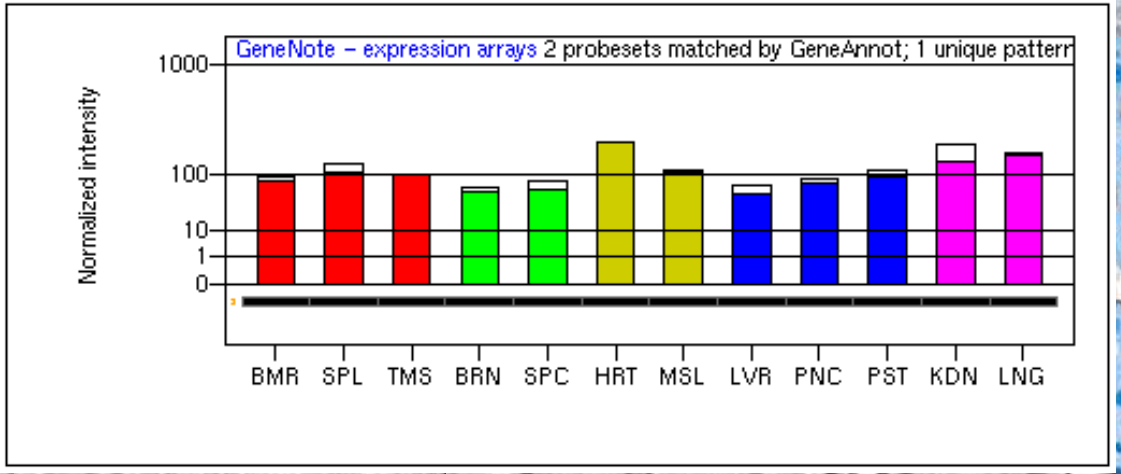


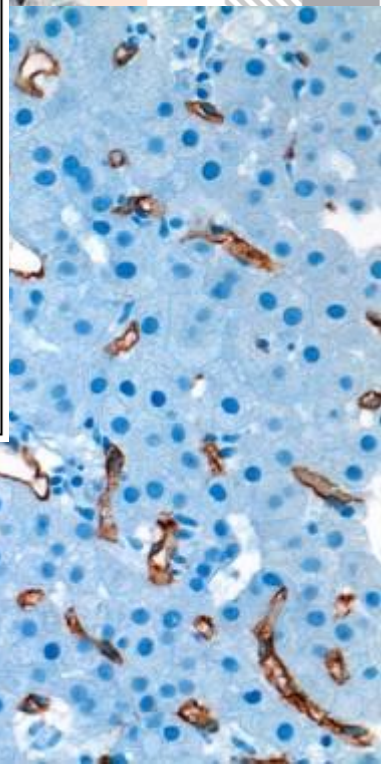
CD34

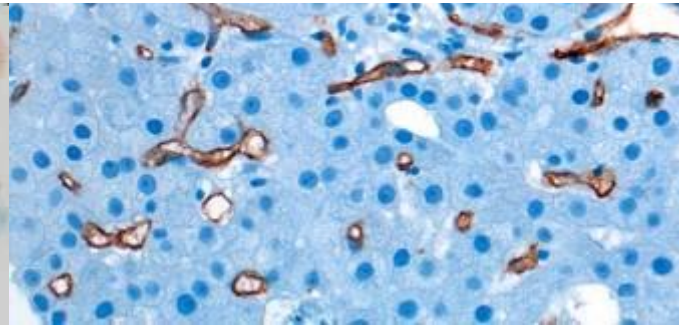
Medical University of Graz



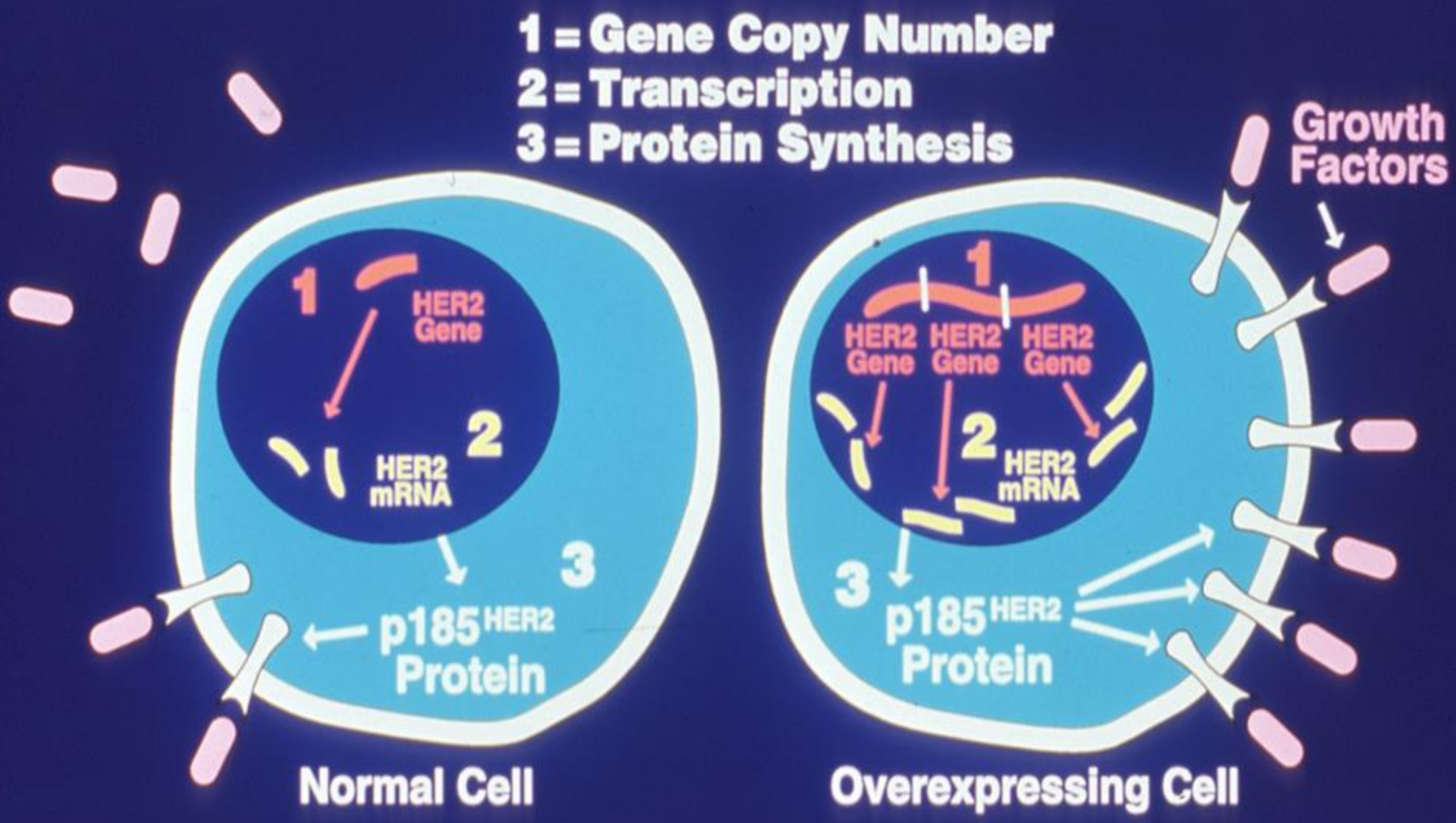






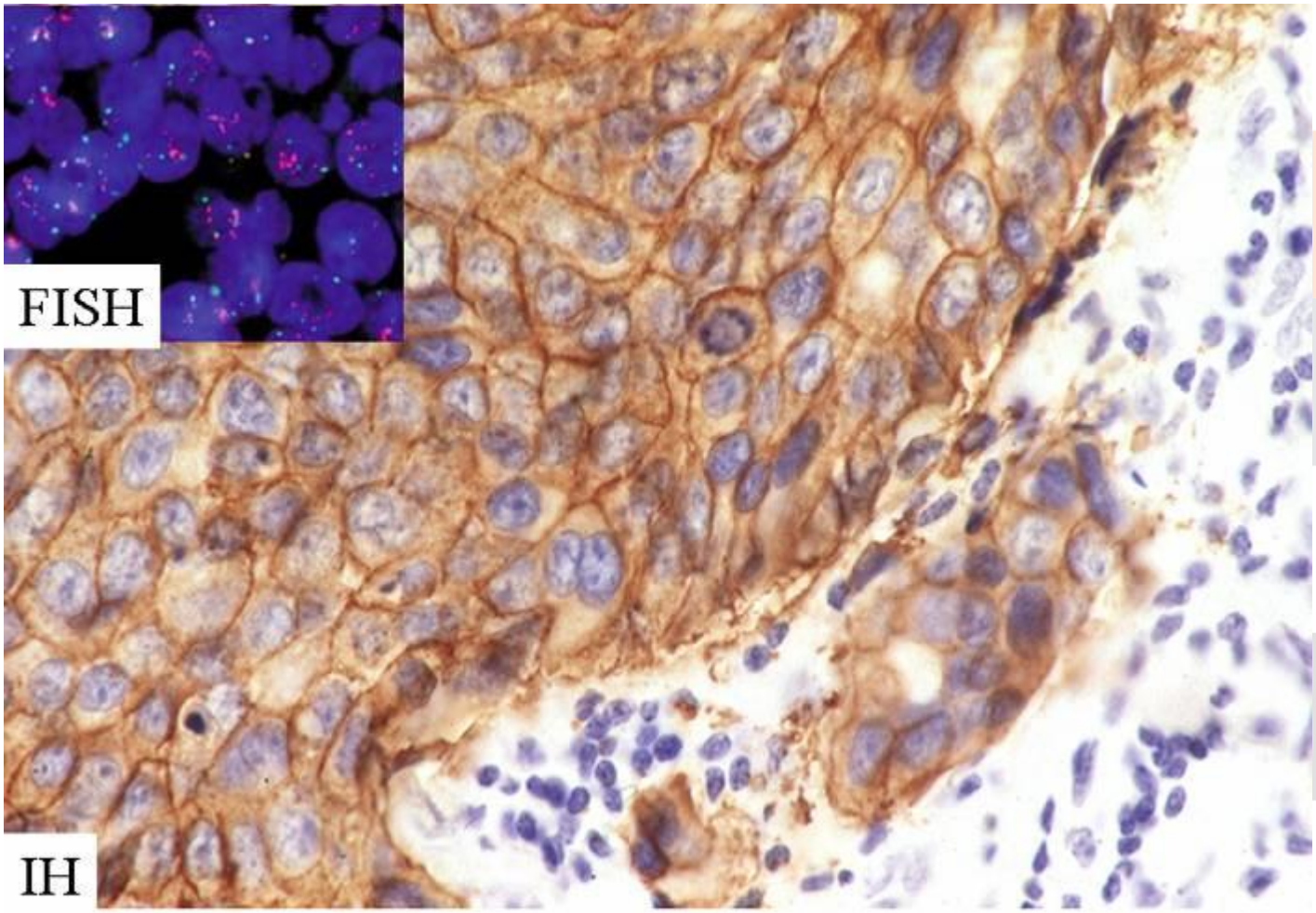


Mechanisms of HER2 Overexpression



↑ p185^{HER2} receptors = ↑ cell proliferation

Mammakarzinom: HER2 +++



Antikörper Routinediagnostik

Medical University of Graz

E-Nr.
BARCODE

	A-AT		DOG-1		KOC- 1		
	AE 1/3		EBER		LCA		
	AFP		EBV		Mammaglobin		
	ALK D5F3		E-Cadherin		MAP-2		
	Amyloid ( )		EMA		MCT		PSA
	Androgen Rezeptor		ERG		Melan A		RCC
	BerEP-4		F XIIIa		Mel A / S100 Cocktail		Retinoblastom
	Brachyury		Fibrinogen		Mesothelin		ROS-1
	BRST-2		Fibronectin		MGB		S-100
	c1q		GAL3		MIT F		S-100P
	c3c		Gastrin		MLH1		SALL-4
	c4d		GATA-3		MSH2		SATB-2
	c5b-9		GFAP		MSH6		SMA
	CA-125		Glut-1		Muc ( )		SM-Myosin
	CA-19-9		GS (Glutaminsynt.)		MyoFD5		SOX 10
	Caldesmon		5 HT (Serotonin)		NANOG		SOX 9
	Calponin		HBME-1		Napsin A		SRIF (Somatostatin)
	Calretinin		beta HCG		Nestin		STAT -6
	CAM5.2		Heliobacter		Neuroblastom (NB84)		Surf. Apo ( )
	CD 3		Hep cell AG		NF		SV -40 BK
	CD 10		HHF35		NSE		SYN
	CD 20		HMB45		NUT		Tenascin
	CD 31		HMW		OCT 3/4		TFE3
	CD 34		HPV ( )		Olig2		Thrombomodulin
	CD 56 / NCAM		HSP-70		p16		TLE1
	CD 68		HSV ( )		p40		Trypsin
	CD 99		IgA		p53		TTF-1
	CD 117 (c-KIT)		IgG		p57		TTF-1 / CK5
	CD 146		IgG4		p62CT		Tyrosinase
	CD 163		IgM		p63		Ubiquitin
	CDX-2		Inhibin		PAX ( )		Vim
	CEA ( )		INI 1 (BAF47)		PD-L1 22C3		WT-1
	CG		Involucrin		PGP-9,5		**Sonderwünsche**
	Claudin ( )		JC		pHist H3		
	CMV		Ker (pan)		PIN -4 Cocktail		
	D2-40		Ker ( )		PLAP		HE
	Desmin		Ki-67		PMS-2		Leerschnitte ( )

Medical University of Graz

Befundung

Laborbestellung

Information

E-Nummer: 93211/2022

Alle Schnitte Neu

Liefern an: Viertler Christian

Besteller: Viertler Christian

Priorität: (keine)

Quelle/Typ: Block | EK 1_Cito | Immunhistochemisches Labor

Leeren | Zur Bestellung hinzufügen | Bestellen | Bestellungen vergrößern

Dokumentanzeige | Laborbestellung

Allgemeine Marker

- pan-TRK Assay [EPR17341]
- PD-L1 [SP142]
- PD-L1 (SP263) Assay
- PD-L1 [22C3]
- SALL4 (M03) [6E3]
- Stat6 [D-1]
- BAF47 (INI1) SNF5, SMARCB1
- BRG1 (SMARCA4) [EPNCIR11
- **SATB2 [EP281]**
- TFE3 (P-16)
- TLE1 [1F5]
- Brachyury (H-210)
- p40 [BC28]
- p53 Protein [DO-7]
- p63 Protein [DAK-p63]
- Trimethyl-Histone H3 (Lys27)
- **Beta-Catenin [14]**
- Vimentin [V9]
- ALK [D5F3]
- NKX3.1 [EP356]
- SS18-SSX [E9X9V]
- PRKAR1A (OTI6C7)

Myogene Marker

- **Smooth Muscle Actin [1A4]**
- **Desmin [D33]**
- Muscle Actin [HHF35]
- MyoD1 [5.8A]
- Myogenin [F5D]
- Caldesmon [h-CD]

Melanom Marker

- Melan-A [A103]
- Melanosome [HMB45]
- Melanosome [HMB45] Magenta
- **S100**
- Microphthalmia transcription fa
- SOX-10 [SP267]

Metastasen Marker

- GATA-3 [L50-823]
- Thyroid Transcription Factor [S
- CDX2 [DAK-CDX2]
- Estrogen Rezeptor alpha [EP1]
- Progesteron Receptor Clone [F
- Pathway anti-HER-2/neu [4B5]
- PAX 8 [SP348]
- EMA [E29]
- MUC4 [8G7]

Keratin Marker

- **Pan Cytokeratin [BS5]**
- Cytokeratin [AE1/AE3]
- Cytokeratin [CAM 5.2]
- Cytokeratin 5/6 [D5/16 B4]
- Cytokeratin 7 [OV-TL 12/30]
- Cytokeratin 20 [SP33]

Neuro-endokrine Marker

- Chromogranin A [LK2H10+PHE
- Synaptophysin [DAK-SYNAP]
- Neuron Specific Enolase [BBS/I
- CD56 [MRQ-42]
- Glial Fibrillary Acidic Protein

Vasculäre Marker

- Endothelial Cell CD31 [JC70A]
- **CD34 Class II [QBEnd 10]**
- Podoplanin [D2-40]
- WT1 [6F-H2]
- **ERG (EPR3864(2))**
- Von Willebrand Factor [F8/86]
- Coagulation Factor XIIIa
- Calmodulin binding transcriptio

Hämatologische Marker

- CD3
- CD20cy [L26]
- CD30 [HRS4]
- CD68 [KP-1]
- CD138 [MI15]
- CD45, Leucocyte Common Anti

Rundzellige Marker

- CD99, MIC2 Gene Product [12E
- WT1 [6F-H2]
- ETS Translocation Variant 4, Pc
- NKX2-2

Proliferations Marker

- Ki-67 [MIB-1]
- Histone H3.3 G34W [RM263]

Lipomatöse Marker

- MDM2 [IF2]
- Cdk4 [DCS-35]
- **CD34 Class II [QBEnd 10]**
- Retinoblastom [G3-245]

GIST Marker

- CD117 c-kit
- Dog1 [SP31]

Welcher Antikörper?

- Gute Quellen?
  - Kataloge
  - Internet (zB NordiQC)
  - Firmenvertreter
  - Mundpropaganda/Erfahrung
- Aussagen über Verwendbarkeit zu unterschiedlichen Zwecken
  - Immunoblot, Gefriermaterial, Paraffinmaterial etc.

Estrogen Receptor

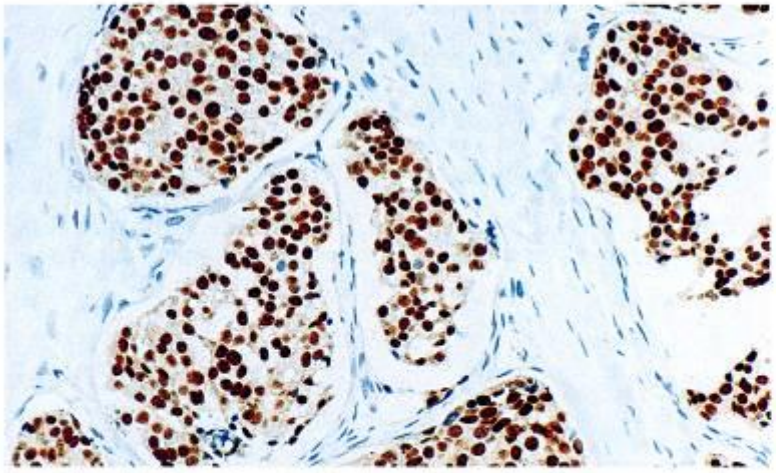
Clone 6F11

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 (Bevitt D J 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.

Estrogen Receptor (beta)

Clone EMR02

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

Estrogen Receptor alpha (ERα) and beta (ERβ) 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. ERα is the highly characterized estrogen receptor cloned originally from a human breast cancer cell line with ERβ more recently identified in rodents and now in humans. ERβ is reported to be expressed as multiple isoforms. ERβ, unlike ERα, 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.

