

Immunologie: Histochemie

Fluorochromierte Antikörper und- (Strept-)avidin-Konjugate

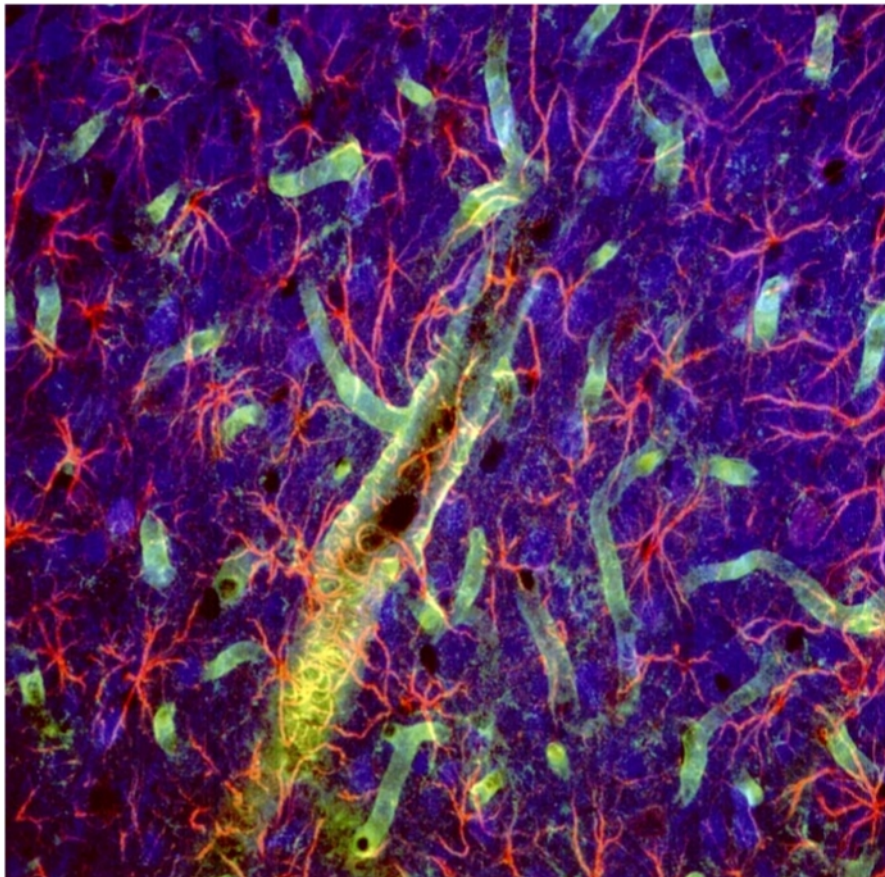


Abbildung 1: Falschfarben-Darstellung der Dreifach-Fluoreszenz von Gefäßen, Astroglia und Nervenzellen im Cortex der Ratte durch konfokales Laserscanning (Zeiss LSM 510). Darstellung der Gefäße mit einem biotinylierten Lektin und Cy2-Streptavidin (grün) kombiniert mit der Markierung von GFAP-Immunreaktivität in Astroglia (Cy3, rot) und PGP9.5-Immunreaktivität in Neuronen (Cy5, blau).

Histochemische Verfahren, bei denen Antigene durch Immunfluoreszenz, d.h. durch fluorochromierte Antikörper, dargestellt werden, gewinnen stetig an Bedeutung. Dies hat vor allem folgende Gründe: Neuartige Fluorochrome ermöglichen stabile Markierungen mit hoher Sensitivität.

Immunfluoreszenz-Techniken sind meist weniger arbeitsaufwendig als enzymimmunochemische Verfahren (mit den Markerenzymen Meerrettich-Peroxidase und Alkalische Phosphatase). Gleichzeitige Darstellungen von zwei und mehr Antigenen im gleichen Gewebe sind mit Fluoreszenzmarkierungen oft erheblich einfacher und deutlicher als mit den auf Markerenzymen beruhenden Prozeduren. Fluoreszenz-Mehrfachmarkierungen sind das Mittel der Wahl, um die Co-Expression von Antigenen z.B. in Zellen oder Zellkompartimenten.

Die Etablierung einfacher und effizienter Verfahren zur Unterdrückung der Eigenfluoreszenz in Geweben (Schnell et al. 1999) erlaubt die umfangreiche Anwendung von Immunfluoreszenz-Techniken auch bei der Analyse autoptischer Gewebeproben in der Pathologie.

Fluorochromierte Zweitantikörper werden vor allem für die histochemische Darstellung von Antigenen durch **indirekte Immunfluoreszenz** benötigt. Diese Verfahren basieren auf dem Einsatz unmodifizierter Primärantikörper, die in einem zweiten Inkubationsschritt von Fluoreszenz-markierten Immunglobulinen G (IgG) visualisiert werden, wobei diese fluorochromierten Antikörper gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet sind. Jackson ImmunoResearch Inc. offeriert die breiteste Palette solcher Immunreagenzien, wobei alle Produkte hochspezifisch sind und ein optimiertes Fluorophor/Protein-Verhältnis aufweisen.

