BIOZOL

Diagnostica Vertrieb GmbH, Oehleckerring 11-13

22419 Hamburg, Germany

Telephone: +49 (0)89 3799666-6 | **Fax:** +49 (0)89 3799666-99

E-Mail: info@biozol.de

Immunhistochemie (IHC)

Artefakte in der IHC: Die üblichen Verdächtigen

Nach ein paar intensiven Tagen mit akribischen Gewebe-Waschschritten und Antikörper-Inkubationen ist meine Färbung endlich fertig. Ich starre sie unter dem Mikroskop an. Ich freue mich über das, was ich sehe: eine dunkelbraune Farbe genau dort, wo ich sie zu sehen erwarte! Bin ich gut oder was? Ich klopfe mir bildlich auf die Schulter und gebe mir ein imaginäres High Five. Aufgeregt und stolz rufe ich meinen Vorgesetzten an, der das Ergebnis aufmerksam betrachtet und mich dann mit Nachdruck und ziemlich überraschend auffordert, die Färbung zu wiederholen. Was ist falsch gelaufen? Was habe ich übersehen? Ich muss der Sache auf den Grund gehen!

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein gängiges Verfahren in der wissenschaftlichen Forschung und ein wertvolles Hilfsmittel in der Pathologie für die morphologische Diagnose und zur Untersuchung der Pathogenese von Krankheiten. Die korrekte Methodik und Interpretation eines immunhistochemischen Assays ist absolut entscheidend. Neben der Suche nach einem spezifischen Antikörper besteht eine große Herausforderung bei der IHC darin, unspezifische Wechselwirkungen zu reduzieren, ohne gleichzeitig die Antikörper-Epitop-Bindung zu beeinträchtigen. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, sind jedoch mehrfache Bemühungen und ein tiefes wissenschaftliches Wissen über die Technik, das Gewebe und das Zielprotein erforderlich.

Eine gute immunhistochemische Färbung wird erreicht, wenn eine ausreichende Menge des primären Antikörpers in die Probe eindringt, um das entsprechende antigene Ziel mit hoher Spezifität zu binden. In den meisten Fällen tragen jedoch dieselben physiochemischen Kräfte, die für spezifische Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen verantwortlich sind, wie z. B. hydrophobe Wechselwirkungen, ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbindung, auch zu unspezifischen Bindungen und anderen Artefakten bei.

Es gibt nichts Trügerischeres als eine offensichtliche Tatsache

Zu den üblichen Artefakten bei der IHC gehören unspezifische Bindung, hoher Hintergrund, Überfärbung oder zu schwache Färbung. Eine schwache Färbung kann als eine Färbung von mäßiger Intensität definiert werden, die in nicht mehr als 10 % oder weniger der Zellen vorhanden ist. Overstaining (auch *High Background*) liegt vor, wenn die Hintergrundfärbung so hoch ist, dass sie wichtige Merkmale und Strukturen des Gewebes verdeckt. Unspezifische Bindung bezieht sich auf die Bindung des Antikörpers, entweder des primären oder des sekundären Antikörpers, an etwas anderes im Gewebe als das vorgesehene Ziel, wie z. B. andere Proteine oder andere Epitope im Zielprotein.

Einen Verbrecher fangen: Wie löse ich meinen Fall?

Ich liebe und bewundere die kompromisslose detektivische Arbeit des Sammelns von Hinweisen, die immer im Mittelpunkt einer kriminalistischen Untersuchung steht. Die Tatortuntersuchung ist der Treffpunkt von Wissenschaft, Logik und strengen Protokollen. Beobachten, Befunde aufzeichnen, Verdächtige befragen, Fakten und Beweise zu Verdächtigen sammeln. Und man könnte behaupten, dass die Identifizierung der Fehlerquelle bei IHC-Färbungen eine identische Übung ist.

Es ist die Aufgabe des Detektivs, alle physischen Beweise zu untersuchen und den Tatort zu sichern und zu untersuchen. Die Bearbeitung eines Tatorts ist ein langwieriger, mühsamer Prozess, der eine detaillierte Dokumentation der Bedingungen am Tatort und das Sammeln aller physischen Beweise beinhaltet, die möglicherweise dazu beitragen können, aufzudecken, was passiert ist, warum es passiert ist und ohne den Schatten eines Zweifels auf den Schuldigen zu zeigen.

Wenden Sie den gleichen Ansatz bei Ihrer IHC-Fehlersuche an.

Ich schaue mir meine IHC-Färbung an: Was sehe ich?