Polyklonale (vs. monoklonale) Antikörper

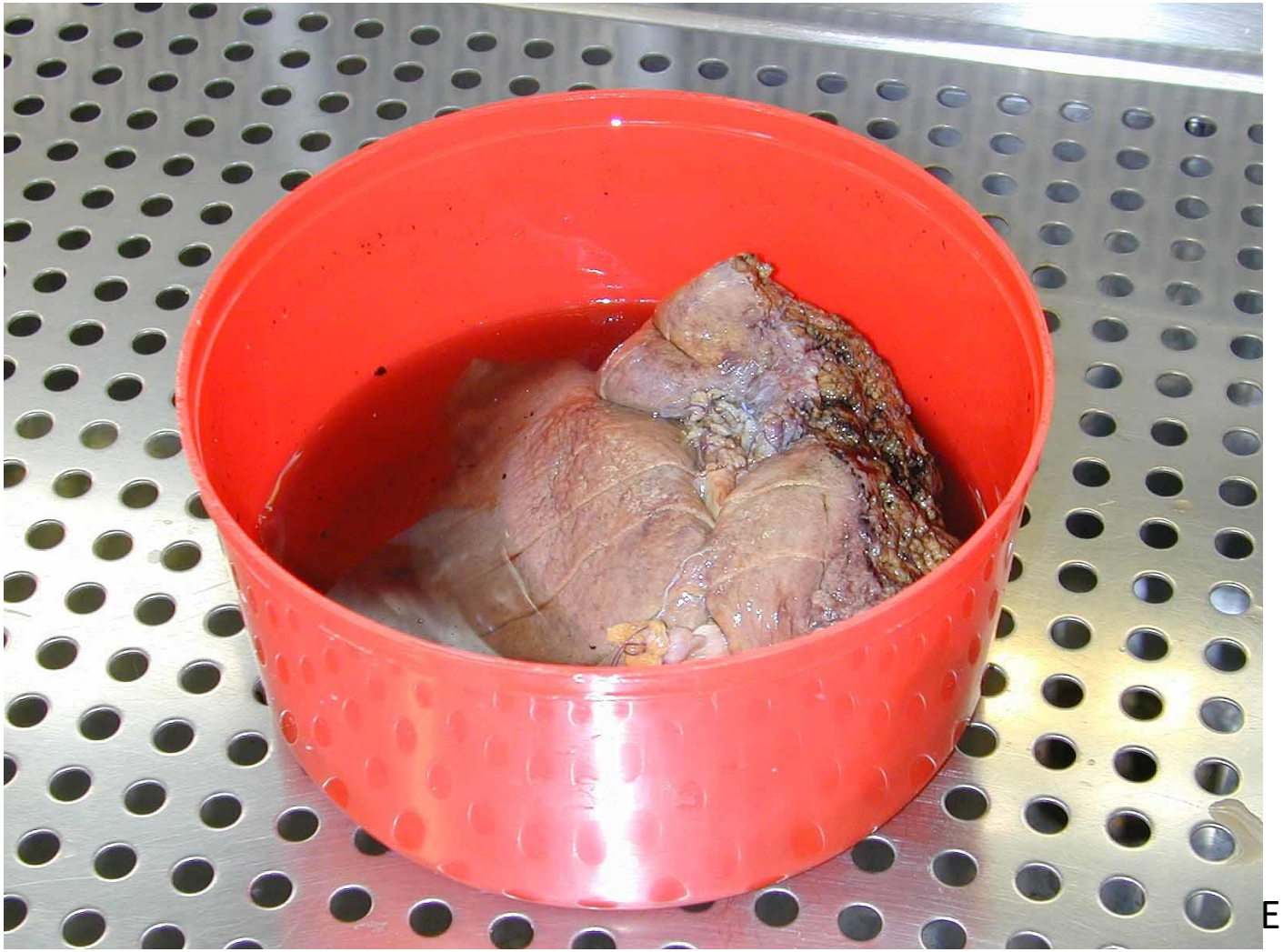
- Vorteile
  - Erkennen mehrere Epitope
  - Weniger anfällig auf Fixierungsunterschiede, pH
  - Meist billiger
- Nachteile
  - Häufiger unspezifische Reaktionen
  - Begrenzte Reproduzierbarkeit
  - Begrenzte Liefermöglichkeit
  - Oft nicht aufgereinigt (Gelfiltration), häufiger Hintergrund
  - Ascitesflüssigkeit: hoher Anteil an unspezifischen Proteinen

IHC – Durchführung, Interpretation

Medical University of Graz

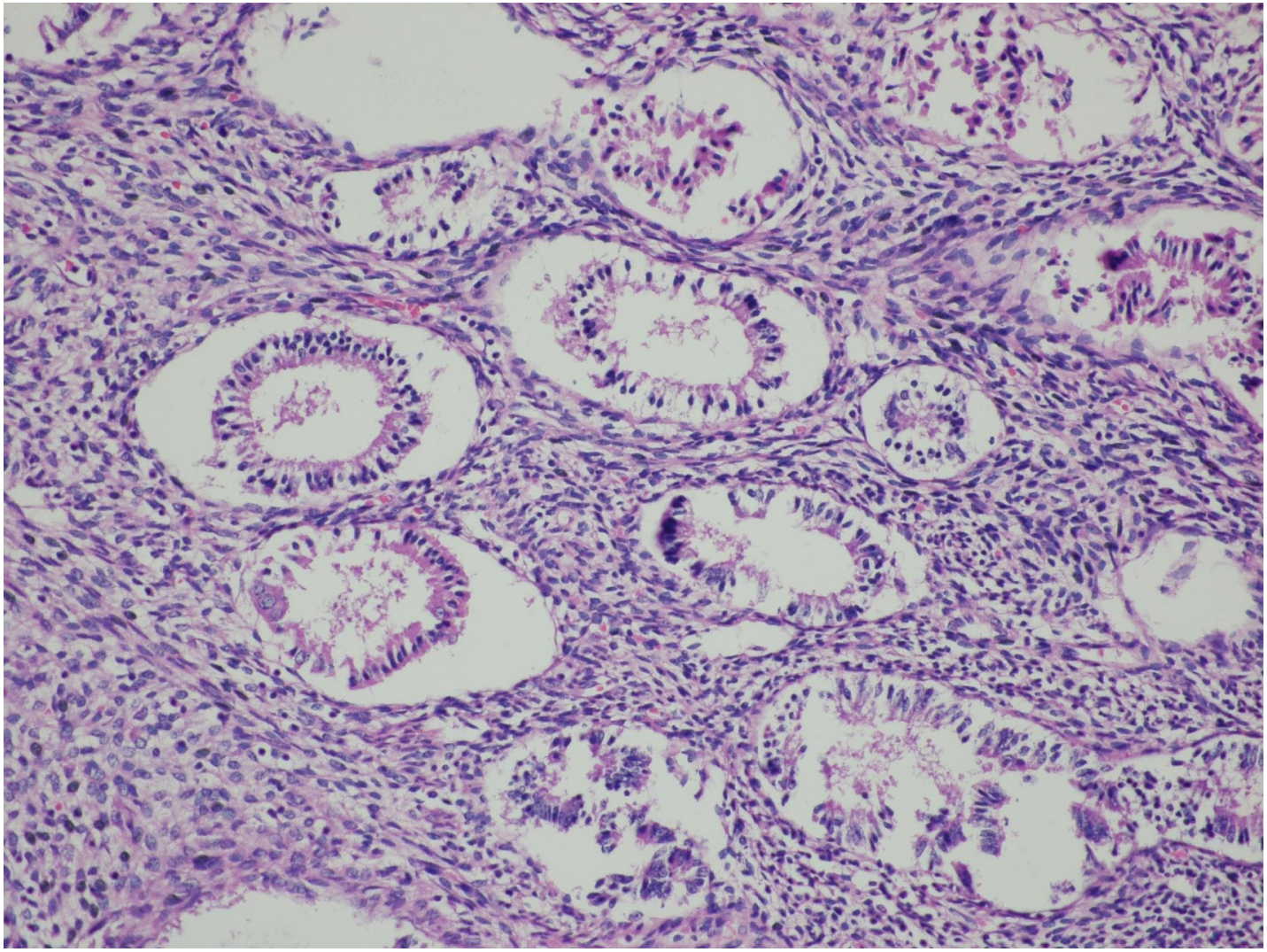
- Gewebeasservierung
- Gewebeaufarbeitung
  - Tissue arrays
- IHC Durchführung, Detektionsmethoden
  - Pitfalls, Qualitätskontrollen
  - Geräte, Automatisation
- Reaktionsmuster
- Spezielle Anwendungen

Zu wenig Formalin…



Empfehlung 1:10

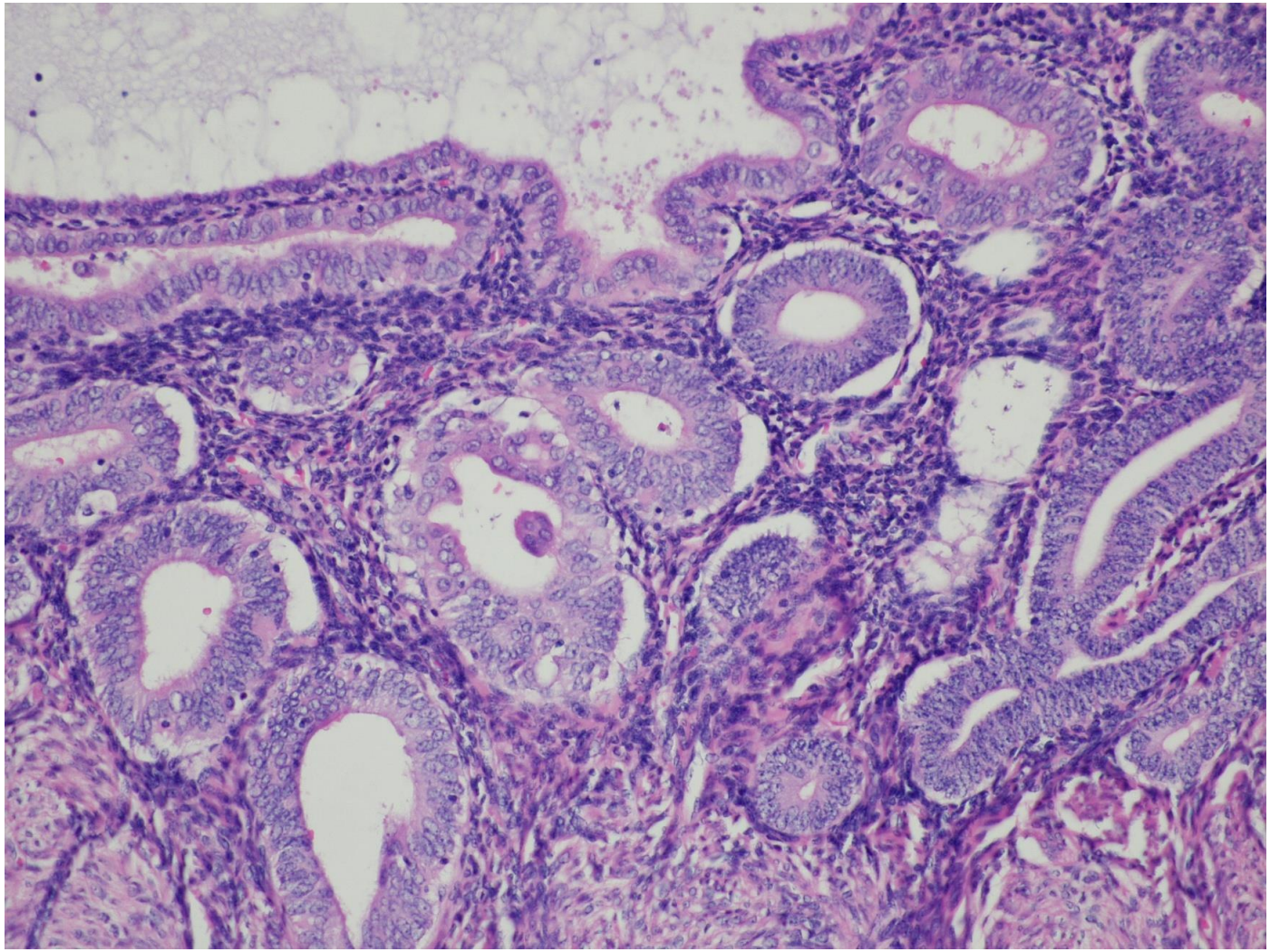
Resultat



Dickdarm-
schleimhaut

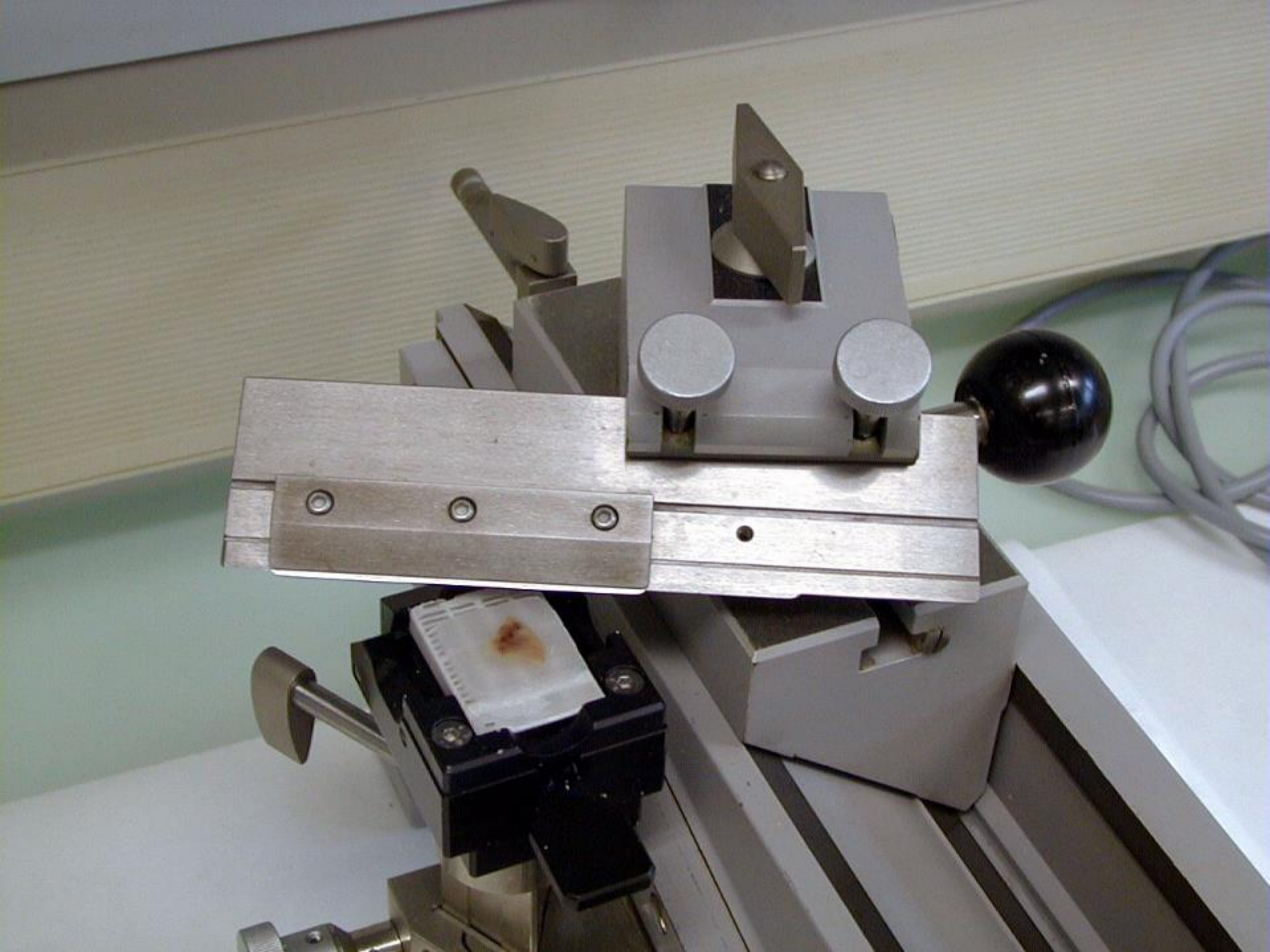
Gute Fixierung

Medical University of Graz



Gewebeaufarbeitung

- Einer der entscheidensten Schritte der IHC
- Fixierung – Antigen/Target retrieval
  - Proteincrosslinking durch Formalinfixierung
  - Enzyme, Hitze, Buffer
- Gefrierschnitte
  - Schlechtere Qualität der Morphologie
  - Höherer Aufwand
  - Teure Aufbewahrung
  - Für einige Epitope trotzdem notwendig

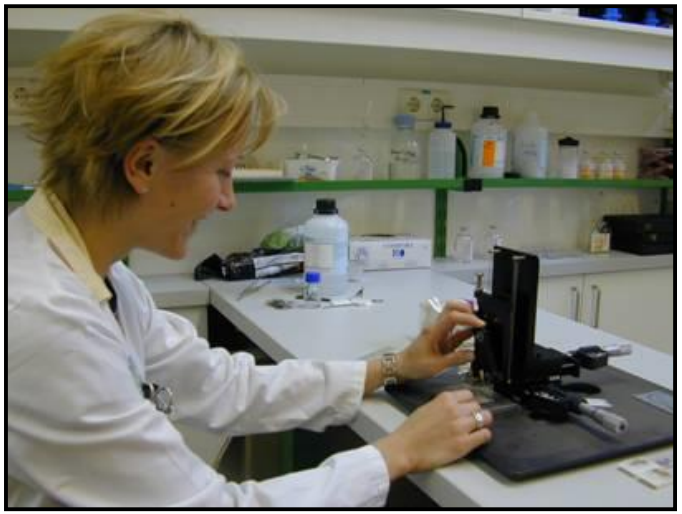


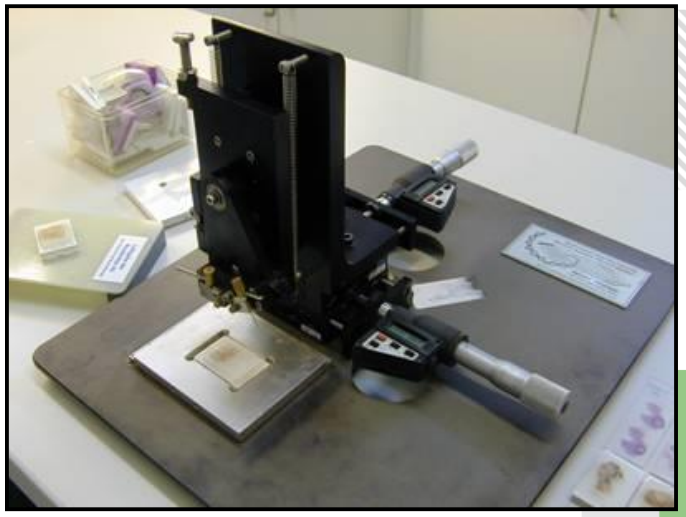
Gewebe-Mikroarray

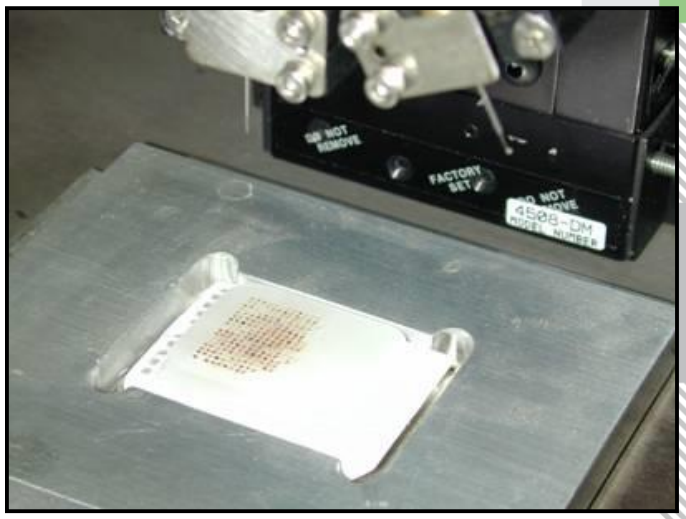
- Vorteile:
  - Mehrere hundert Gewebeproben in einem Paraffinblock
  - Gute Vergleichbarkeit in technischer Hinsicht
  - Geringere Kosten für IHC
- Nachteile:
  - Hoher Aufwand in der Herstellung
  - Wesentlich kleinerer Gewebsausschnitt zur Beurteilung

