

Detection systems for multiple-target in situ hybridization and immunocytochemistry

Citation for published version (APA):

Speel, E. J. M. (1995). *Detection systems for multiple-target in situ hybridization and immunocytochemistry*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19950420es>

Document status and date:

Published: 01/01/1995

DOI:

[10.26481/dis.19950420es](https://doi.org/10.26481/dis.19950420es)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

In situ hybridization (ISH) allows to directly couple cytological and molecular information by visualizing nucleic acid sequences in the cellular context. Since its introduction in 1969, this technology has progressed from a laborious, time-consuming approach detecting only high-copy nucleic acid sequences with low resolution to a relatively fast, specific, and sensitive procedure localizing sequences as small as 1-5 kb in morphologically preserved chromosomes, cells, and tissue. Although radioactive detection systems are still utilized for ISH, the development and improvement of non-radioactive probe-labeling and detection systems in the last decade has simplified this technology considerably and revolutionized its impact in biomedical research. Chapter 1 reviews the detection procedures that are currently used for ISH, applying fluorochromes, enzymes, and colloidal gold as reporter molecules. Along with a comparison of aspects such as sensitivity, microscopic resolution, and usefulness in multiple-target detection protocols, possible improvements and new developments are being discussed. In addition, an overview is presented of approaches that combine ISH and immunocytochemistry (ICC) for the simultaneous detection of nucleic acid sequences and cellular proteins in the same biological sample. The main goal of this thesis is to contribute to the further development and general applicability of non-radioactive DNA ISH technology (chapters 2-5) as well as the combination of ISH and ICC (chapters 5 and 6). Furthermore, the primed in situ (PRINS) labeling procedure has been evaluated as an alternative to ISH (chapters 7 and 8). For the experiments described, both interphase and metaphase preparations of normal and malignant human tissue and cultured cells were used.

Chapter 2 describes the interactions that occur between avidin and biotinylated molecules in sensitive ISH detection systems, such as the avidin biotinylated enzyme complex (ABC) system and the amplification system using alternating detection layers of avidin conjugate and biotinylated goat anti-avidin antibody. By careful selection of different, subsequent detection layers and analysis of ISH signal intensities, more insight was obtained into the molecular basis of cytochemical complex formation. Since avidin molecules were found to be unsuited for the interconnection of two biotinylated molecular layers, other ways will have to be explored for increasing the ISH detection sensitivity. For example, one of the possibilities is the use of large conjugates consisting of polymer molecules (e.g., dextran sulfate or DNA) that are directly coupled to avidin or antibody molecules as well as reporter molecules.

In chapters 3-5, a number of enzyme cytochemical detection systems was further optimized for application to ISH. For this purpose, modified DNA probes were detected with avidin and/or antibody conjugates labeled with the enzymes alkaline phosphatase (APase), peroxidase (PO), or glucose oxidase, which produce differently colored, well localized, and permanent reaction products in appropriate precipitation reactions. Chapter 3 describes the use of the APase-Fast Red reaction, which produces a strongly red fluorescent precipitation product with extremely slow-fading properties. This enzyme cytochemical detection system exhibited at least the same sensitivity as conventional indirect fluorescence detection systems using fluorescein

isothiocyanate (FITC) or Texas Red as fluorochromes, allowing the visualization of DNA sequences up to the single gene level. The APase-Fast Red reaction product could also be visualized with reflection contrast microscopy (RCM) and brightfield microscopy (BFM) along with eight other enzyme precipitation products (chapter 4). RCM proved to be a very sensitive technique that can generate high resolution images on basis of reflected light from enzymatically stained preparations. In particular, the application of a thin protein layer that protects the precipitation product extended the usefulness of this procedure to virtually every appropriate enzyme precipitation reaction, and allows multiple-staining methods to be explored. Analysis of the nine different enzyme reaction products tested revealed, that two main reflection colors could be obtained, i.e., white and yellow, enabling double-target ISH in RCM. Further development of the technique may lead to additional reflection colors, such as red for the PO-tetramethylbenzidine (TMB) precipitate, enabling triple-target ISH with RCM. Chapter 5 reports the use of BFM for the simultaneous in situ localization of up to three different DNA target sequences on basis of the contrasting brown PO-DAB, red APase-Fast Red, and green PO-TMB precipitates. The entire detection procedure can be performed within three hours, including the embedding of the stained preparations in a thin protein layer, as described for RCM, to ensure stabilization of the enzyme precipitates and optimal color contrast. Although only repetitive DNA targets were detected with this procedure, the described enzyme reactions may also be utilized to simultaneously detect multiple single gene sequences. In this respect, the recently introduced catalyzed reporter deposition (CARD) system for PO signal amplification may be of help to produce strong and clearly contrasting ISH signals.