Bei jeder Untersuchung sind die Details der Ereignisse, die von Zeugen geliefert werden, ein entscheidendes Element der gesammelten Beweise. Bei einem Immunhistochemie-Experiment wird die genaue Analyse der Färbeergebnisse Erkenntnisse aus verschiedenen Perspektiven liefern, aber diese Perspektiven müssen sorgfältig bewertet werden, um die Zuverlässigkeit der gelieferten Beweise, die Ursache und die erforderliche Lösung zu ermitteln.

Es ist nicht so schwer: Es dreht sich meist um drei Verdächtige.

Ein Immunhistochemie-Experiment ist eine Kombination aus drei Hauptelementen: Probe, Applikation und experimentelles Protokoll. Eine exzellente IHC-Färbung wird erreicht, wenn alle erforderlichen Elemente, Qualitäten und Eigenschaften perfekt aufeinander abgestimmt sind. Eine Kombination, die so gut ist, wie es nur möglich ist.

Wenn Sie also nach Verdächtigen suchen, die für das Artefakt in Ihrem IHC-Experiment verantwortlich sind, sollten Sie die 3 üblichen Verdächtigen im Auge behalten:

- Probe (Gewebe oder Zelle)
- Antikörper (primär und sekundär)
- IHC-Protokoll

Schauen Sie sich die folgende Tabelle genau an: Diese Tipps werden Ihnen helfen, den möglichen Übeltäter zu identifizieren.

	Beweis: Fehlende Färbung	**Beweis: Hoher Hintergrund**	**Beweis: Unspezifi Bindung**
Verdächtiger: Probe	Probe exprimiert das Antigen nicht.	Vorhandensein von Fc-Rezeptoren, die die Fc-Re von Antikörpern binden.	
	Schnitte sind zu dick und verhindern das Eindringen von Antikörpern.	Probe ist beschädigt oder nekrotisch.	Probe ist eingetrock
	Probe ist unzureichend fixiert oder überfixiert.		
	Probe ist eingetrocknet.		
Verdächtiger: Antikörper	Der primäre Antikörper funktioniert nicht in Ihrer Anwendung.	Unspezifische Bindung zwischen dem Fc-Teil des Antikörpers und endogenen Fc-Rezeptoren.	

Der primäre Antikörper kann das Zielprotein nicht in nativer Konformation detektieren (kein Problem bei IHC mit FFPE).		Antikörper nicht ausreichend verdünnt.	
Unsachgemäße Lagerung von Antikörpern.			
Inkompatible Antikörper.			
Verdächtiger: IHC-Protokoll	Fehlende oder ungeeignete Antigenerkennung.	Reagenzienunverträglichkeit oder unzureichende Waschen.	
	Überschüssiger Waschpuffer.	Ungeeignetes Fixiermittel, verlängerte Fixierzeit Intervall vor der Fixierung.	
	Überschüssige Blocking-Lösung.	Unzureichende Spüldauer.	Endogene Enzymaktivitäten werden nicht blocki
	Unzureichender chromogener Nachweis.	Ungeeignete Erkennungsmethode.	Falsche Temperatu oder falscher pH-W bei der Antigengewinnung.
		Verlängerte Zeit der Chromogenapplikation.	

Leseempfehlungen

Buchwalow I. et al. *Sci Rep.* (2011) 1: 28, Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts.

De Matos L.L., et al. *Biomarker Insights* (2010):5 9–20, Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and clinical practice.

Ramos-Vara J.A. and Miller M. A. Veterinary Pathology (2014) 51(1) 42-87, When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry: the red, brown, and blue technique.

Ward J.M. and Rehg J.E. *Veterinary Pathology*, (2013) 51 (1) 88-101, Rodent Immunohistochemistry: Pitfalls and Troubleshooting.

Geschrieben von Dr. Laura Pozzi

Dr. Laura Pozzi ist eine wissenschaftliche Autorin bei Atlas Antibodies. Sie hat einen Doktortitel in Life and Biomolecular Science von der Open University of London in Zusammenarbeit mit dem Mario Negri Institut für pharmakologische Forschung in Mailand. Laura hat als Forscherin am Karolinska Institutet in Schweden und in jüngerer Zeit als assoziierte Redakteurin gearbeitet. Sie kann auf eine lange Reihe wissenschaftlicher Publikationen als Erst- und Koautorin zurückblicken. Ihr Forschungsschwerpunkt liegt im Bereich der Neurowissenschaften mit einer breiten Erfahrung in der Validierung von Antikörpern und immunhistochemischen Techniken.