Gewebe-Mikroarray

Medical University of Graz

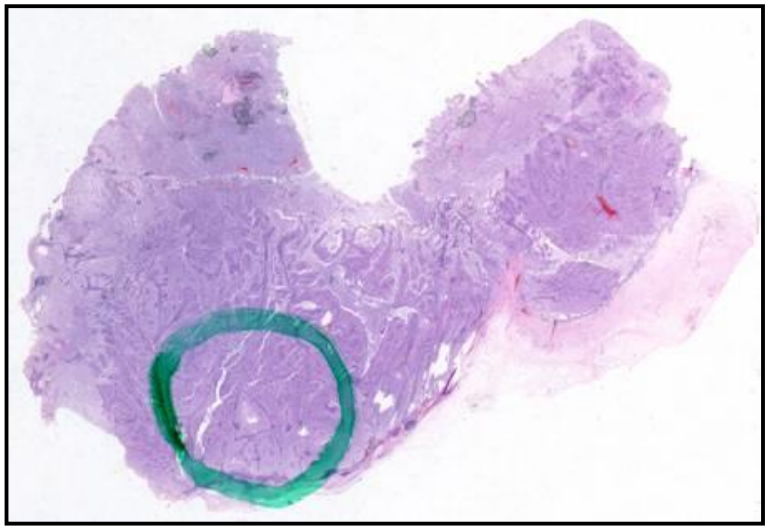


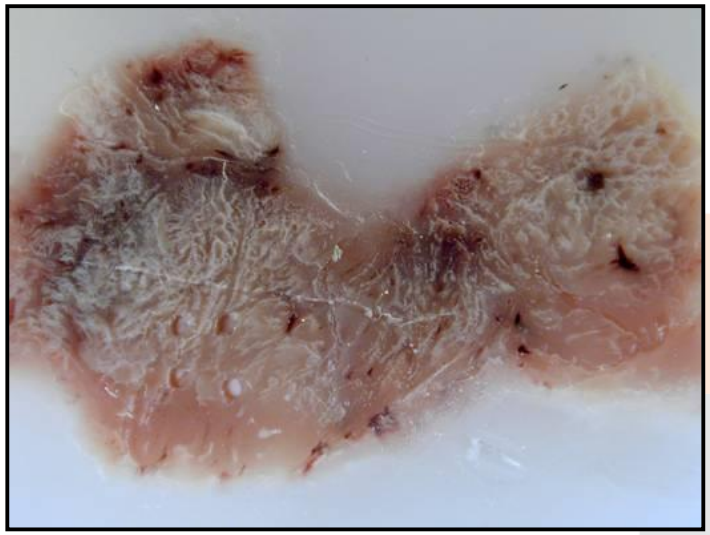


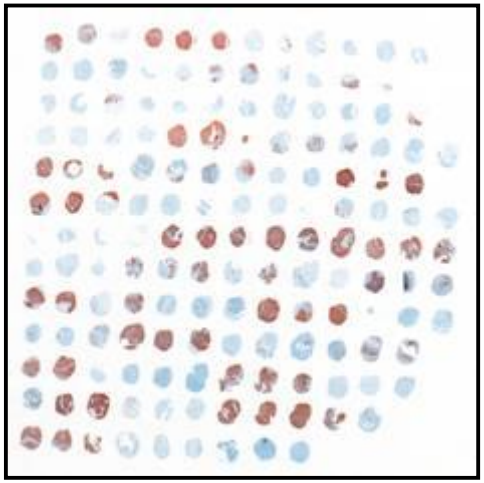


Gewebe-Mikroarray

Medical University of Graz







Antigen Demaskierung (antigen/target retrieval)

Medical University of Graz

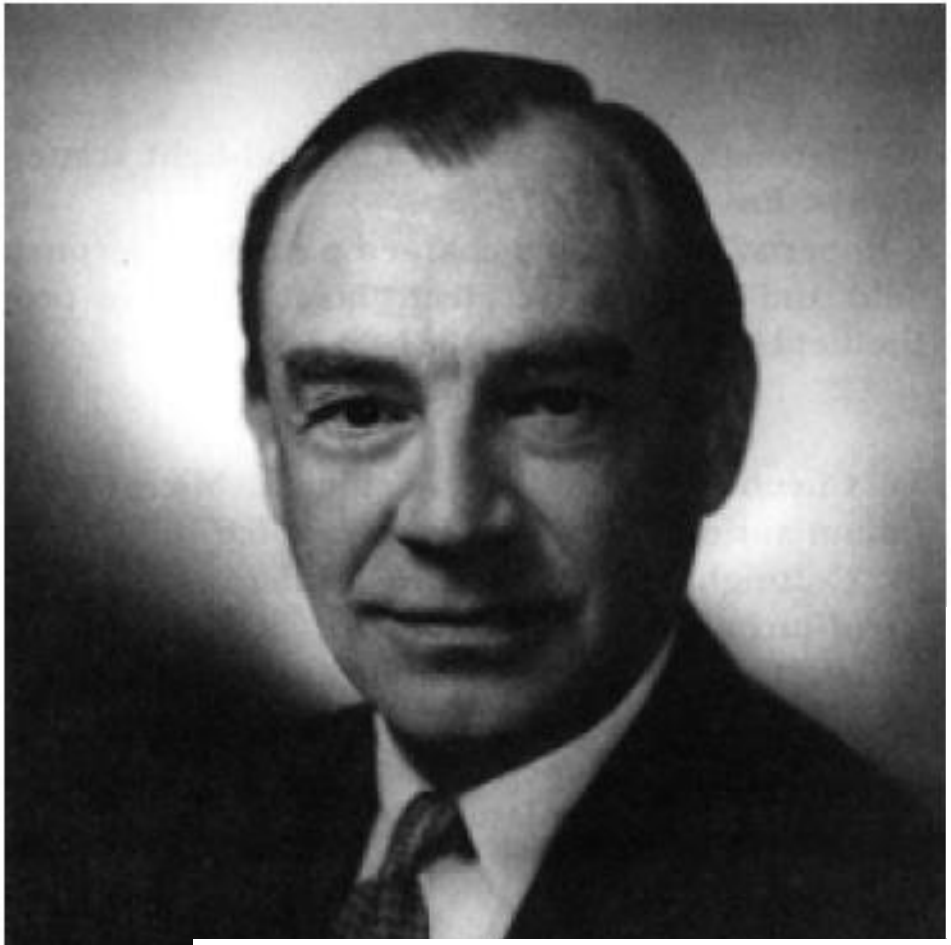
- Hitzeverfahren
  - Mikrowelle: 20-30min
  - Druckkochtopf
    - Citratpuffer pH 6.0
    - TRIS-EDTA pH 9.0
- Proteolytischer Verdau
  - Proteinase K, Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Pronase etc.
- Kombinationsverfahren

IHC Durchführung

- Blockieren
- AK Bindung
- Waschen
- Visualisierung der Immunreaktion

Visualisierung der AG-AK Reaktion

- Enzym – Farbstoffumsetzung
  - Peroxidase (1966)
  - Alkalische Phosphatase (1978)
- Fluoreszenzfarbstoff
- Colloidales Gold
- Radioaktive Markierung



Medical University of Graz

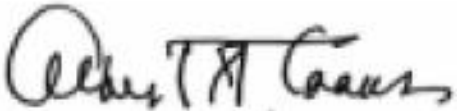
ibrary

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

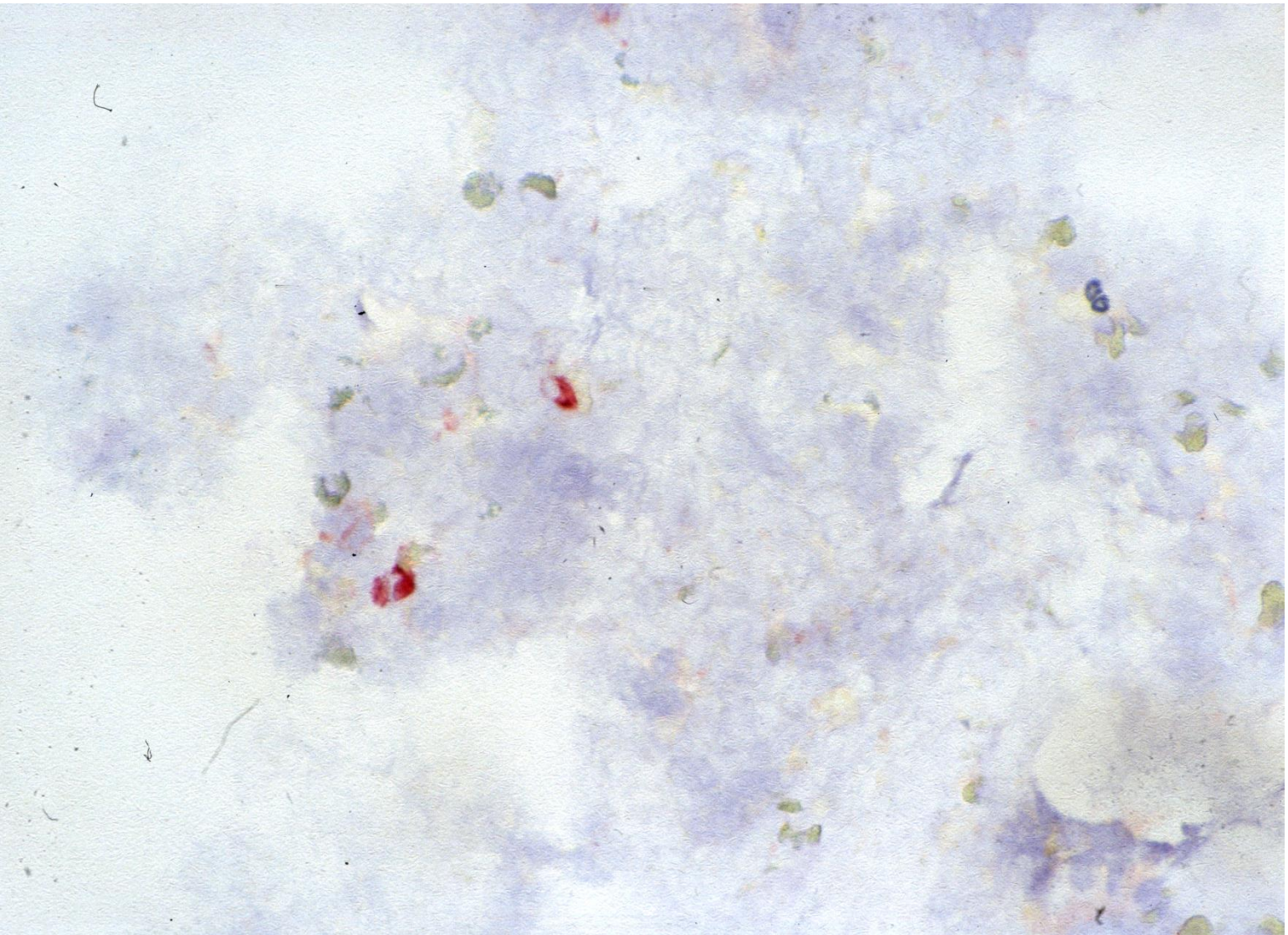
Albert H. Coons, Hugh J. Creech and R. Norman Jones
Department of Bacteriology and Immunology, Harvard Medical School, and the Chemical Laboratory, Harvard University
Proc. Soc. Exp.Biol.Med. 47:200-202, 1941