Methoden der indirekten Immunfluoreszenz sind weniger störanfällig und kostengünstiger als Verstärker-Techniken einschließlich des sogenannten Tyramid-Systems. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit kann erzielt werden, indem in folgender Weise auf fluorochromierte „dritte Antikörper“ zurückgegriffen wird: Erstantikörper (z.B. aus der Maus) ~ Zweitantikörper (z.B. Cy3-Ziege-anti-Maus) ~ „dritter Antikörper“, gerichtet gegen IgG aus der Spezies des Zweitantikörpers (z.B. Cy3-Esel-anti-Ziege) [siehe auch Svensson 1991]. Weitere sensitive Techniken schließen biotinylierte Sekundärantikörper ein, die in breiter Palette von uns angeboten werden und durch fluorochromierte (Strept-)Avidin oder anti-Biotin-Konjugate visualisiert werden können.

Liegen an Haptene wie Biotin oder Digoxigenin gekoppelte Primärantikörper (oder Lektine für die Detektion von Glykokonjugaten) vor, können auch sie mit Hapten-erkennenden fluorochromierten Reagenzien in großer Vielfalt (gekoppelt an AMCA, FITC, Cy2, Cy3 und Cy5) visualisiert werden. In Betracht kommen dabei Streptavidin-, Avidin- und anti-Biotin-Konjugate für die Darstellung biotinylierter Marker, während anti-Digoxin-Konjugate stark mit dem Aglycon Digoxigenin kreuzreagieren und somit geeignet für die Detektion digoxigenylierter Proteine sind (siehe Härtig et al. 1996).

Hapten-anti-Hapten-Techniken sind unter anderem dann von Vorteil, wenn in Mausgeweben (z.B. von transgenen Tieren) der Einsatz von sekundären, gegen Maus gerichteten Antikörpern unerwünscht zur Detektion endogener Immunglobuline führen würde.

Bei der **Wahl des Fluorophors** sind die Möglichkeiten zur Analytik gefärbter Präparate zu berücksichtigen. Besonders wesentlich ist dabei besonders die Art der verfügbaren Lichtquellen und Filtersets. Zur Grundausrüstung von Fluoreszenzmikroskopen gehört ein sogenannter „Fluorescein“-Filter, der nach „Blau-Anregung“ grün fluoreszierende Strukturen visualisiert. Fluorescein, das in der Vergangenheit ausschließlich mittels Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) an Proteine gekoppelt wurde (womit der gebräuchliche, aber nicht korrekte Name „FITC-Konjugate erklärbar ist) wird weiterhin häufig verwendet. Die ebenfalls seit langem etablierten Tetramethylrhodamin (TRITC)-gekoppelten Antikörper erlauben in Kombination mit grüner Immunfluoreszenz grundsätzlich die Doppelmarkierung von Antigenen. Durch die Einführung von ebenfalls rot fluoreszierenden, aber bei höherer Wellenlänge emittierenden Texas Red-Konjugaten ist seit fast zwei Jahrzehnten eine verbesserte Separation von grüner und roter Fluoreszenz möglich. Ähnlich günstige Spektraleigenschaften besitzen die noch leuchtstärkeren und stabilen Rhodamin-Red-X-Konjugate.

Indodicarbocyanin-konjugierte Immunreagenzien weisen sowohl eine herausragende Fluoreszenzintensität als auch eine äußerst geringe Neigung zu unspezifischen Bindungen auf. **Carbocyanine gelten heute als ein Mittel der Wahl für die Immunfluoreszenz.** Das stark rot fluoreszierende Carbocyanin 3 (Cy3) zeigt eine geringe Tendenz zum Ausbleichen (siehe Wessendorf & Brelje 1992) und ist bei geeigneter Lagerung langzeitstabil. In ähnlicher Weise zeigt sich Cy2 als ein stark grün fluoreszierendes Fluorochrom, das besonders in organischen Einschlußmitteln stabil ist. Eine Schwierigkeit bei Doppelmarkierungen besteht jedoch in der teilweisen Überlappung der Spektren von Cy3 und Cy2 (und FITC). Dieses Problem wird gelöst durch die Ausrüstung der zur Analyse der Färbungen eingesetzten Mikroskope mit geeigneten Lang- bzw. Kurzpaßfiltern. Für die meisten Doppelmarkierungen, bei denen die Darstellung zweier Antigene mit Primärantikörpern aus unterschiedlichen Wirtsspezies (oft z.B. Kaninchen und Maus) durchgeführt wird, ist der Einsatz der - simultan einsetzbaren und nicht kreuzreagierenden - Cy2- und Cy3-markierten Zweitantikörper (z.B. Cy2-Ziege-anti-Kaninchen und Cy3-Ziege-anti-Maus) zu bevorzugen.