Combination of ISH and ICC is presented in chapters 5 and 6. In the protocols that were developed, ICC was always applied first, since protein epitopes are destroyed during the ISH procedure. For the ICC detection of cellular proteins, precipitating enzyme reaction products were used. These precipitates proved to be extremely stable during the ISH procedure and allowed the optimal enzymatic pre-treatment of the biological material. On the other hand, despite these precipitates, the ISH reagents were still able to reach and react with the target DNA. Using this approach, multiple-target ISH could be combined with ICC for BFM (chapter 5) as well as for fluorescence microscopy (chapter 6). The described methods enable the simultaneous analysis of phenotypic, genomic, and cell cycle parameters in the same sample and are thus valuable tools in the unraveling of molecular processes at the single cell level.

Chapters 7 and 8 deal with an alternative approach to label nucleic acid sequences in situ, i.e., the PRINS labeling method. It is based on the rapid annealing of specific oligonucleotide primers and subsequent primer extension by a polymerase reaction in the presence of labeled nucleotides. Chapter 7 describes the accurate localization of up to three different repetitive DNA sequences in chromosome preparations as a result of consecutive PRINS reactions and conventional fluorescence detection procedures. Alternatively, nucleic acid sequences could be visualized after PRINS with the triple-color detection procedure for BFM (chapter 8). Furthermore, new

protocols for the application of the PRINS technique to frozen tissue sections and immunostained cells are presented in chapter 8. For this purpose, proteolytic pre-treatment of the material is required to obtain reproducible results in morphologically preserved cell nuclei. The PRINS technique, thus, provides another way to detect specific nucleic acid sequences in different biological materials, but will have to be optimized with respect to sensitivity and specificity to be an acceptable alternative to the ISH technique. For this purpose, the use of repeated PRINS reactions or in situ polymerase chain reaction (in situ PCR) may be an interesting option. However, as long as the specific localization of single gene sequences in situ with this method is not routinely feasible, ISH is preferred.

SAMENVATTING

In situ hybridisatie (ISH) maakt het mogelijk om cytologische en moleculaire informatie direct met elkaar te koppelen middels het zichtbaar maken van nucleïnezuren in de cel. Vanaf de introductie in 1969 heeft deze technologie zich ontwikkeld van een bewerkelijke, tijdrovende benadering met beperkte resolutie, die slechts gebruikt kon worden voor het detecteren van nucleïnezuren die in hoog copie aantallen voorkomen, tot een relatief snelle, specifieke, en gevoelige procedure, waarmee genen van 1-5 kb te localiseren zijn in chromosomen, cellen, en weefsel met behoud van morfologie. Alhoewel radioactieve detectiesystemen nog steeds worden gebruikt voor ISH, heeft de ontwikkeling en verbetering van niet-radioactieve probe-labeling procedures en detectiesystemen deze technologie aanmerkelijk vereenvoudigd, waardoor toepassing in het biomedisch onderzoek op routinematige basis mogelijk is geworden. Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de ISH detectiesystemen die tegenwoordig worden toegepast en gebruik maken van fluorochromen, enzymen, en gouddeeltjes als reporter moleculen. Naast een vergelijking van aspecten zoals gevoeligheid, microscopische resolutie, en bruikbaarheid in meervoudige nucleïnezuur detectieprotocollen, worden mogelijke verbeteringen en nieuwe ontwikkelingen bediscussieerd. Voorts wordt een overzicht gegeven van methodes die ISH met immunocytochemie (ICC) combineren voor de simultane detectie van nucleïnezuren en eiwitten in hetzelfde biologische preparaat. Het hoofddoel van dit proefschrift is een bijdrage te leveren aan de verdere ontwikkeling en algemene toepasbaarheid van zowel de niet-radioactieve DNA ISH technologie (hoofdstukken 2-5) als van de combinatie van ISH en ICC (hoofdstukken 5 en 6). Daarnaast is de "primed in situ" (PRINS) labeling procedure geëvalueerd als een alternatief voor de ISH techniek. Voor de beschreven experimenten zijn zowel interfase als metafase preparaten gebruikt van normale en maligne humane weefsels en celkweken.