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

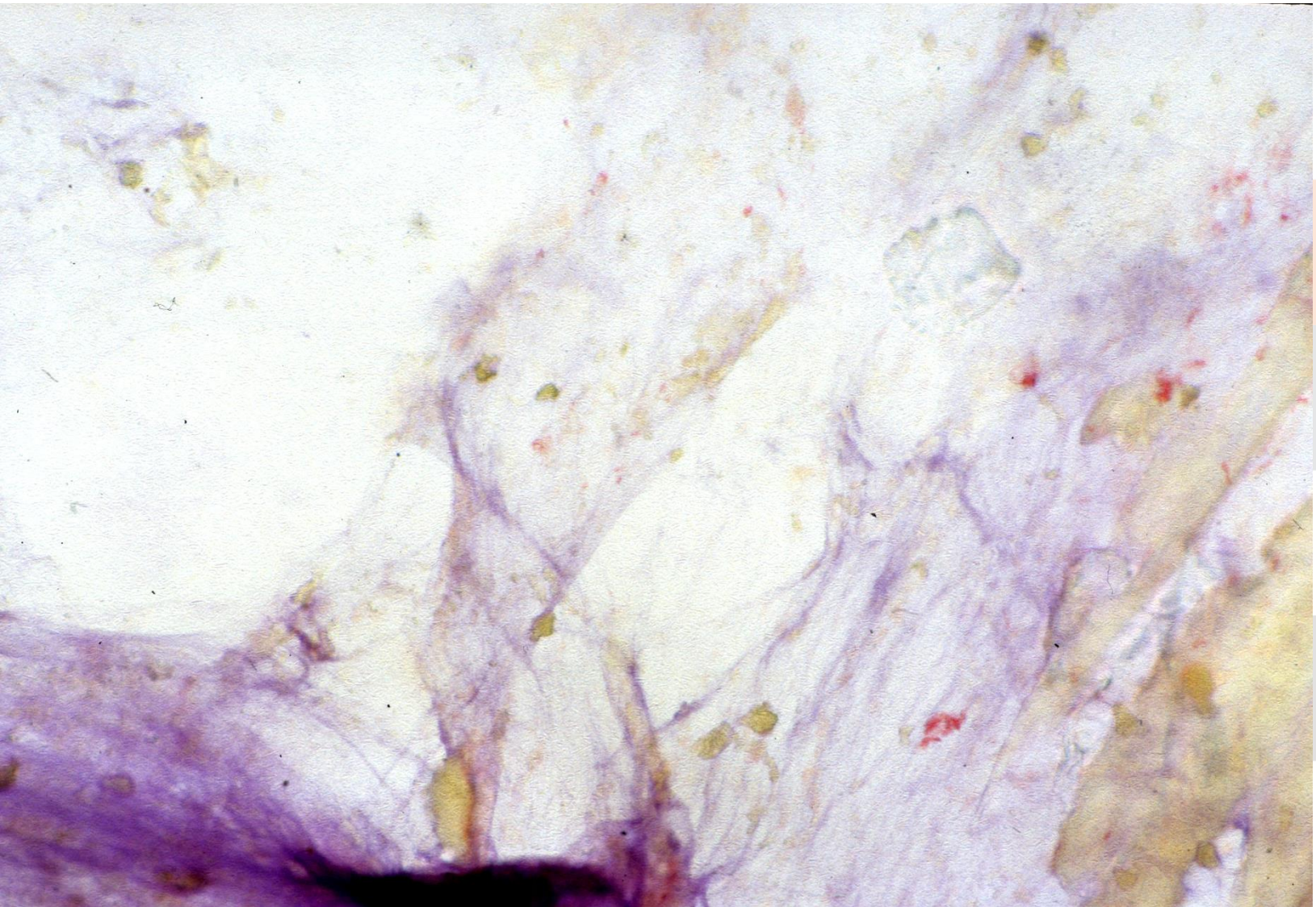
Unzureichende Fixierung



Knochenmark
IG Leichtkette
kappa

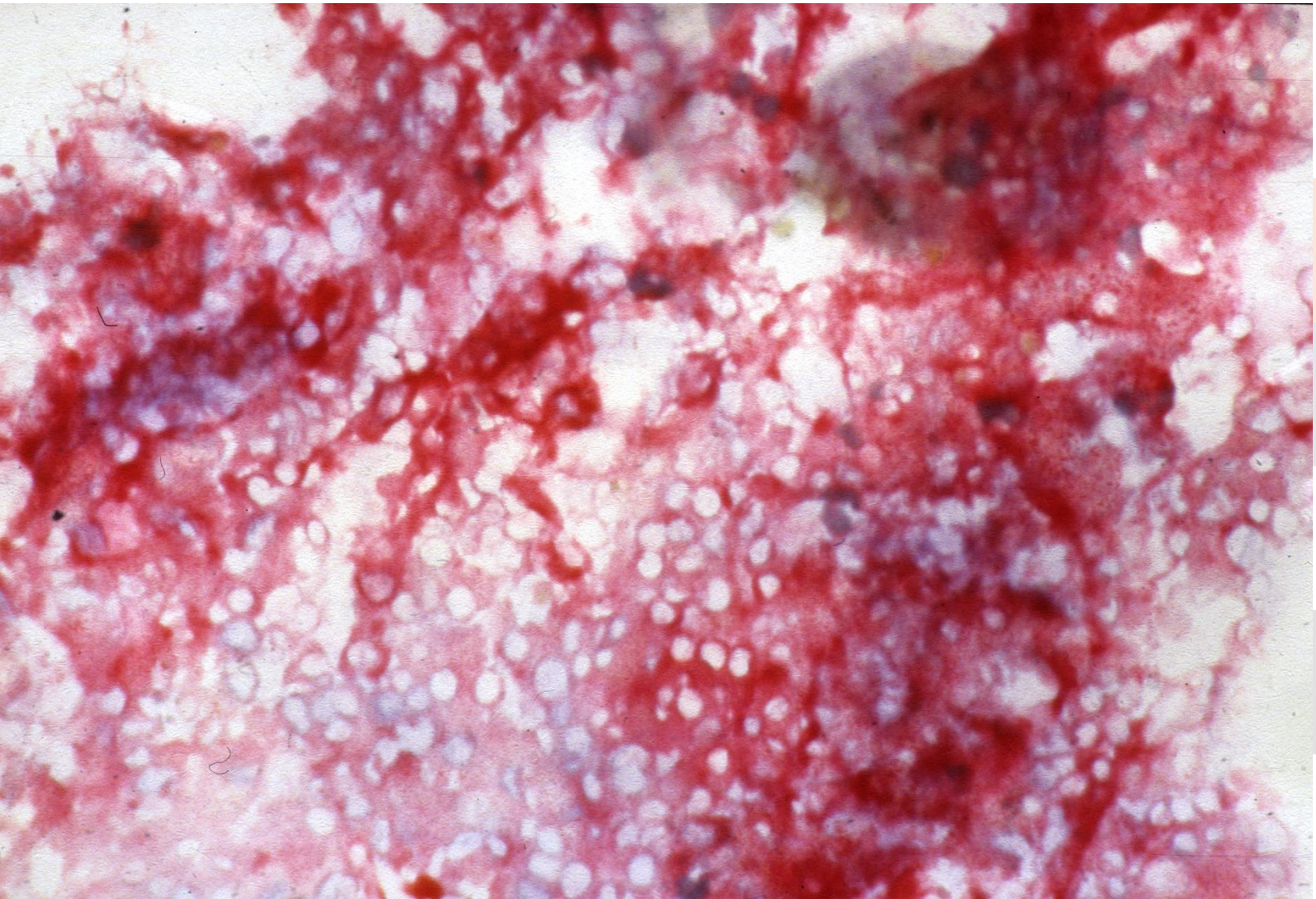
Zu intensive Mikrowellenbehandlung

Medical University of Graz



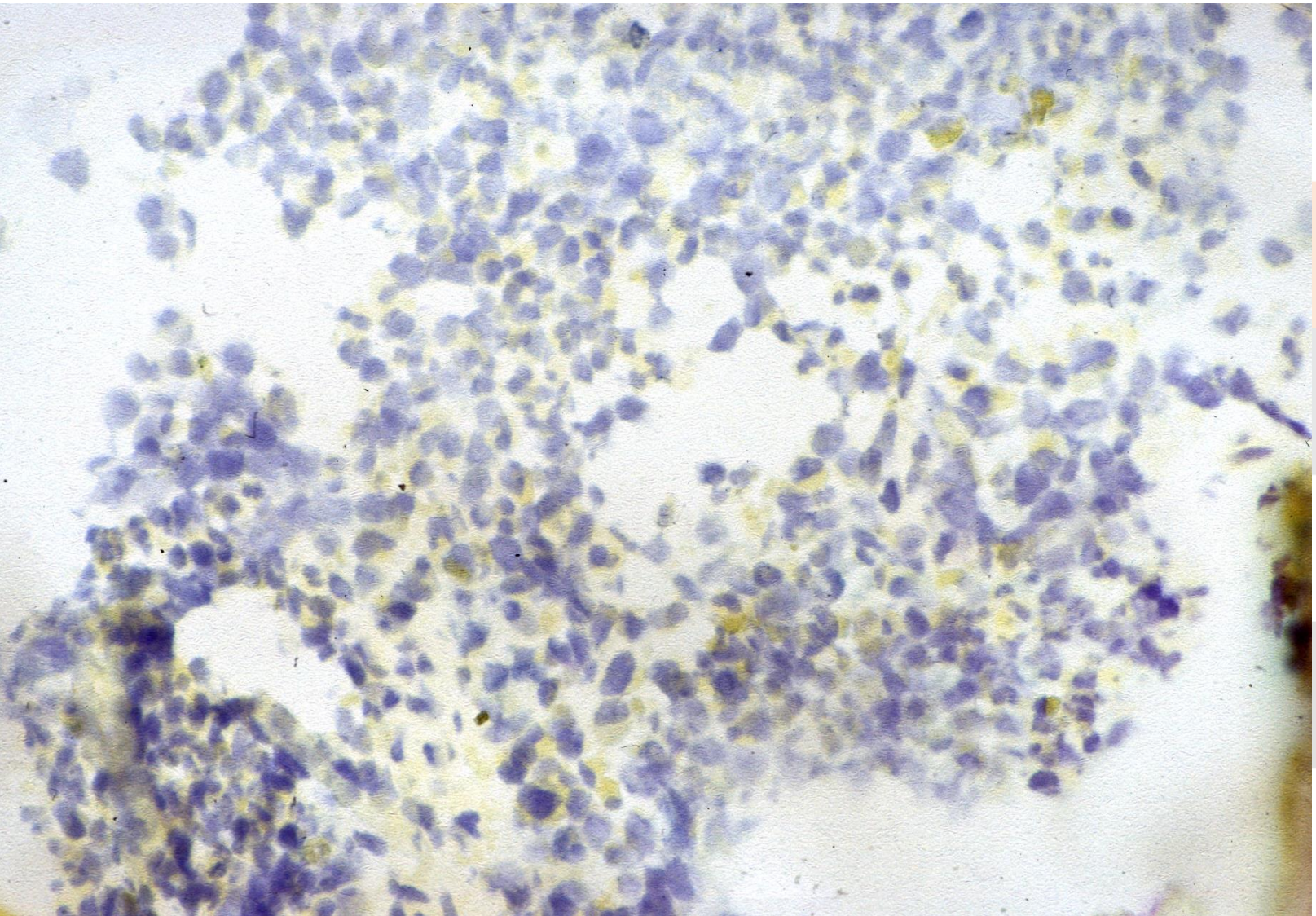
Unzureichende Enzymhemmung

Medical University of Graz

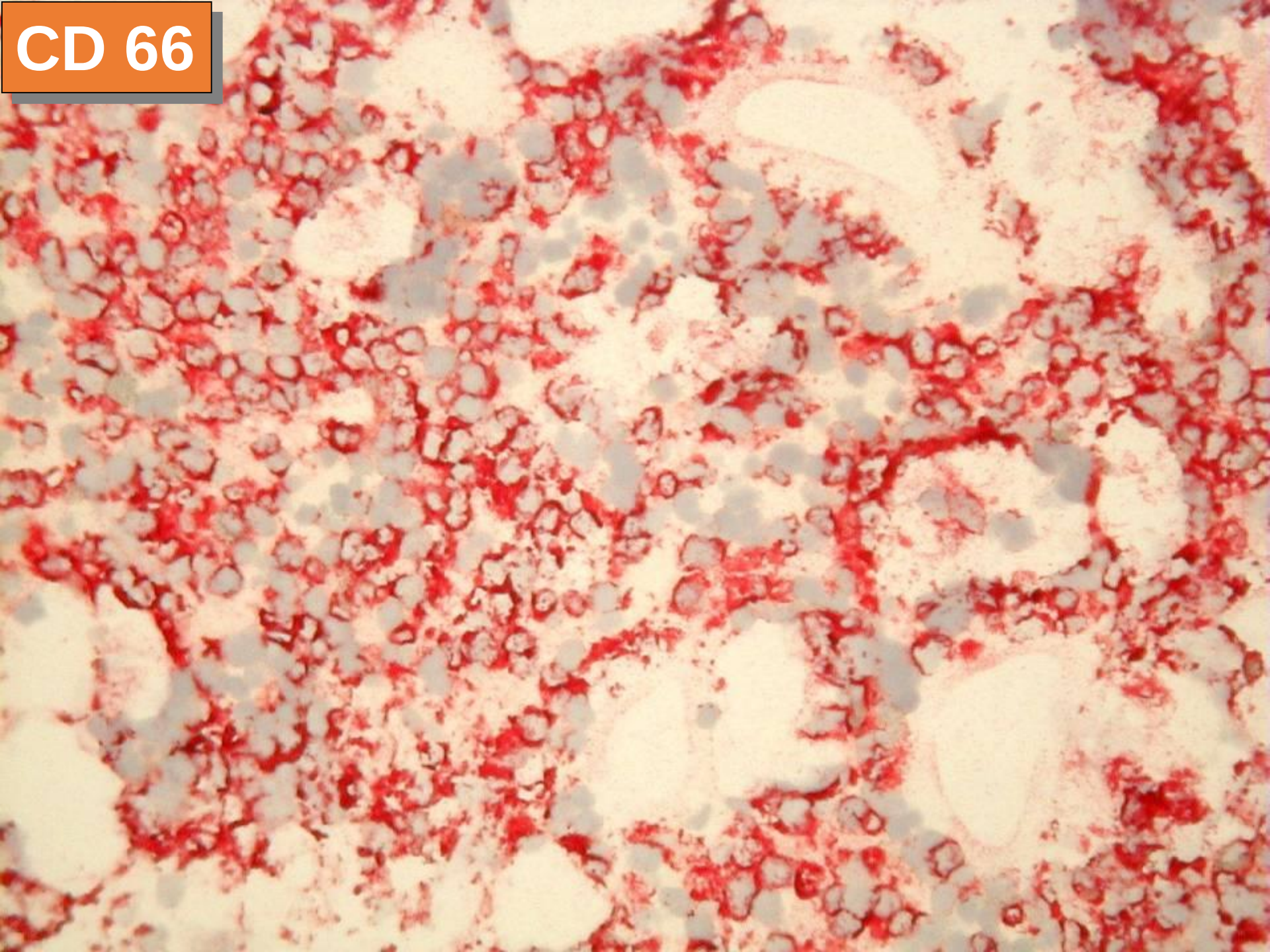


Knochen-
mark

Substrat zu alt



Knochen-
mark


CD 66

Automatisierung

- Vorteile
  - Hoher Durchsatz
  - Arbeitsersparnis
  - Konstante Qualität
  - Exaktes Einhalten der Inkubationszeiten
  - Reproduzierbarkeit
  - Horizontal vs. vertikal
- Nachteile
  - Kosten
  - Keine “individuelle” Behandlung von Schnittpräparaten und Antikörpern
  - Kein manueller Stopp der Farbreaktion

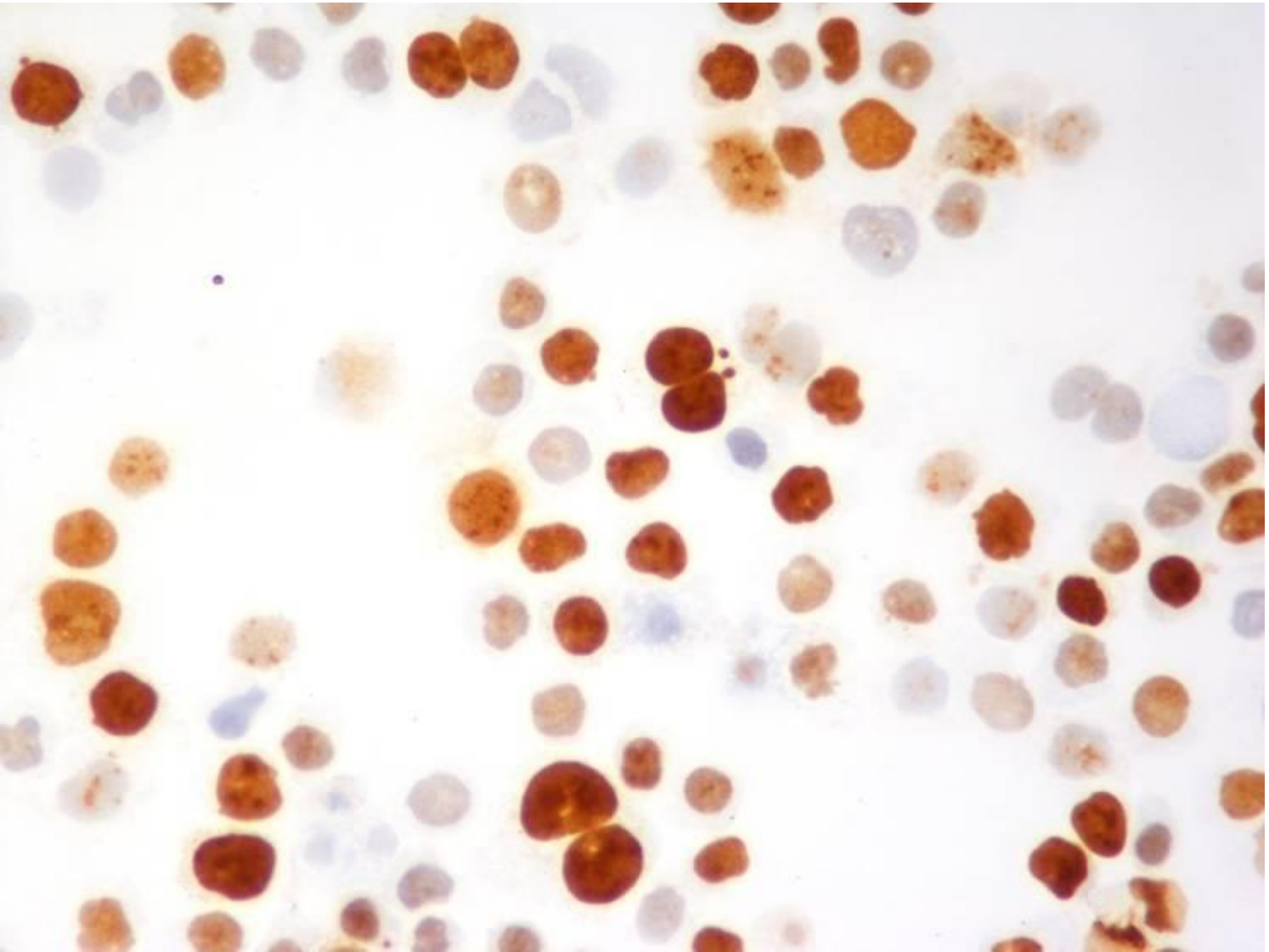
Automatisierung

Medical University of Graz

Reaktionsmuster

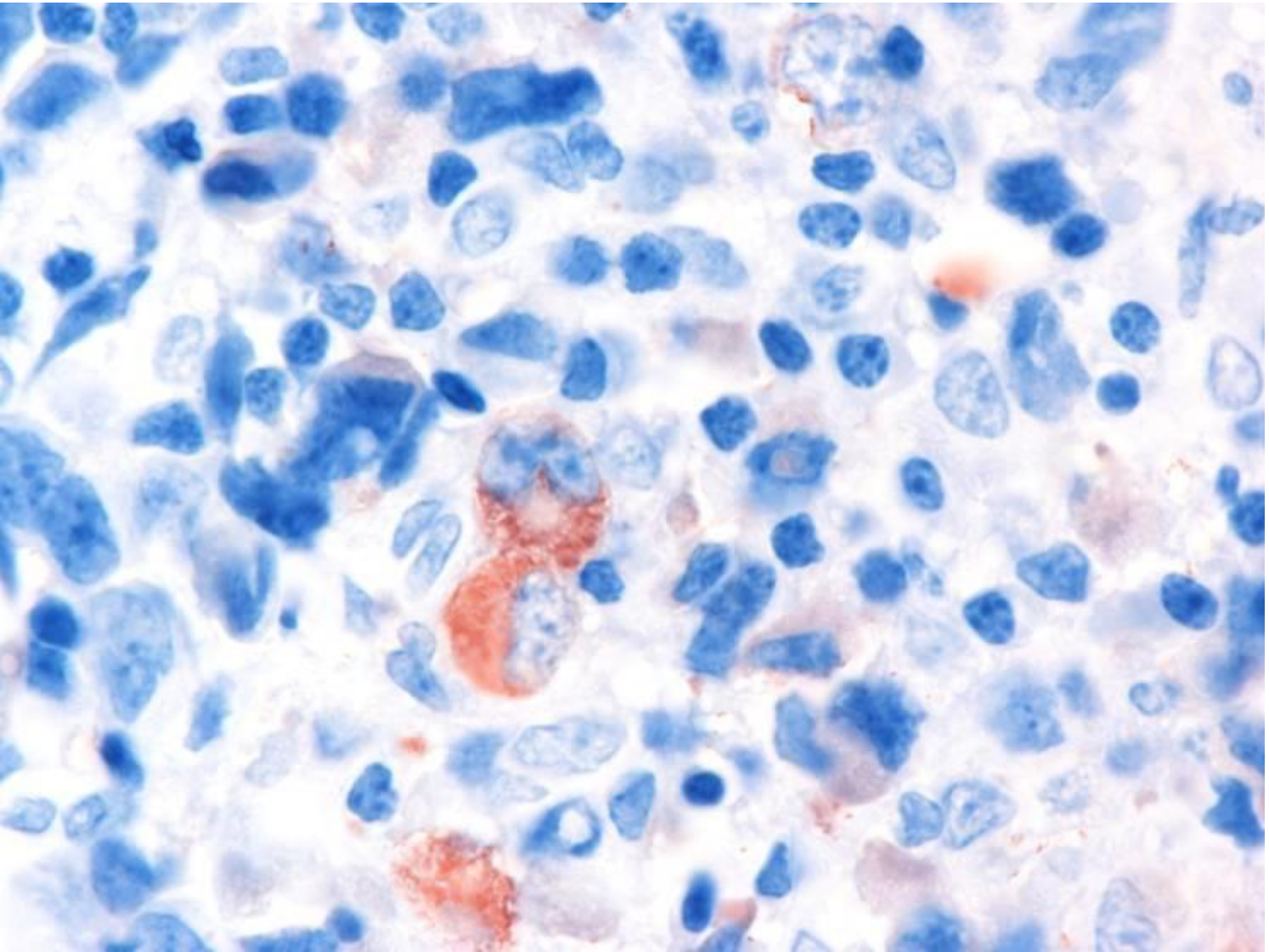
- Nukleär
- Zytoplasmatisch
- Membranständig
- Golgi
- Endoplasmatisches Retikulum
- Kombinationen