Sind Dreifach-Fluoreszenzmarkierungen beabsichtigt, deren Analyse mit konventionellen Fluoreszenz-mikroskopen erfolgen soll, sind blau fluoreszierende AMCA- (7-Amino-4-methylcoumarin-3-acetyl-) Konjugate in Kombination mit grüner und roter Immunfluoreszenz empfehlenswert. AMCA wird durch UV-Licht angeregt, wobei die entsprechenden Filter so zu konfigurieren sind, daß unerwünschtes „Durchscheinen“ von Cy2-Markierungen vermieden wird. Bei Mehrfachmarkierungen erweist es sich als günstig, das am stärksten exprimierte Antigen mit dem vom menschlichen Auge vergleichsweise schwächer wahrgenommenen AMCA zu detektieren. Bei der photographischen Dokumentation empfiehlt sich dann die Verwendung Blaulicht-empfindlicher Filme.

Für eine Analyse mit der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) sind Cy5-Markierungen hervorzuheben. Sie weisen eine hohe Fluoreszenzintensität und Photostabilität auf. Das Emissionsmaximum von Cy5 liegt bei 667 nm und damit in einem langwelligen Spektralbereich, in dem Gewebe vergleichsweise wenig Eigenfluoreszenz (z.B. durch Lipofuscin) zeigen. Die histochemische Analyse von Geweben mit starker Pigmentierung und z.B. auch von autoptischem Material seniler Fälle kann daher mit Cy5-Immunkonjugaten und CLSM erfolgen, wogegen Cy5 wegen seiner spektralen Eigenschaften für die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie ungeeignet ist. Für die simultane Darstellung verschiedener Antigene mittels Laser-Scanning und

Falschfarben-Darstellung (siehe Abb. 1 und 3) können Cy5-Reagenzien z.B. mit rot fluoreszierenden Rhodamin Red X- und (geräteabhängig) mit Cy3-Konjugaten sowie mit praktisch allen grün und blau fluoreszierenden Konjugaten kombiniert werden. Maßgeschneidert für Mehrfachmarkierungen (Multiple Labeling) sind besonders hochgereinigte Reagenzien, die mit ML gekennzeichnet sind.

Sollen immunhistochemische Fluoreszenzmarkierungen mit Kernfärbungen kombiniert werden, bietet sich neben verschiedenen grün fluoreszierenden Farbstoffen (siehe Suzuki et al. 1997) das stark blau fluoreszierende Bisbenzimid (Hoechst-Farbstoff 33258) (Schnell & Wessendorf 1995) an.

Zur **Verminderung von Fehlerquellen** sollte bei Mehrfachmarkierungen mit in der gleichen Tierspezies generierten Zweitantikörpern gearbeitet werden (siehe auch Protokoll zu Abb. 2). Eine adäquate Blockierlösung für die Verdünnung des Erstantikörpers und zur Verhinderung seiner unspezifischen Bindung an das Gewebe enthält oftmals ca. 5% Normal-Serum aus der Wirtsspezies der Zweitantikörper. Tendieren die eingesetzten Primärantikörper stark zu unspezifischer Gewebefindung, kann auch mit 10-20% Normalserum geblockt werden. Um einen möglichen unerwünschten „Background“ durch die unspezifische Reaktion von Geweben mit fluorochromierten Antikörpern und (Strept-)Avidin-Konjugaten herabzusetzen, verdünnt man diese Reagenzien üblicherweise in Puffer, der auch 2% Rinder-Serumalbumin enthält. Noch kostengünstiger als mit Rinder-Serumalbumin kann die Blockierung durch Zusatz von entfettetem Trockenmilchpulver erfolgen. Sowohl Rinder-Serumalbumin als auch Trockenmilchpulver müssen jedoch frei von Serumproteinen sein, weil letztere unerwünscht, vor allem mit anti-Ziege-Konjugaten (und stark kreuzreaktiven anti-Schaf-Konjugaten) reagieren würden.