Hoofdstuk 2 beschrijft de interacties tussen avidine en gebiotinyleerde moleculen die gebruikt worden in gevoelige ISH detectiesystemen, zoals het avidine gebiotinyleerd enzym complex (ABC) systeem en het amplificatiesysteem dat gebruik maakt van afwisselende lagen avidine conjugaat en gebiotinyleerd geit anti-avidine antilichaam. Door middel van nauwkeurig gekozen, opeenvolgende detectielagen en de analyse van de daaruit resulterende ISH signaalintensiteit kon meer inzicht worden verkregen in de moleculaire basis van cytochemische complexvorming. Omdat avidine moleculen echter ongeschikt bleken te zijn voor het verbinden van twee gebiotinyleerde moleculaire lagen, zullen andere manieren moeten worden onderzocht voor het verhogen van de ISH detectiegevoeligheid. Een van de mogelijkheden is bijvoorbeeld het gebruik van grote conjugaten, bestaande uit polymere moleculen (zoals dextraansulfaat of DNA) die direct gekoppeld zijn aan avidine of antilichaam moleculen en tegelijkertijd aan reporter moleculen.

In de hoofdstukken 3-5 wordt de optimalisatie van een aantal enzymcytochemische detectiesystemen voor toepassing in ISH beschreven. Hiervoor werden gemodificeerde DNA probes gedetecteerd met avidine en/of antilichaam conjugaten, die gelabeld waren met alkalische fosfatase (APase), peroxidase (PO), of glucose oxidase, welke

verschillend gekleurde, goed gelocaliseerde en permanente reactieproducten genereren. Hoofdstuk 3 beschrijft het gebruik van de APase-Fast Red reactie, die een sterk rood fluorescerend precipitatieproduct oplevert dat tijdens belichting slechts geringe doving vertoont. Dit enzymcytochemisch detectiesysteem bleek tenminste dezelfde gevoeligheid te bezitten als conventionele fluorescentie detectiesystemen, gebruik makend van fluoresceïne isothiocyanaat (FITC) of Texas Red als fluorochromen, waardoor DNA sequenties tot op gen niveau zichtbaar konden worden gemaakt. Het APase-Fast Red reactieproduct kon ook gevisualiseerd worden met reflectie contrast microscopie (RCM) en helderveld microscopie (HVM) evenals acht andere enzym precipitatieproducten (hoofdstuk 4). RCM is een zeer gevoelige techniek, waarmee beelden met een hoge resolutie gegenereerd kunnen worden op basis van gereflecteerd licht afkomstig van enzymatisch gekleurde preparaten. Met name het aanbrengen van een dun eiwitlaagje ter afscherming van het precipitatieproduct heeft de bruikbaarheid van deze procedure uitgebreid tot elke geschikte enzymprecipitatie reactie, waardoor meervoudige kleuringsmethoden kunnen worden ontwikkeld. Analyse van de negen geteste enzym reactieproducten toonde aan dat twee reflectiekleuren verkregen kunnen worden, namelijk wit en geel, waardoor ISH detectie van twee verschillende nucleïnezuren met behulp van RCM mogelijk wordt. Verdere ontwikkeling van de techniek kan leiden tot extra reflectiekleuren, zoals het rood reflecterende PO-tetramethylbenzidine (TMB) precipitaat, waardoor een drievoudige detectie mogelijk wordt. Hoofdstuk 5 belicht het gebruik van HVM voor de simultane in situ localisatie van drie verschillende DNA sequenties op basis van het contrast tussen het bruine PO-DAB, rode APase-Fast Red, en groene PO-TMB precipitaat. De gehele detectieprocedure kan binnen drie uur worden uitgevoerd, inclusief het afdekken van de gekleurde preparaten met een dun eiwitlaagje, zoals beschreven voor RCM, om stabilisering van de enzymprecipitaten en een optimaal kleurcontrast te waarborgen. Alhoewel tot nu toe alleen repeterende DNA sequenties werden gedetecteerd met deze procedure, kunnen de beschreven enzymreacties mogelijk ook benut worden om meerdere gensequenties simultaan zichtbaar te maken. Hierbij zou het recentelijk geïntroduceerde "catalyzed reporter deposition" (CARD) systeem voor PO signaal amplificatie van nut kunnen zijn middels het produceren van sterke en duidelijk contrasterende ISH signalen.