Nukleäres Reaktionsmuster



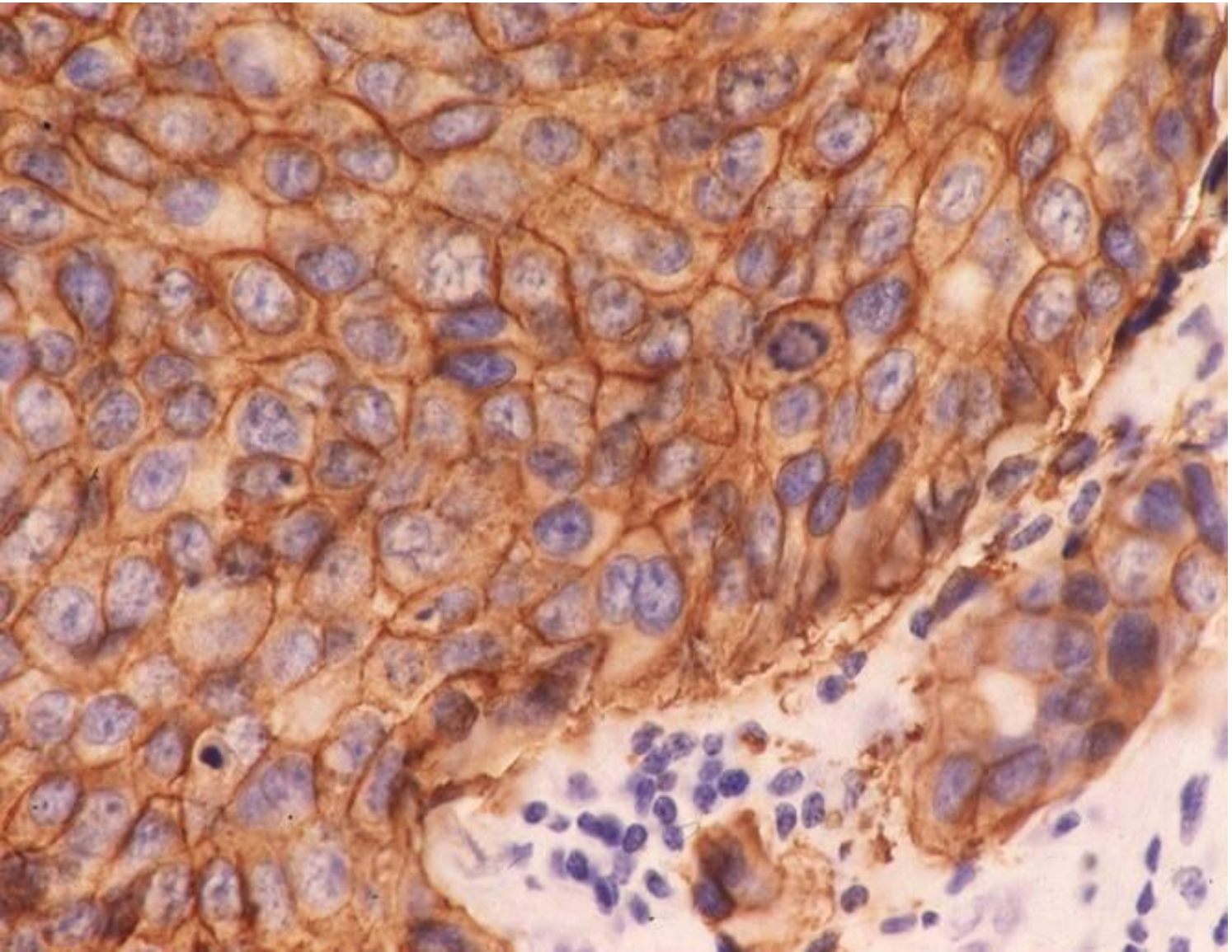
Ki-67 (MIB-1)
Proliferation

Endoplasmatisches Retikulum



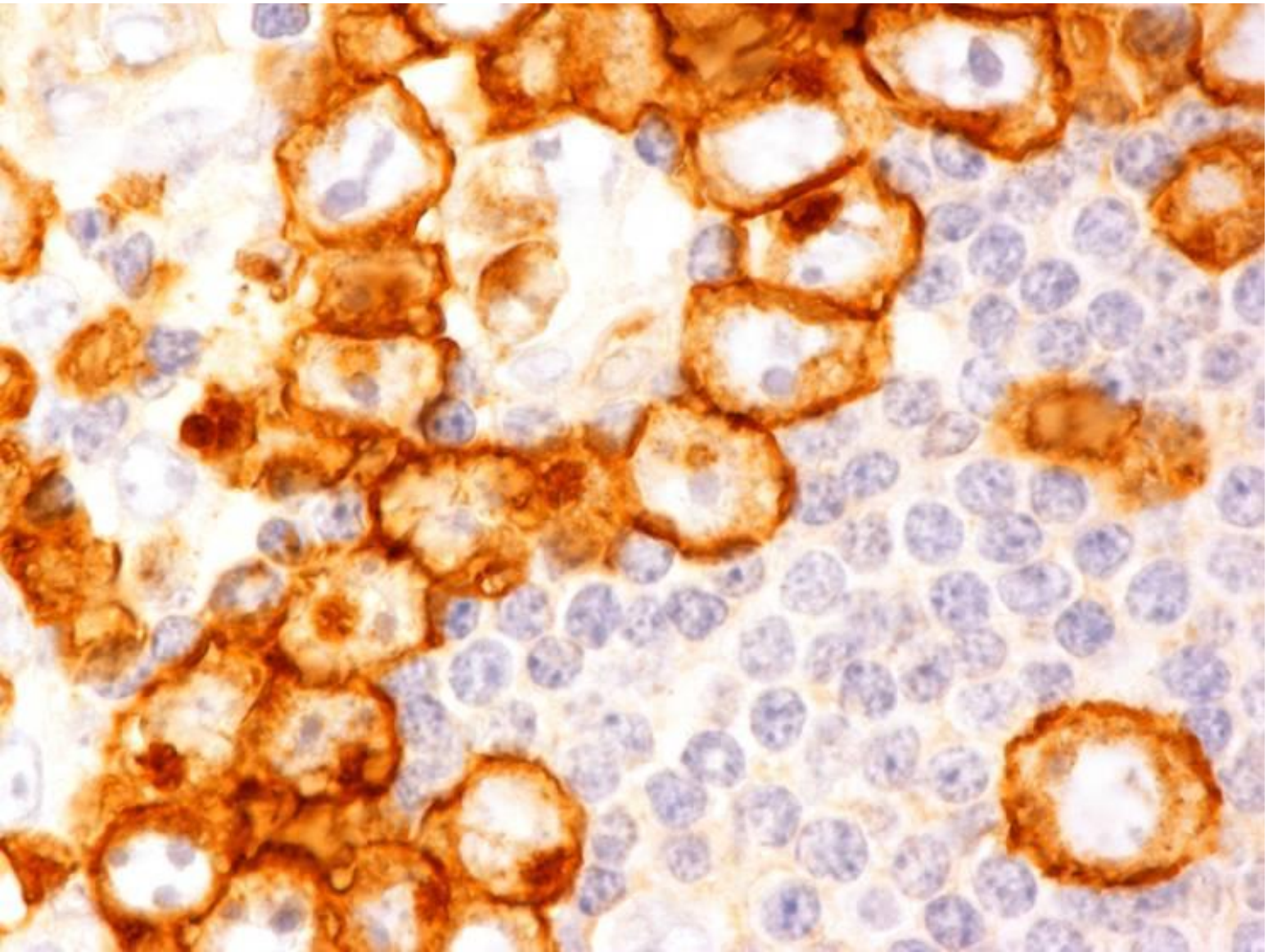
RPS6K Ribosomal protein S6 kinase

Membranständig



Her2
Wachstums-
faktor-
rezeptor

Membran und Golgi

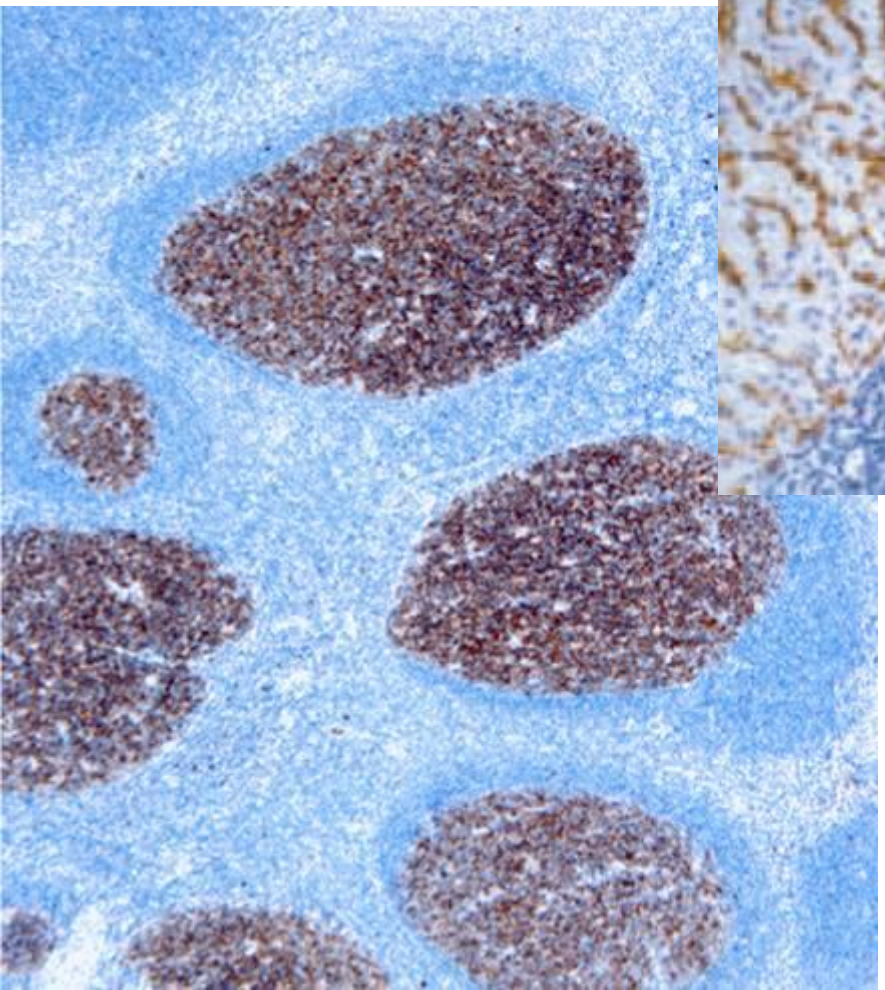


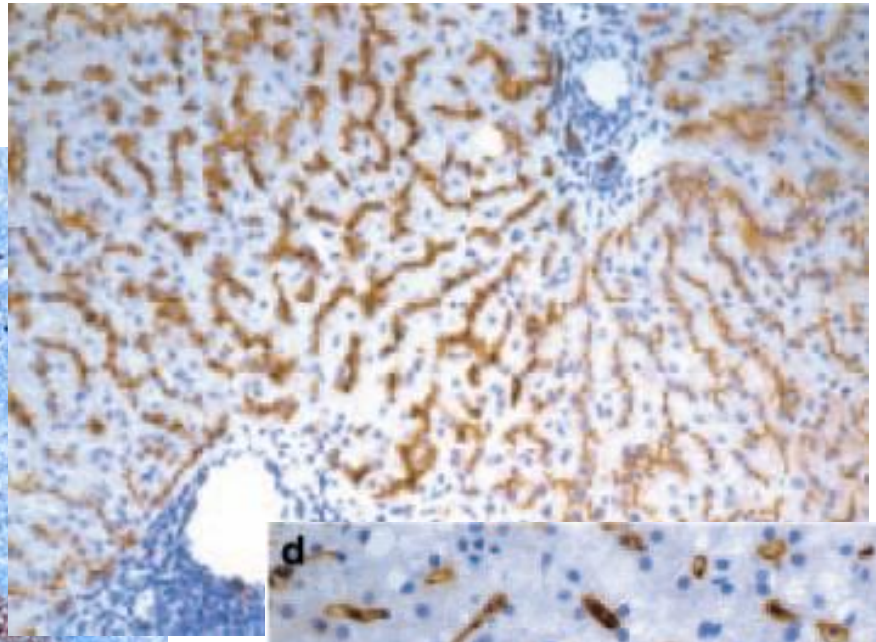
CD30
TNFR Familie
Induktion von Apoptose via CD95/CD95L

Verteilungsmuster (CD10)

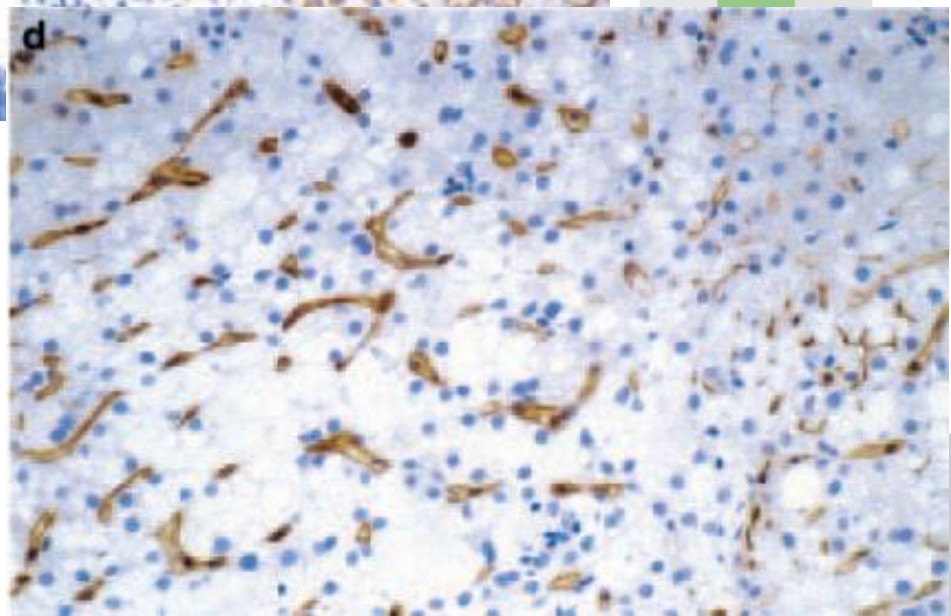
Medical University of Graz

Lymphknoten

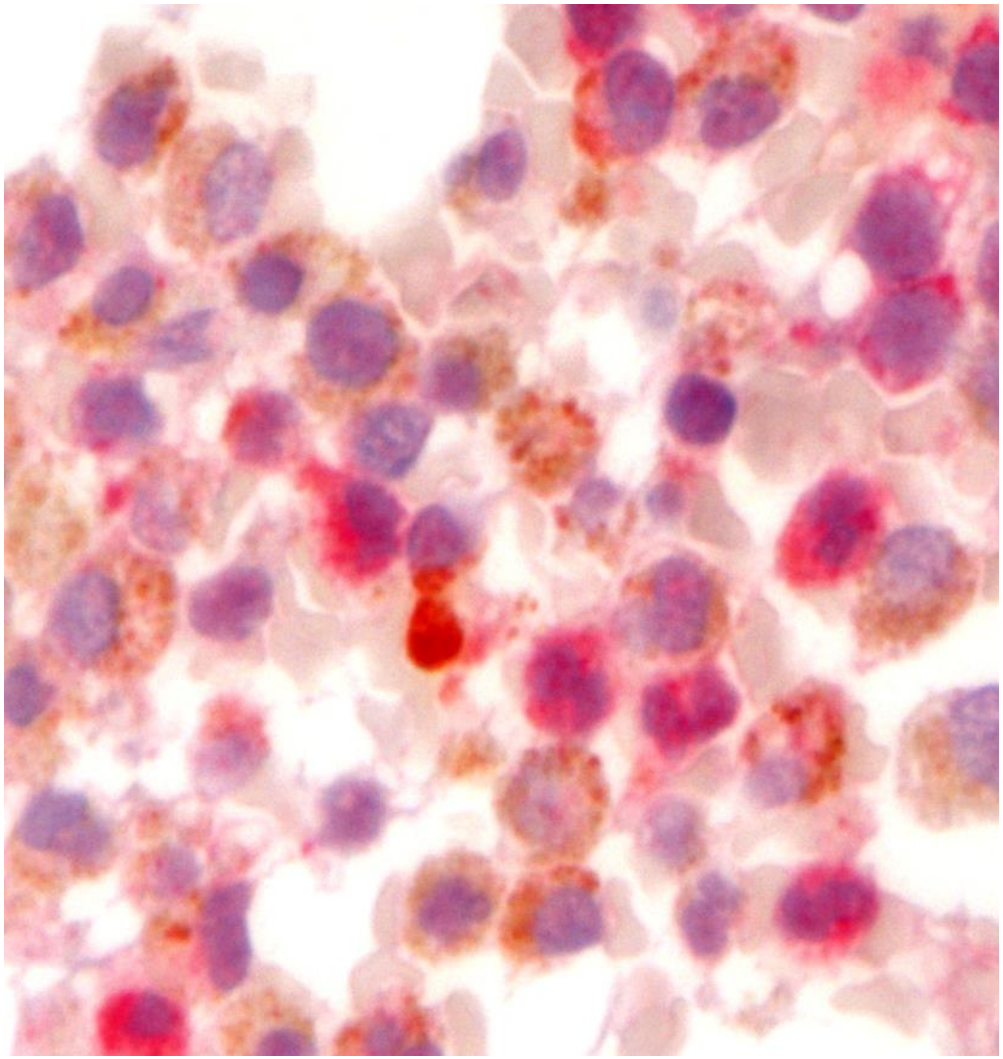




Leber



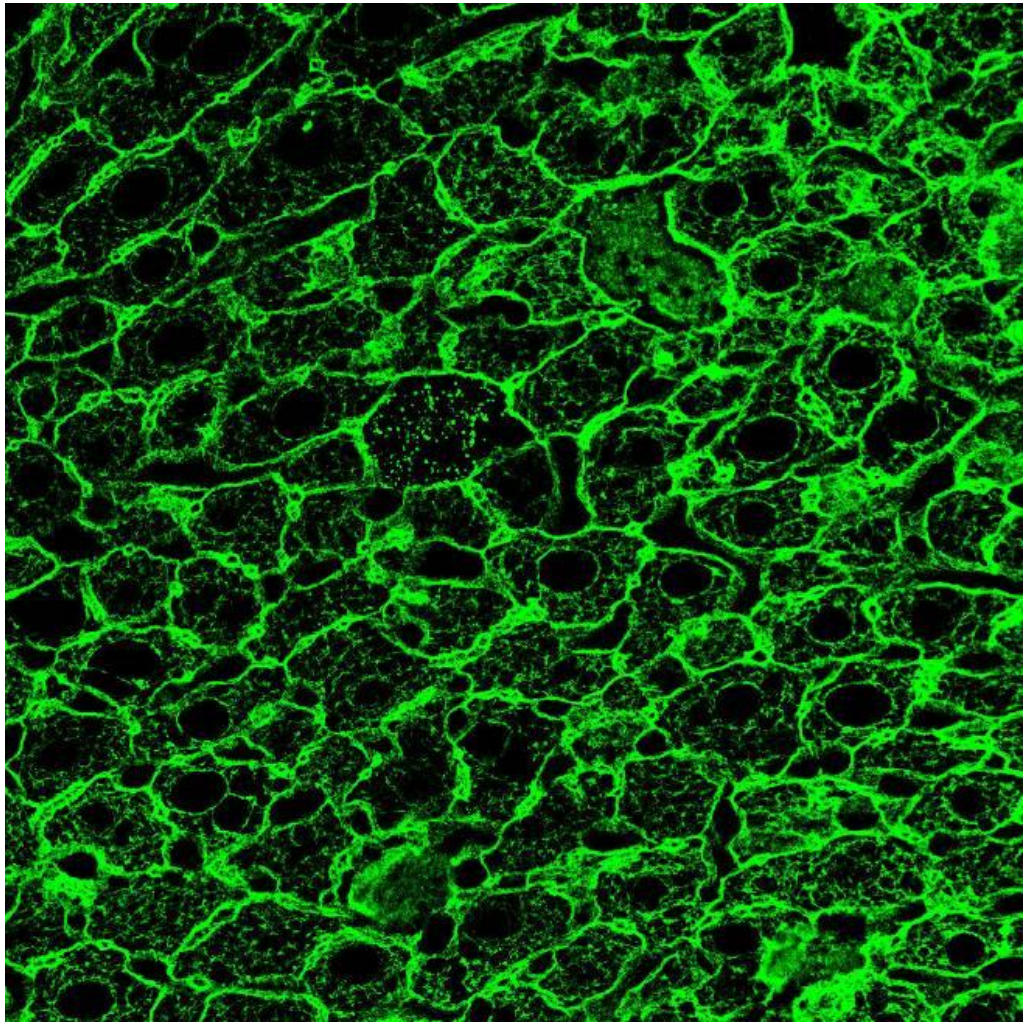
Doppelfärbungen
braun/rot



Immunfluoreszenz

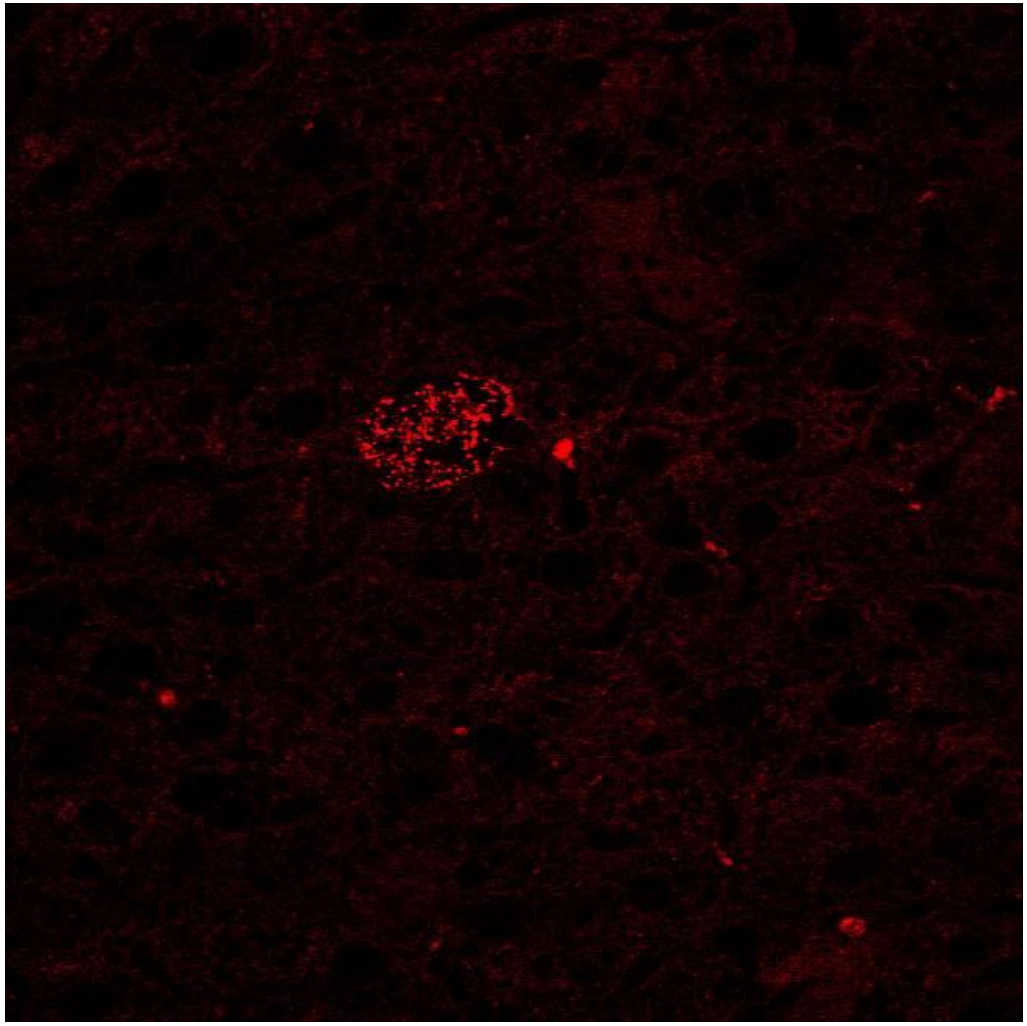
- UV Licht
- Fluoreszenz-markierte Antikörper
- Direkt/indirekte Methoden
- Sensitiver, teurer
- Co-Lokalisation unterschiedlicher Ag
  - Hohe Auflösung notwendig
  - Geeignete Farbkombinationen in der Visualisierung
  - IHC, Immunfluoreszenz
- Bsp: Autoimmunerkrankungen (Niere, Haut)

Leber CK Co-lokalisation



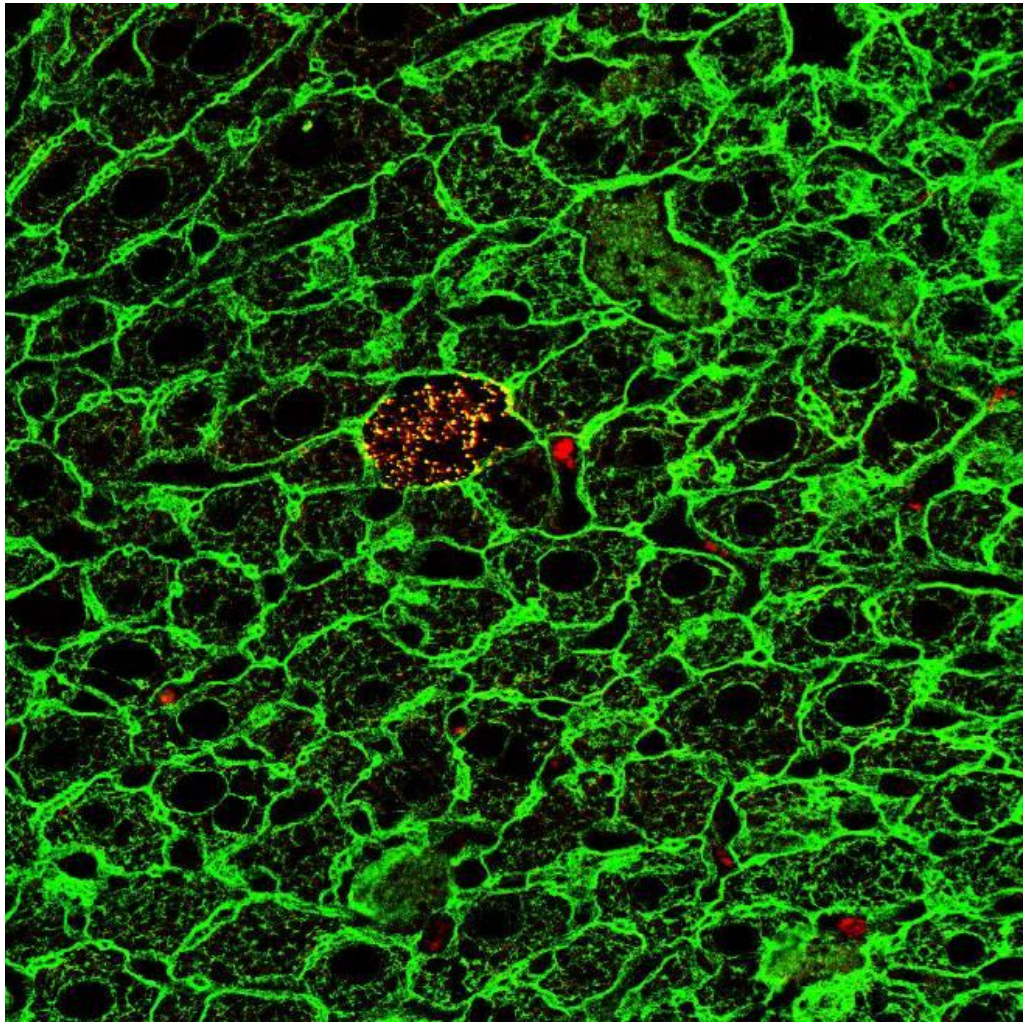
Leber CK Co-lokalisation

Medical University of Graz



Leber CK Co-lokalisation

Medical University of Graz



Elektronenmikroskopie

- 1000-500000x (Lichtmikroskopie bis 1000x)
- Ultrastruktur von Zellen
- Transmissions-EM:
  - 2D schwarz-weiß Bild
  - Gewebe gibt Elektronen ab (hell) od lenkt sie ab (dunkel)
- Scanning EM
  - 3D schwarz-weiß Bild
  - Elektronenstrahl über Gewebsoberfläche, sek. Elektronenabgabe
  - Niedrigere Auflösung, Forschung

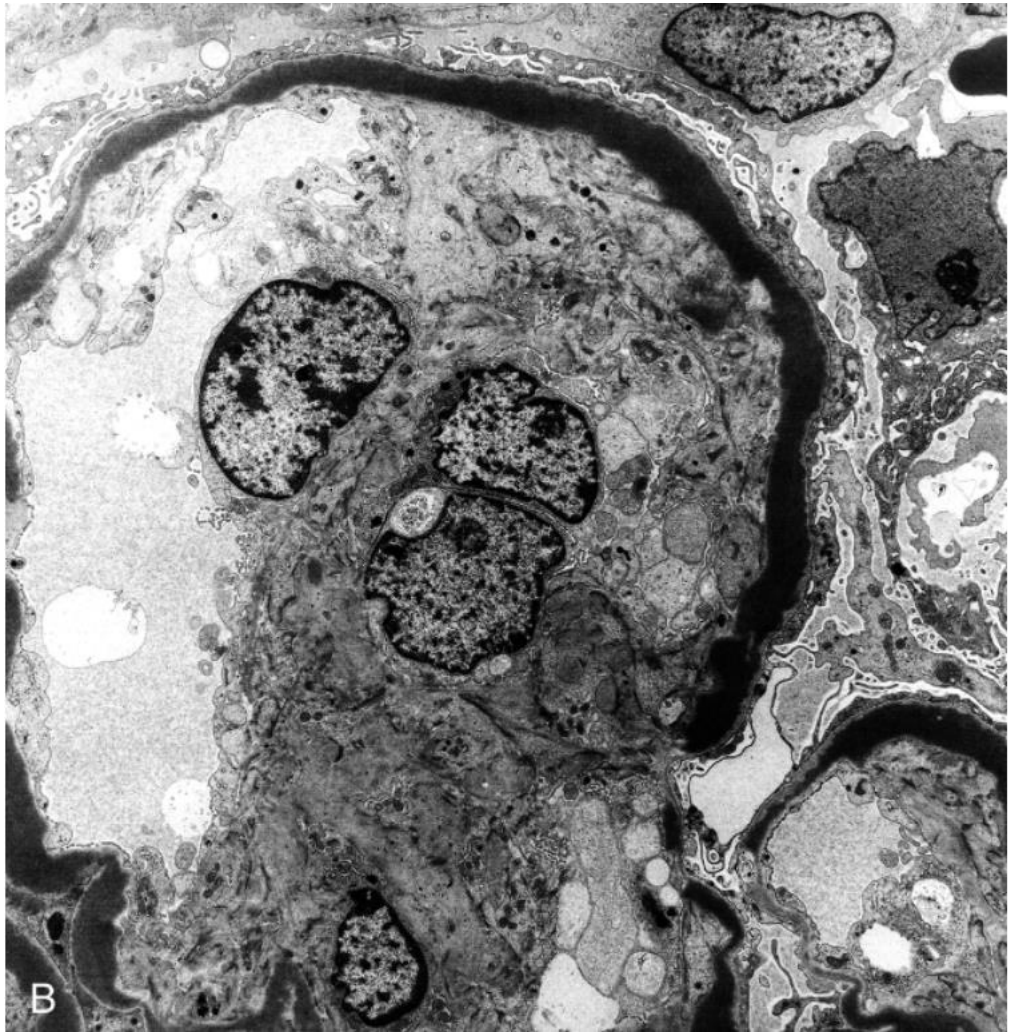
Elektronenmikroskopie
Technik

- 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
- Anwendungsbeispiele:
  - Biopsien von Niere, Haut, Herz, Nerven, Muskel
  - (Lysosomale) Speichererkrankungen
  - Erreger: Viren

Medical University of Graz



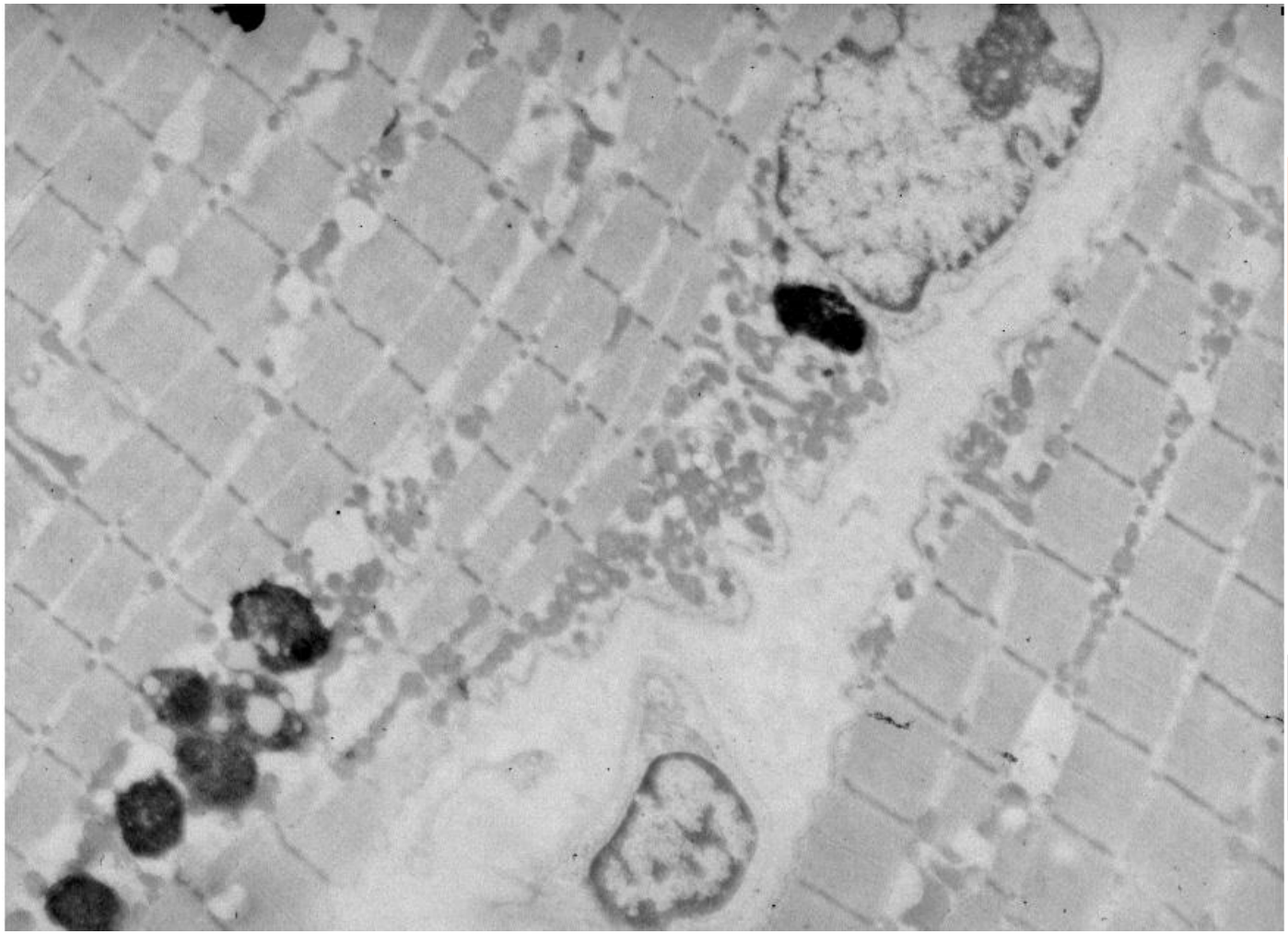
A, C3 glomerulonephritis. C3 is strongly positive in the mesangium (C3 × 40). B, Dense deposit disease. A ribbon-like deposition of strongly electron-dense material is seen in the glomerular basement membrane (electron microscopy).

0 Notes

ADD NOTE +

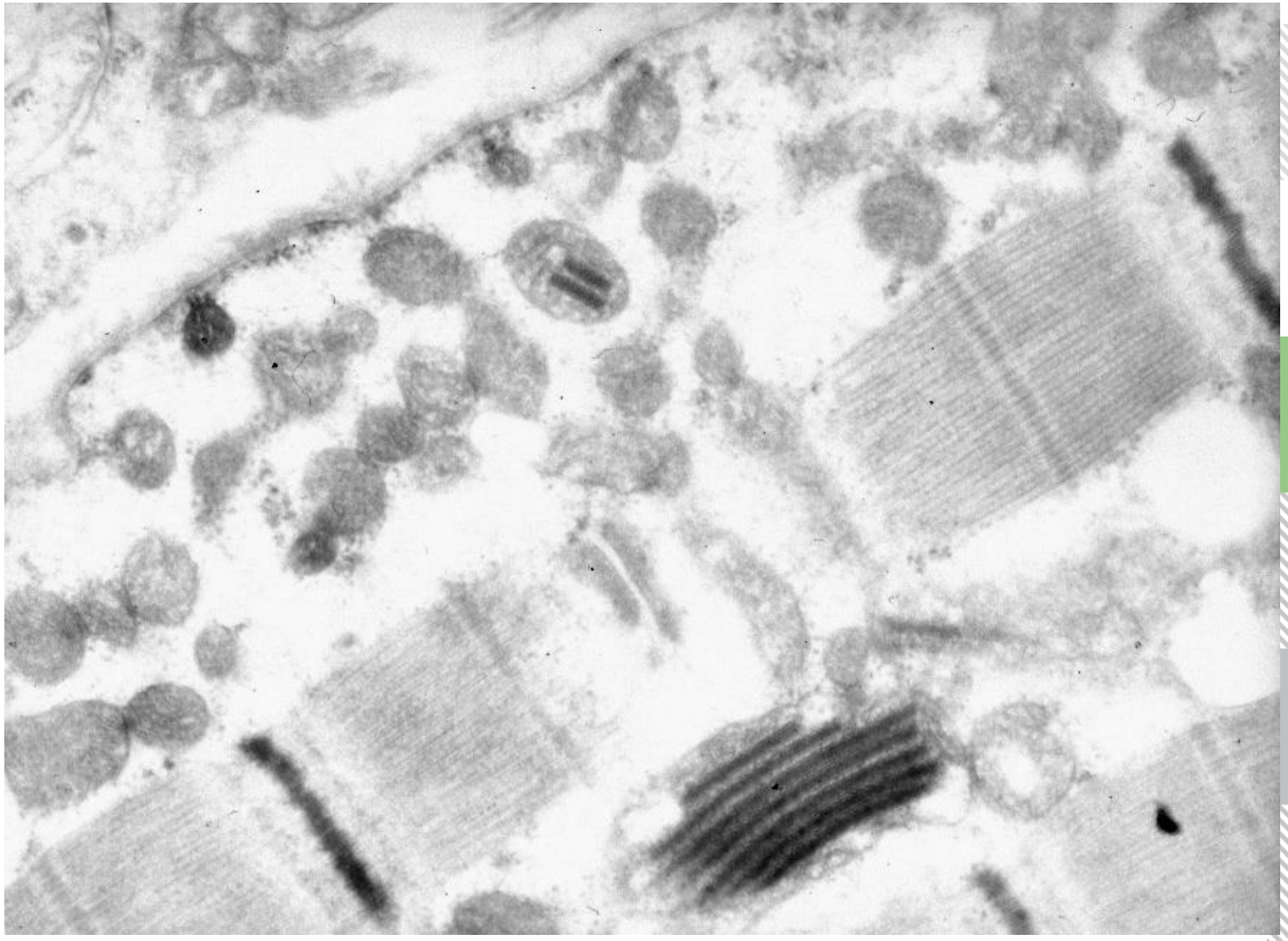
Vermehrung von Mitochondrien

Medical University of Graz



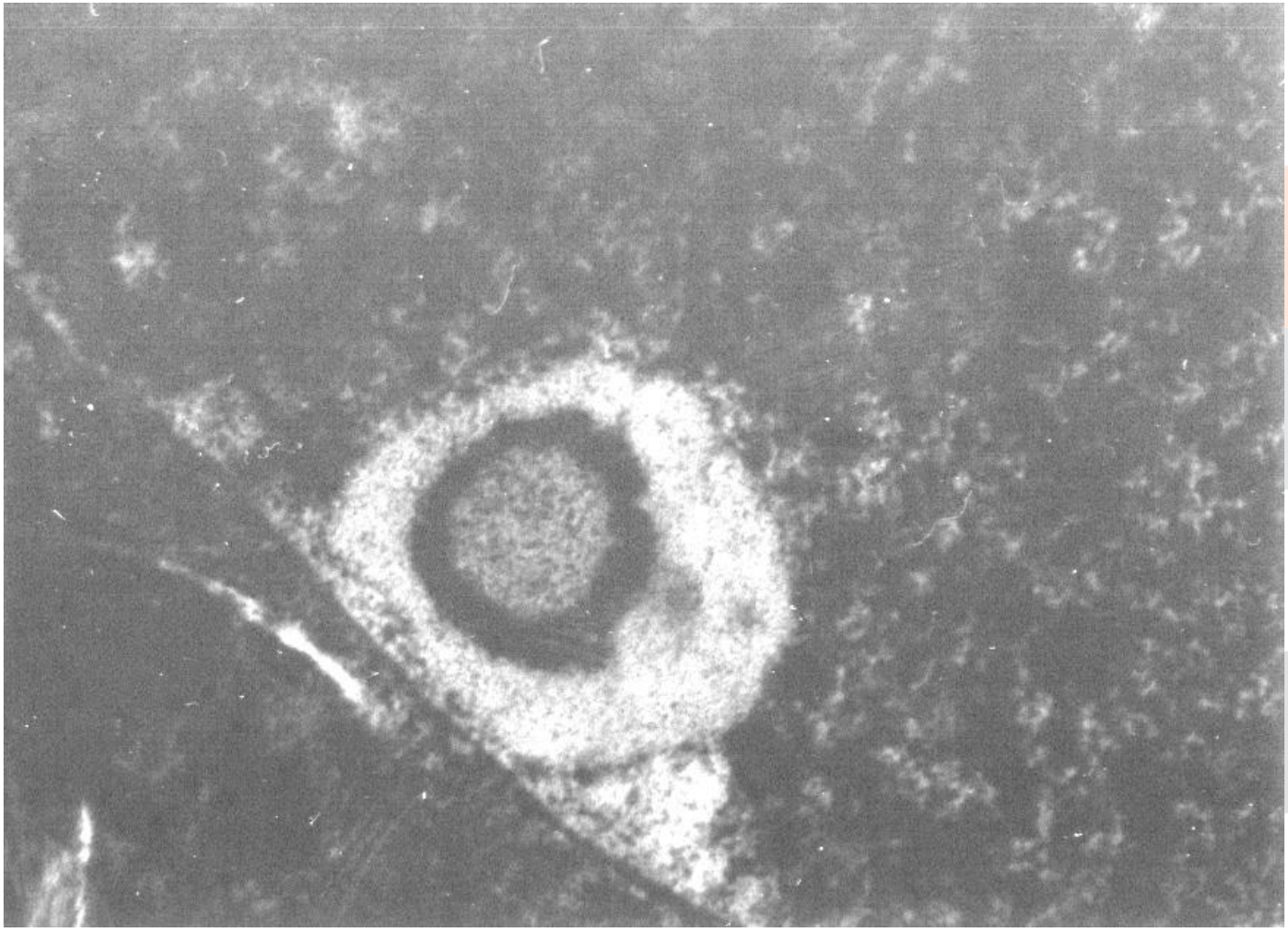
Kristalline Einschlüsse in Mitochondrien

Medical University of Graz



Viruseinschlußkörper (Zellkern)

Medical University of Graz



Medical University of Graz

MOLEKULARPATHOLOGISCHE METHODEN

Methoden

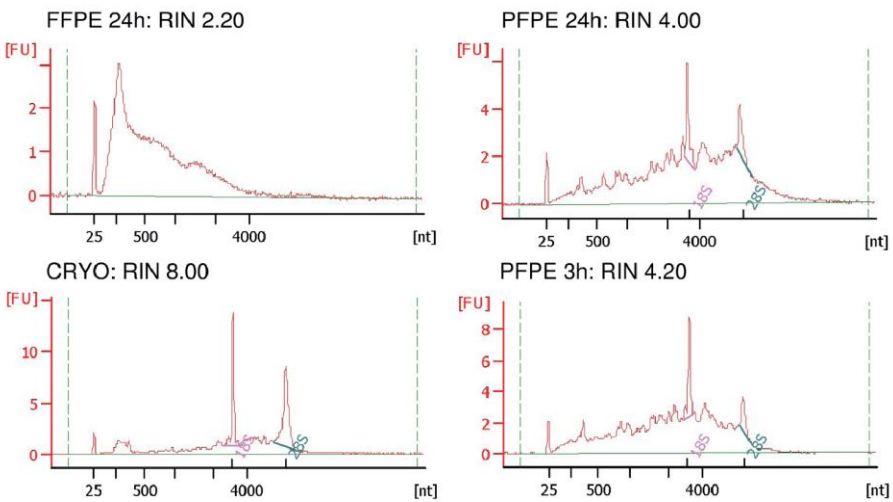
- Proteinnachweis, -quantifizierung
  - Western Blot, Immunhistochemie
- DNA Nachweis / Quantifizierung
  - Southern Blot, *in-situ* Hybridisierung, (quantitative) PCR
- RNA Quantifizierung
  - Northern Blot, Quantitative RT-PCR, cDNA-Chip
- Mutationsanalyse
  - RFLP, Sequenzierung, Schmelzpunktanalyse, Hybridisierung
- Deletionsanalyse
  - PCR, Sequenzierung
- Translokationsanalyse
  - Southern Blot, (RT-)PCR, FISH

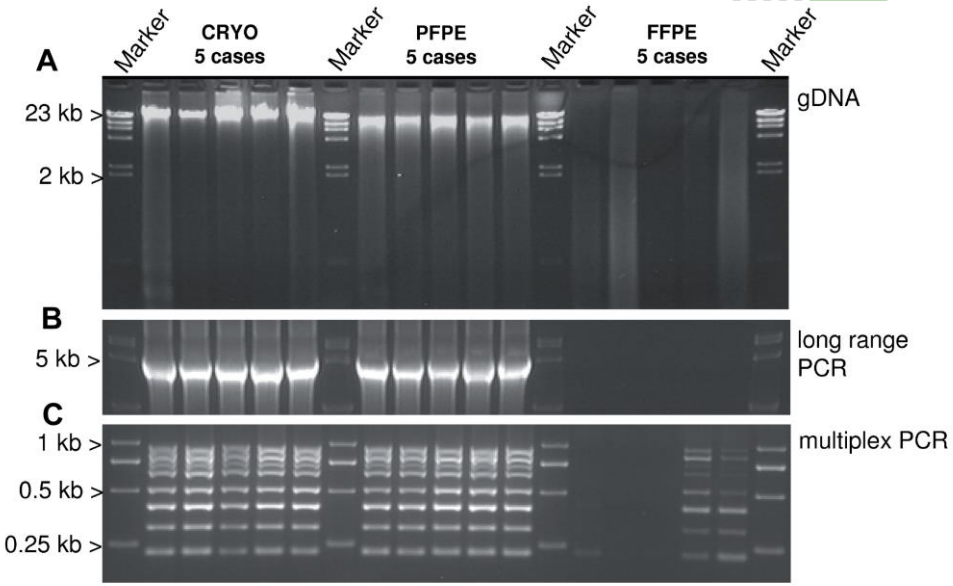
Extraktion Nukleinsäuren

Medical University of Graz

- FFPE, nativ, frozen; body fluids, FNA, Blut etc.
- DNA/RNA Isolierung (Kits, Automatisierung)
- Quantifizierung, Qualitätskontrolle:
  - Konzentration: Spectrophotometer (UV Absorption, 260nm)
  - Reinheit/Purity: $A_{(260 - 320)}$: $A_{(280-320)}$ ratio
  - Integrität: Fragmentlängenanalyse, Gelelektrophorese
    - DNA: FFPE (<100bp-1kb), frozen (bis 30-40kb)
    - RNA: 28S (~5kb) und 18S (~2 kb) ribosomale RNA (rRNA)
- *Qualität abhängig v. Ausgangsmaterial und prä-analytischen Faktoren (zB. Fixierung, Lagerung)!*

RNA/DNA Qualität





Representative results for **RNA integrity on Agilent Bioanalyzer**.