De combinatie van ISH met ICC wordt beschreven in de hoofdstukken 5 en 6. In de ontwikkelde protocollen wordt steeds begonnen met de ICC detectie, omdat eiwit-epitopen kunnen worden vernietigd tijdens de ISH procedure. Voor de ICC detectie van cellulaire eiwitten worden precipiterende enzym reactieproducten gebruikt. De precipitaten blijken namelijk stabiel tijdens de ISH procedure en maken daardoor een optimale voorbehandeling van het biologische materiaal mogelijk. Ondanks de aanwezigheid van deze precipitaten, zijn de ISH reagentia toch in staat DNA te bereiken en ermee te reageren. Met behulp van deze benadering kan meervoudige nucleïnezuurdetectie worden gecombineerd met ICC voor gebruik in zowel HVM (hoofdstuk 5) als in fluorescentie microscopie (hoofdstuk 6). De beschreven methoden maken het mogelijk om fenotypische, genomische en celcyclus parameters gelijktijdig

te analyseren in hetzelfde preparaat en zijn dus waardevolle instrumenten bij het ontrafelen van moleculaire processen op cellulair niveau.

De hoofdstukken 7 en 8 behandelen een alternatieve benadering voor in situ nucleïnezuurlabeling, namelijk de PRINS methode. Deze techniek is gebaseerd op de snelle hybridisatie van specifieke oligonucleotide primers en daaropvolgende primer-extensie middels een polymerase reactie in de aanwezigheid van gelabelde nucleotiden. Hoofdstuk 7 beschrijft de nauwkeurige localisatie van drie verschillende repeterende DNA sequenties in chromosoompreparaten na opeenvolgende PRINS reacties en conventionele fluorescentie detectieprocedures. Deze nucleïnezuren kunnen na de PRINS reacties ook zichtbaar worden gemaakt met de driekleuren HVM detectie procedure (hoofdstuk 8). Voorts worden nieuwe protocollen voor de toepassing van de PRINS techniek op vriescoupees en immunocytochemisch gekleurde cellen gepresenteerd. Hiervoor bleek proteolytische voorbehandeling van het materiaal noodzakelijk om reproduceerbare resultaten te verkrijgen in morfologisch intacte celkernen. De PRINS techniek maakt het mogelijk specifieke nucleïnezuren te detecteren in verschillende typen biologisch materiaal, maar zal verder moeten worden geoptimaliseerd met betrekking tot gevoeligheid en specificiteit om een acceptabel alternatief te kunnen zijn voor de ISH techniek. Het gebruik van herhaalde PRINS reacties oftewel in situ polymerase ketting reactie (in situ PCR) kan hiervoor een interessante optie zijn. Echter, zolang de specifieke localisatie van gensequenties in situ niet routinematig mogelijk is met behulp van deze methode, zal de voorkeur uitgaan naar ISH.