(A) Genomic DNA extracted from corresponding FFPE, PFPE, and snap-frozen (CRYO) samples of 5 human colorectal cancer cases was separated on 1% agarose gels and visualized with ethidium bromide.

(B) Long-range PCR was performed using the QIAGEN LongRange PCR Kit. Primers 33093F and 38185R were used for amplification of a 5093 base pair (bp) fragment of human tuberous sclerosis complex.

(C) Multiplex PCR of eight fragments of different human genes (222-955 bp).

Viertler et al, J Mol Diagn. 2012

Gelelektrophorese

- Methode zur Separierung, Identifizierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren (60er)
- Negativ geladene Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld auf einem Gel von Kathode zu Anode abhängig von Größe, Konformation, Ladung, Porengröße des Gels
- Agarose und Polyacrylamid Gele und Variationen (pulse field, capillary etc.)
- Visualisierung von DNA (Ethidiumbromid, SYBR)

In situ Hybridisierung

Medical University of Graz

- Direkte Visualisierung v. NS in Zellen/Gewebe
- HE/Lichtmikroskopie:
- CISH
  - Chromogen
- MISH
  - Metallographisch (Silver/SISH)
- SISH/CISH
  - zB. HER2 Amplifikationsbeurteilung mit dualer Probe, Ratio HER2 zu Zentromer Ch17 Signale
- Fluoreszenzmikroskopie:
- FISH
  - Fluoreszenz
  - Multiple Probes möglich
  - zB. MDM2/CDK4 Amplifikation Liposarkom

In Situ Hybridisierung

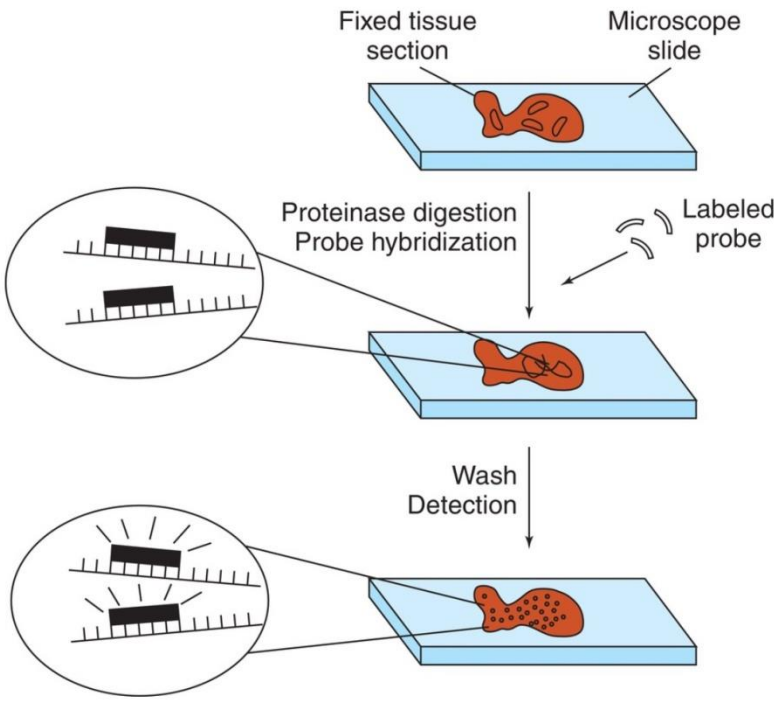
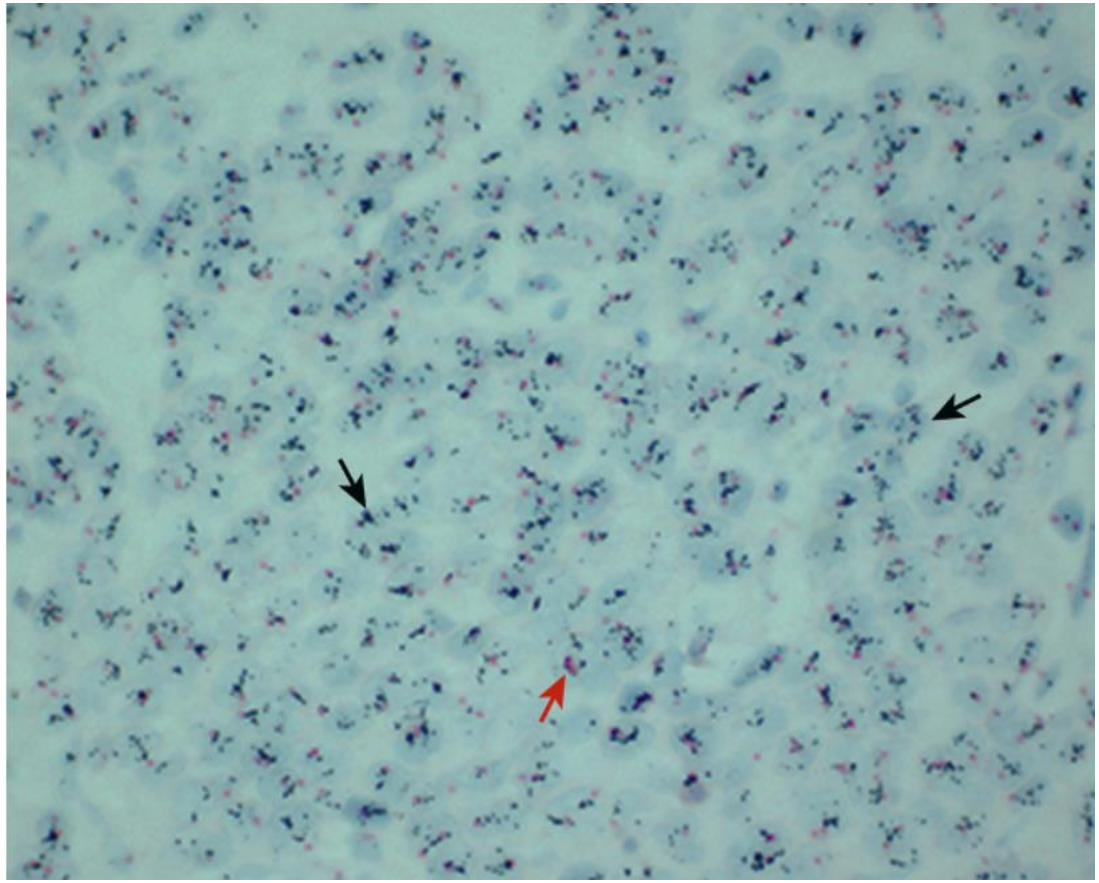


Figure 1-22: In situ hybridization (ISH). Slide-mounted tissues are pretreated/protease digested to facilitate labeled probe access to nucleic acid targets for hybridization. Chromogenic ISH involves the detection of a hapten-labeled probe with enzyme-labeled secondary reagents and a chromogenic substrate. Fluorescence ISH involves the use of fluorophore-labeled probes or fluorescence-labeled secondary detection reagents.

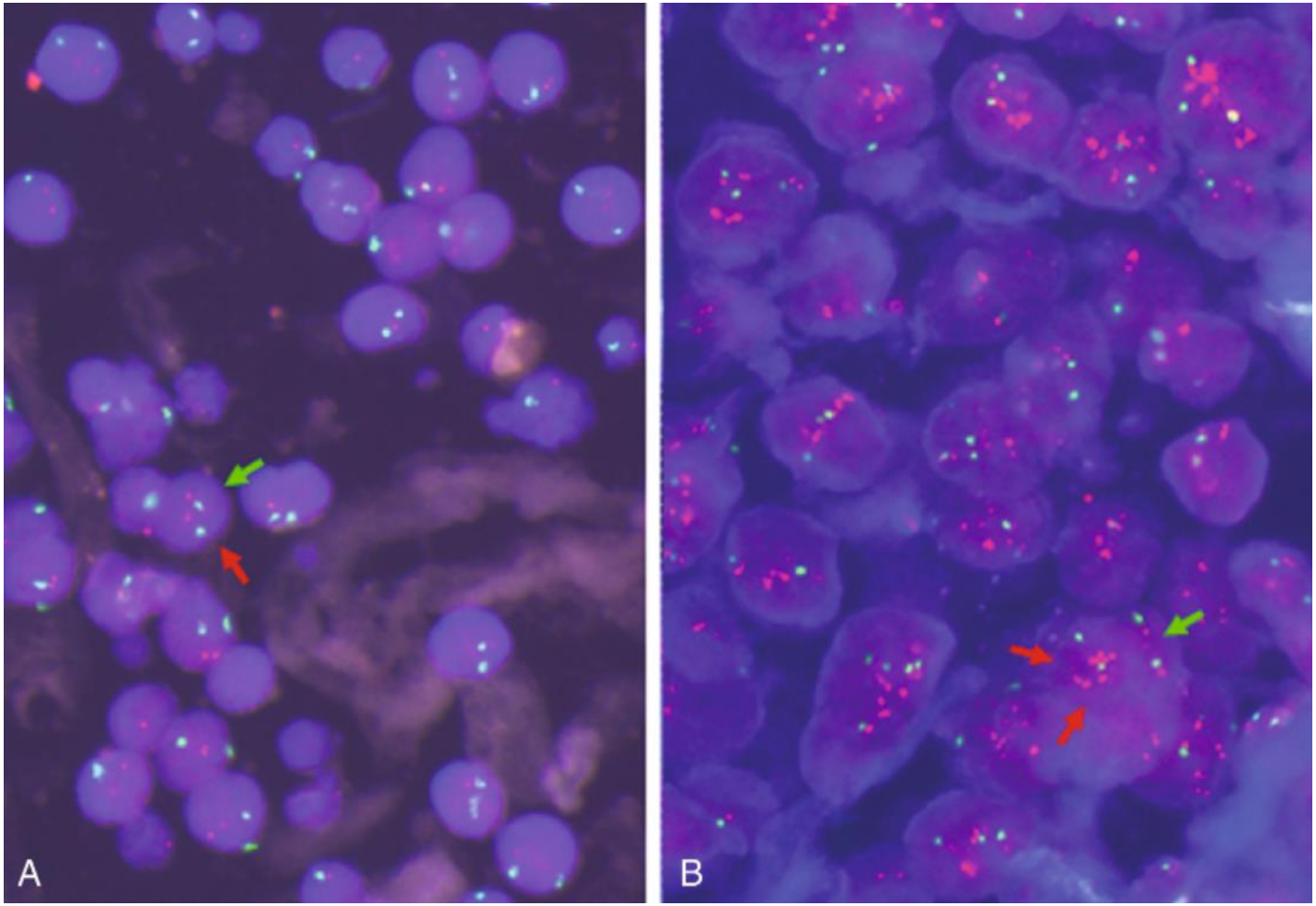
(Modified from Leonard DGB [ed]: Diagnostic Molecular Pathology. Philadelphia, WB Saunders, 2003.)

HER2 Dual ISH (Ventana)



HER2 Amplifikation (schwarz, SISH, silver)
Ch17 Zentromer (rot, CISH)

HER2 FISH assay (PathVysion, Abbott)



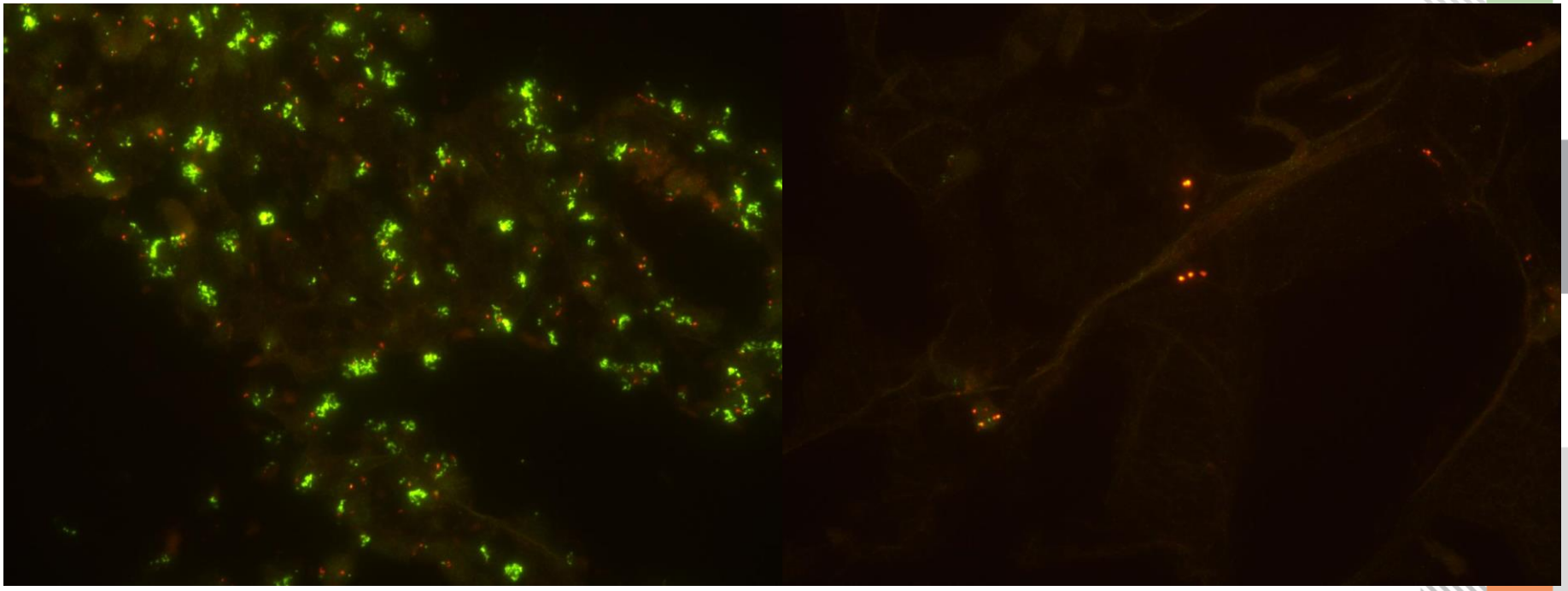
Verhältnis HER2 (rot)/Cen17 (grün)

A) Keine Amplifikation

B) Amplifikation

Amplifikation FISH (MDM2/CDK4)

Medical University of Graz

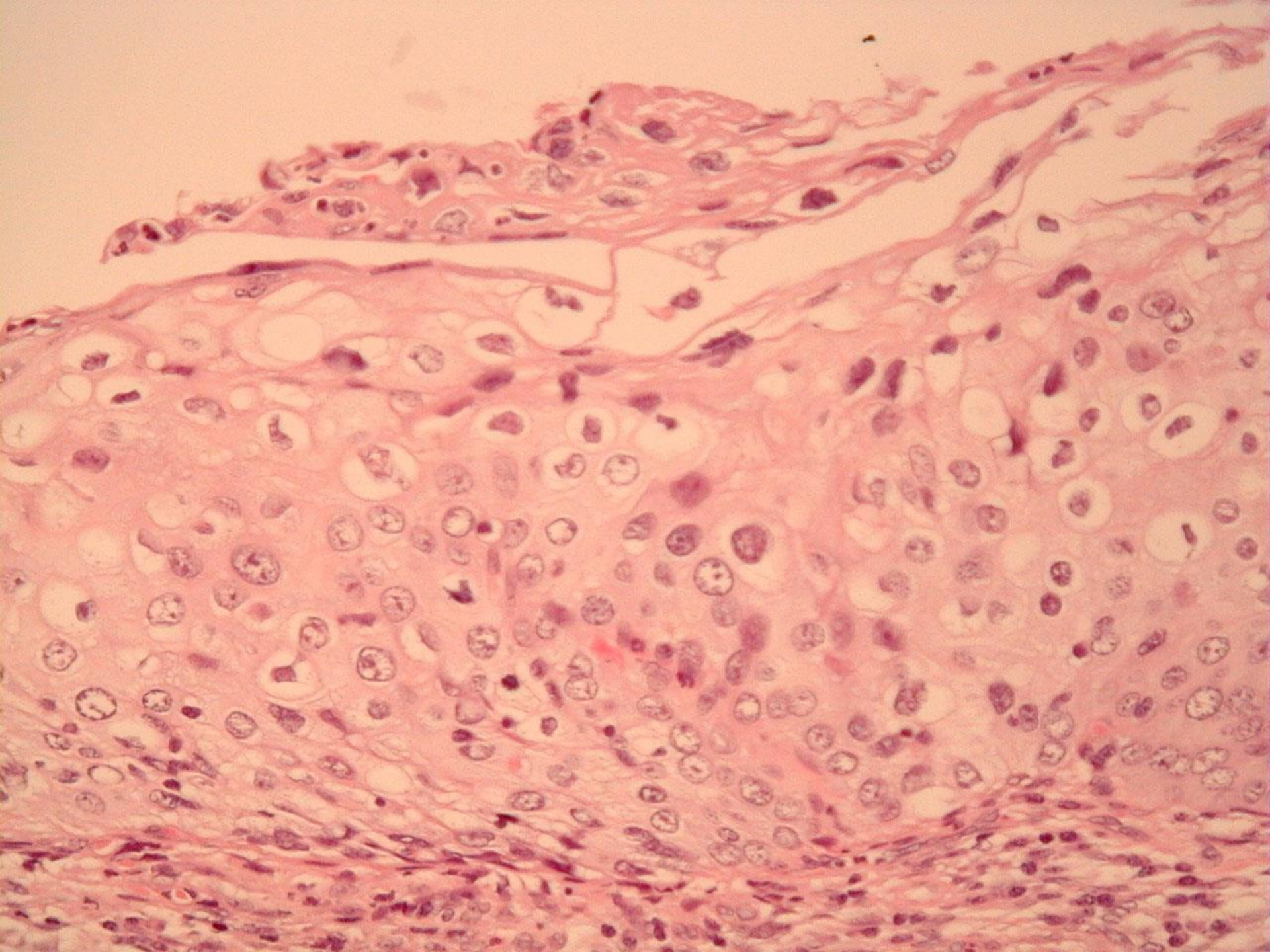


Detektion von DNA/RNA

Medical University of Graz

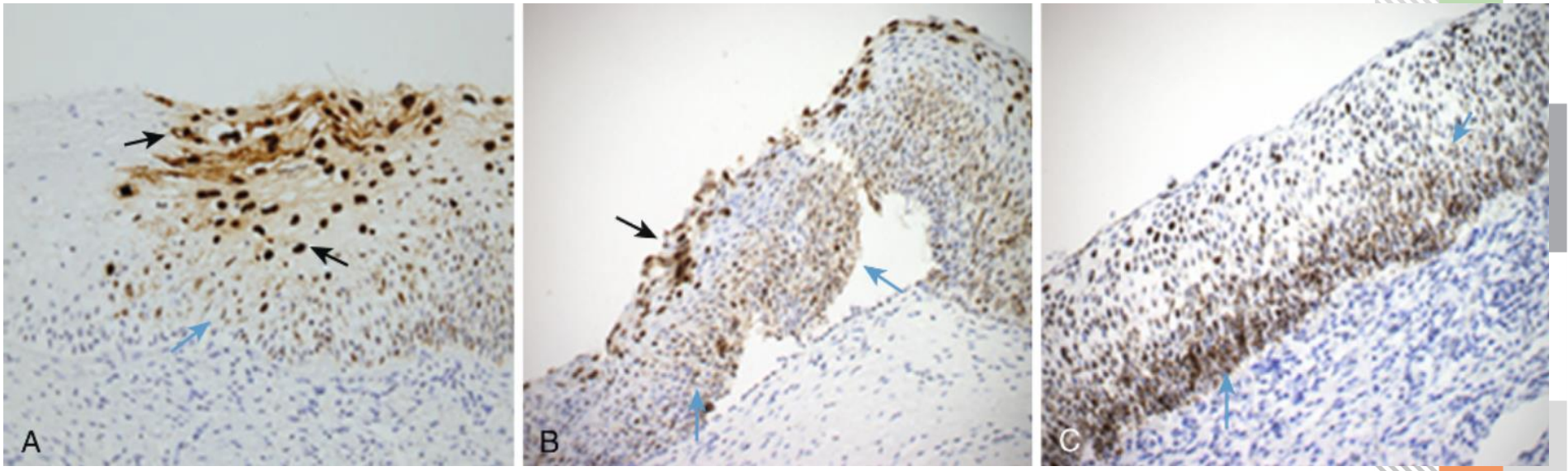
- → Keine Aussage über Lebens- oder Vermehrungsfähigkeit
- → Keine Screeningmethode
- → Hohe Sensitivität

- Viren
  - HPV, CMV, EBV, Hep C, VZ etc.
- Bakterien
  - Staph. aureus, E. coli, Pseudomonas aerug. etc.
- Parasiten



RNA In-situ Hybridisierung HPV high risk (16/18)

Medical University of Graz



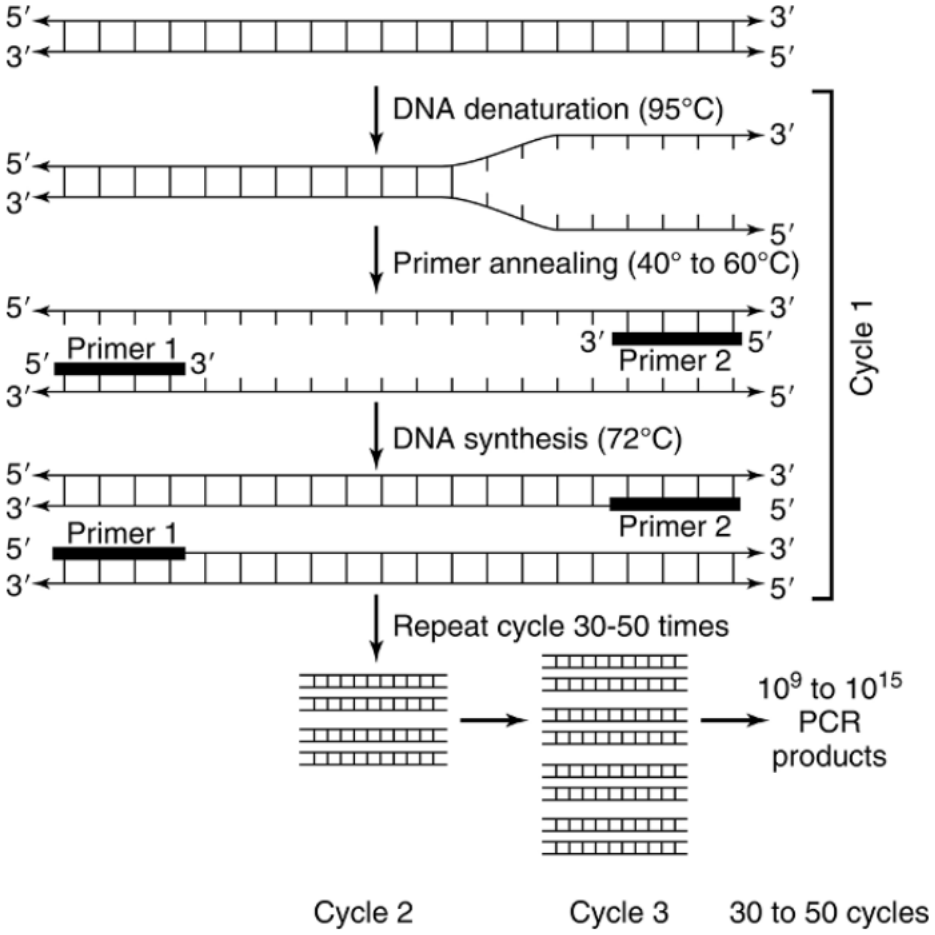
HPV RNA im Cervixepithel bei LSIL (A: CIN I), HSIL (B: CIN II, C: CIN III). RNAscope CISH (Advanced Cell Diagnostics).

PCR

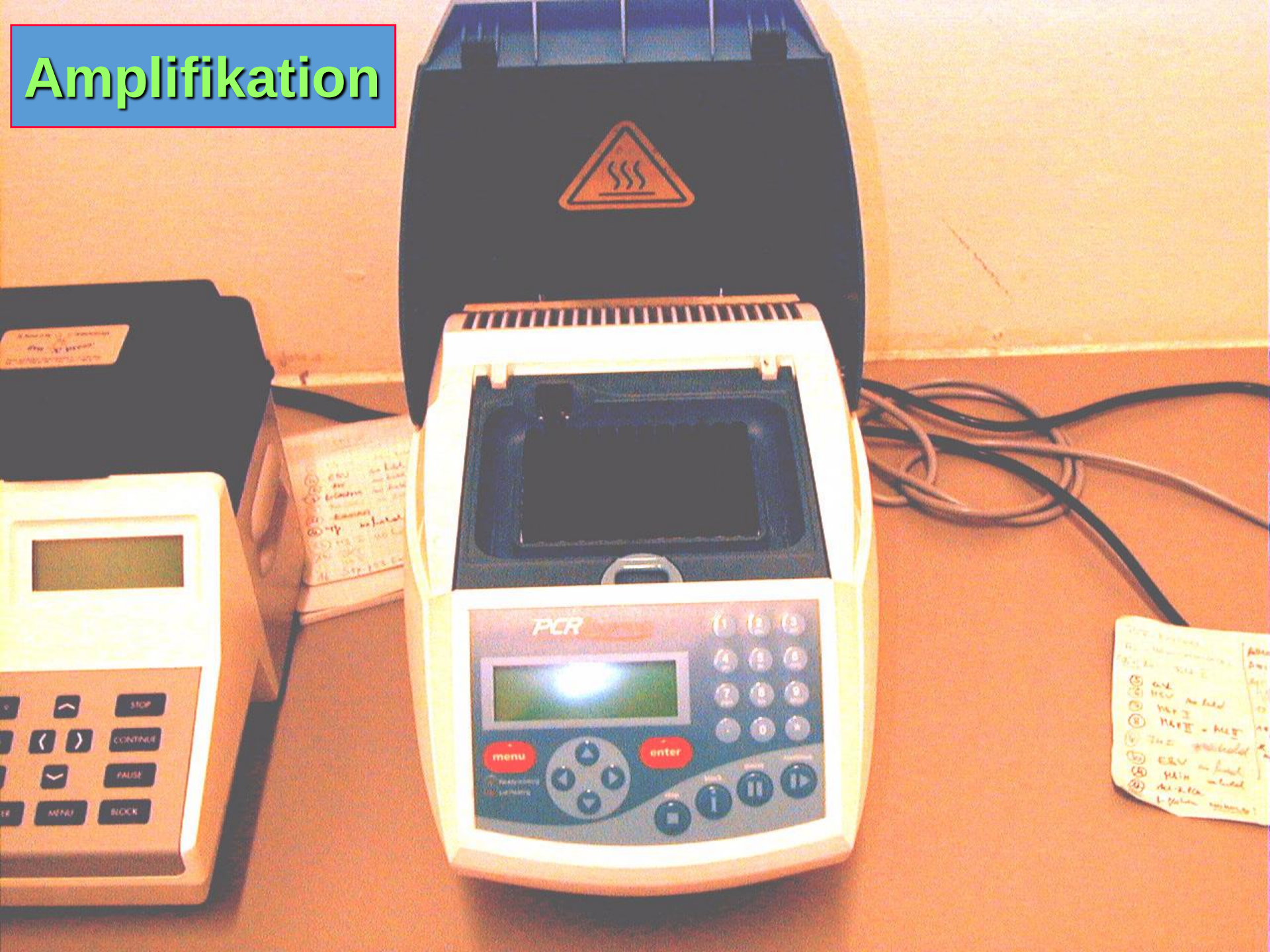
- In vitro Amplifikation von DNA durch automatisierte Zyklen von Denaturierung, Annealing, Extension/Synthese in Thermocycler
- End-point PCR:
  - 30-50 Amplifikationszyklen
  - Analyse des PCR Produkts (Gel)
- Real time quantitative PCR:
  - „Cylcle by cycle monitoring“ durch Messung des Fluoreszenzsignals des Amplicons
  - Reverse Transcription PCR: RNA Expression, cDNA Synthese
- Digitale PCR:
  - Viele Reaktionsgefäße, hohe Sensitivität
  - Absolute Quantifizierung (vs relativ zu Standardkurve)

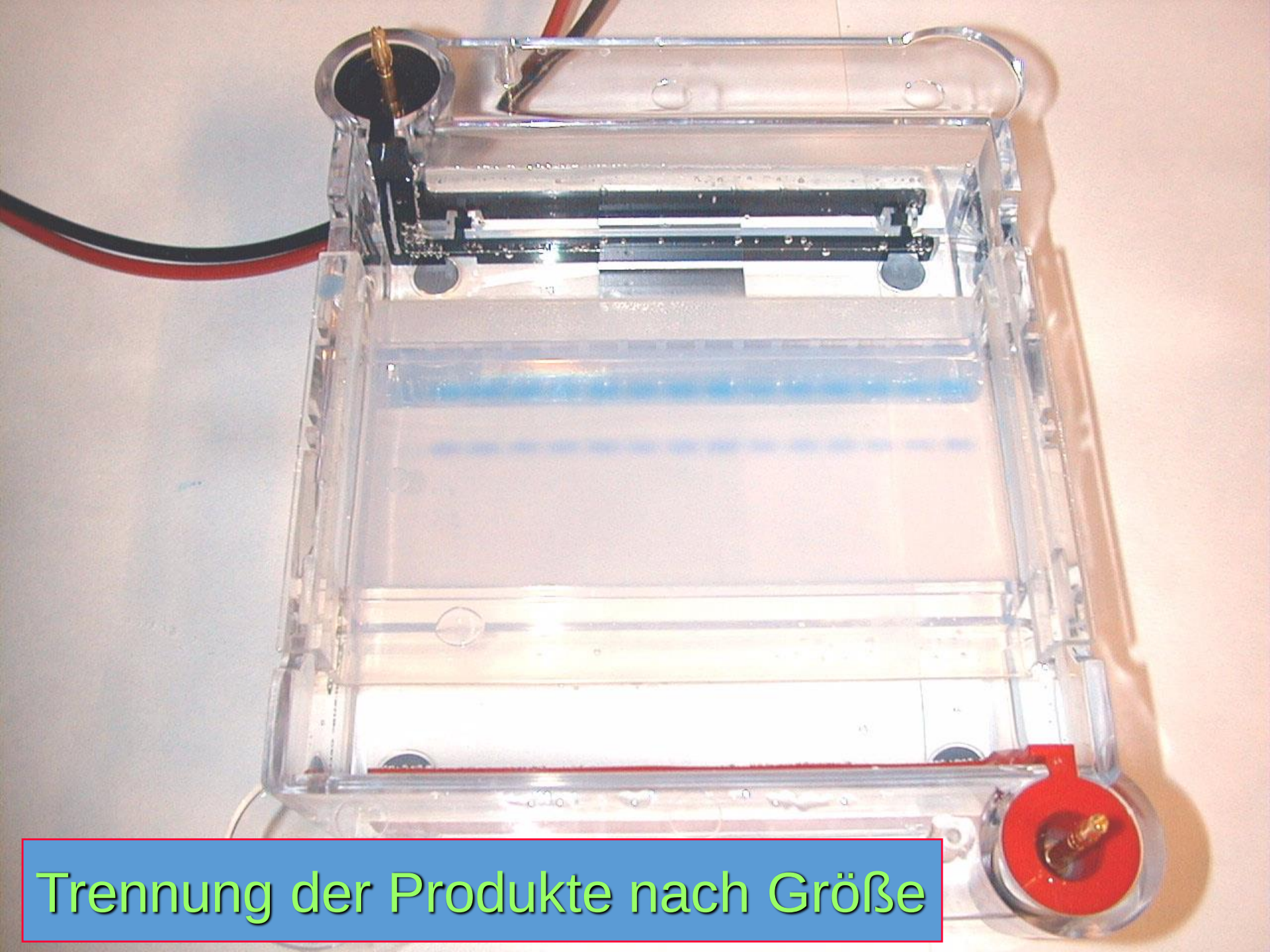
Durchführung - PCR

- Denaturierung
- Primer Annealing
- Synthese/Amplifikation
- Trennung der Produkte nach Größe
- Identifizierung und Analyse



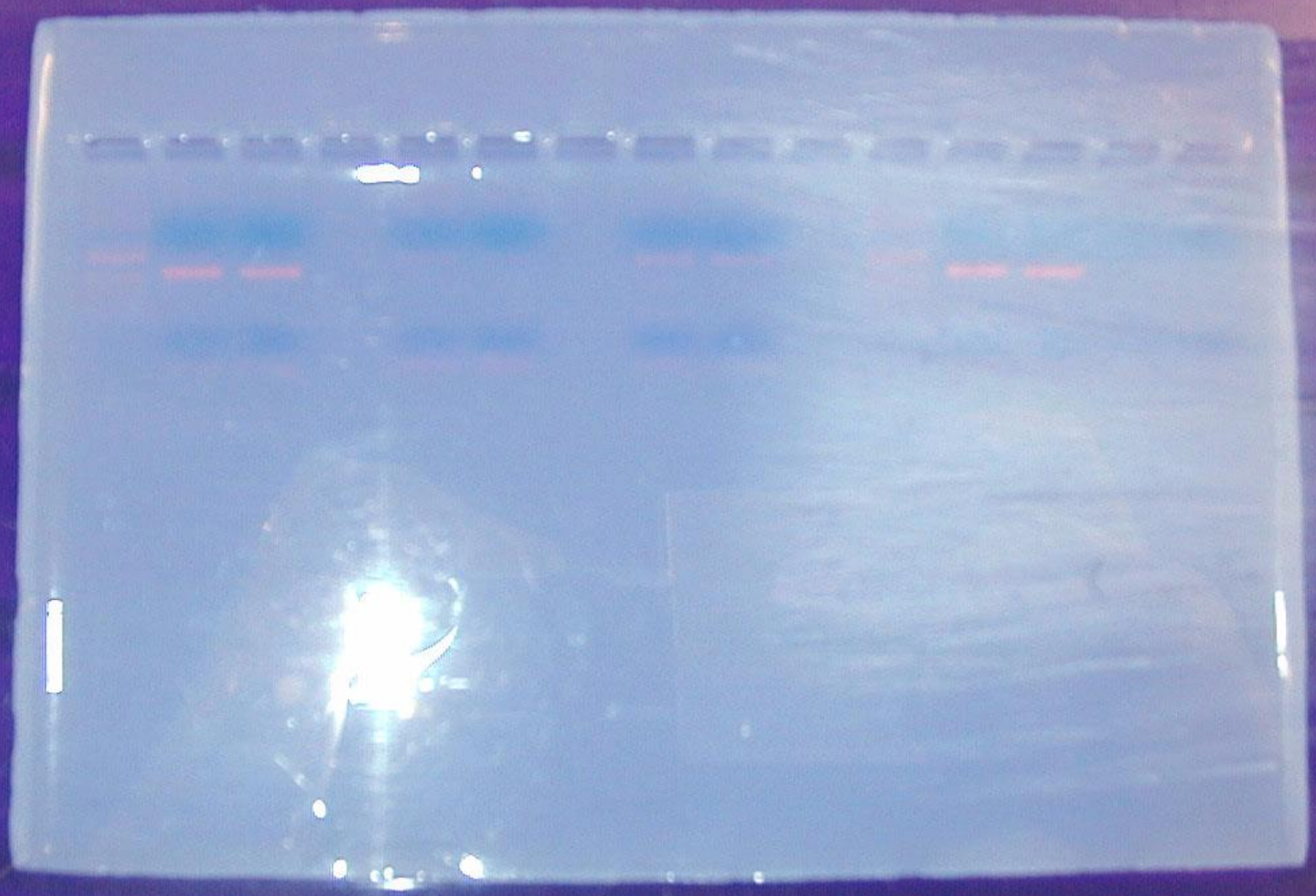
Amplifikation





Trennung der Produkte nach Größe

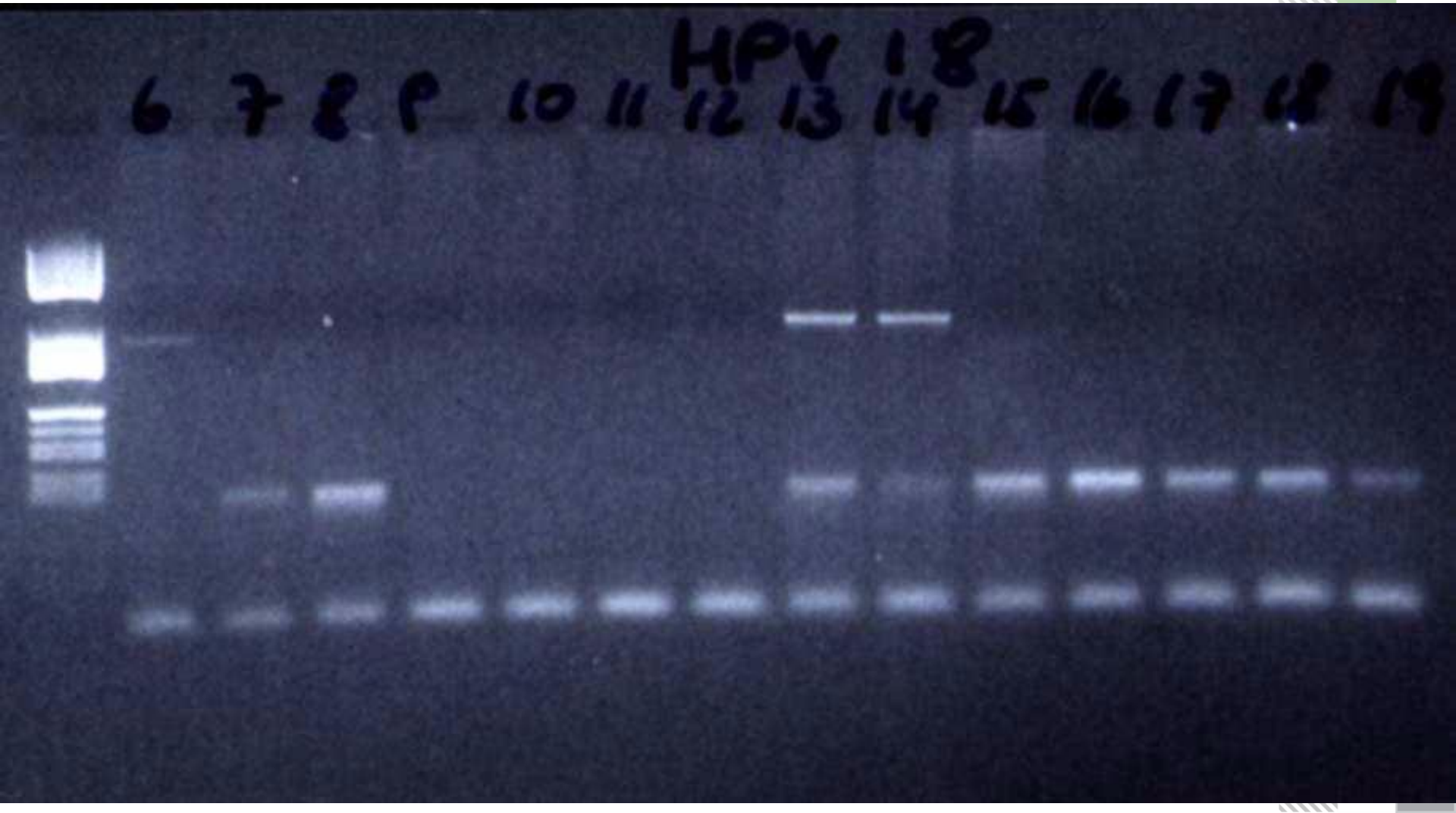
Identifizierung und Analyse



Anwendungen

- Erregerdiagnostik
- Genetische Erkrankungen
- Hämatologische Erkrankungen (zB bcr-abl Translokation bei CML)
- Sarkome (Genfusionen zB EWS/FLI1 Ewing)
- Charakterisierung solider Tumore (zB HNPCC, Mammakarzinom)
- Identitätstestung
- Zirkulierende Tumor/Pathogen Signaturen
- …

HPV 18 - PCR



Nachweis von Erreger-DNA mittels PCR

Medical University of Graz

Vorteile

- Un-/schwer kultivierbare Organismen
- Zeitfaktor
- Hohe Sensitivität

Nachteile

- Aufwand
- Kontaminations-gefahr (falsch positive Ergebnisse)
- Keine Screening-methode
- Keine Aussage über akute Erkrankung

NEU: NGS basierte 16s rRNA Sequenzierung