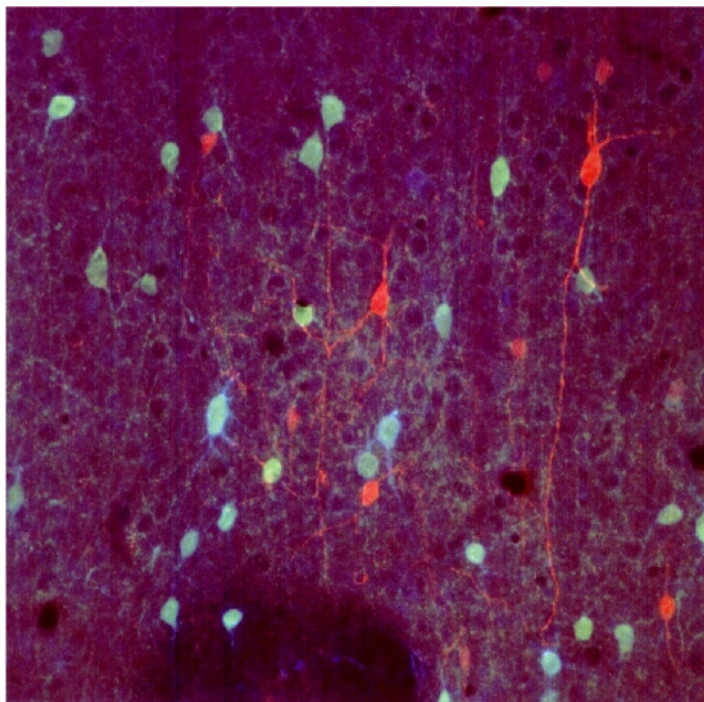


Abbildung 2: Falschfarben-Darstellung der Dreifach-Immunfluoreszenz Kalzium-bindender Proteine in Nervenzellen im Cortex der Ratte durch konfokales Laserscanning (Zeiss LSM 510). Darstellung von Calbindin mit Cy2 (grün) kombiniert mit der Detektion von Parvalbumin (Cy3, rot) und Calretinin (AMCA, türkis).

Protokoll zur Carbocyanin-Dreifachmarkierung der Kalzium-bindenden Proteine Calbindin, Parvalbumin und Calretinin mit Cy2, Cy3 und AMCA

Die Zytochemie Kalzium-bindender Proteine ist oft eine Methode der Wahl zur Darstellung morphologischer Details immunpositiver Nervenzellen. Mehrfachmarkierungen dieser Marker tragen zur Aufklärung von komplizierten Struktur-Funktions-Beziehungen im Zentralnervensystem bei.

- alle Schritte bei Raumtemperatur -

- § 30 µm-dicke, frei bewegliche Gefrierschnitte von Paraformaldehyd-fixiertem Rattenhirn;
- § 3 x 10 min Waschen des Gewebes mit 0,1 M Tris-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,4 (TBS)
- § Blocken unspezifischer Bindungsstellen des Gewebes mit 5% Esel-Normalserum (Katalog-Nummer 017-000-001) in TBS + 0,3% Triton X-100 (=ENS-TBS-T); 1 h
- § Inkubation mit einem Cocktail primärer Antikörper in ENS-TBS-T; 16 h bei Raumtemperatur:
 - Maus-anti-Calbindin [1:200; Sigma]
 - Kaninchen-anti-Parvalbumin [1:500; Swant]
 - Ziege-anti-Calretinin [1:100; Swant]
- § 3 x 10 min Waschen der Schnitte mit TBS;
- § Inkubation mit einem Cocktail sekundärer fluorochromierter Antikörper [Dianova, verdünnt mit TBS (+ 2% Rinderserumalbumin, z.B. Fraktion V)]; 1 h:
 - Cy2-Esel-anti-Maus IgG (Katalog-Nummer: 715-225-151; 20 µg/ml)
 - Cy3-Esel-anti-Kaninchen IgG (711-165-152; 20 µg/ml)
 - AMCA-Esel-anti-Ziege IgG (705-155-147; 30 µg/ml)
- § 3 x 10 min Waschen der Schnitte mit TBS und mit destilliertem Wasser (1 min)
- § Aufziehen auf **fluoreszenzfreie** Objektträger; Lufttrocknung
- § Eindecken z.B. mit Entellan (in Toluol; Merck) oder mit einem wäßrigen Eindeckmedium.

Alternativ kann die Inkubation der Primärantikörper generell bei 4°C für zwei bis drei Tage statt über Nacht bei Raumtemperatur erfolgen.

Im Anschluß an den Einsatz geeigneter Primärantikörper lassen sich die Methoden der Immunfluoreszenz auch mit Paraffin- und Kryostatschnitten sowie mit Wholemouts durchführen. Zur empfindlichen Darstellung bestimmter, oft Membran-assoziiertes Antigene behandelt man die Gewebe während der histochemischen Verfahren mit Detergenzien (häufig verwendet: 0,1-1% Triton X-100, das oft der Blockierlösung für die Primärantikörper zugefügt wird). Weil Triton irreversibel wirkt, reicht sein einmaliger Einsatz während der Versuche und es kann auf seinen Zusatz zu Sekundärantikörpern verzichtet werden. Durch höhere Tritonanteile in Inkubationslösungen, die für verschiedene immunhistochemische Verfahren eingesetzt werden, können Artefakte wie z.B. Myelinfärbungen auftreten (siehe Weruaga et al. 1998).

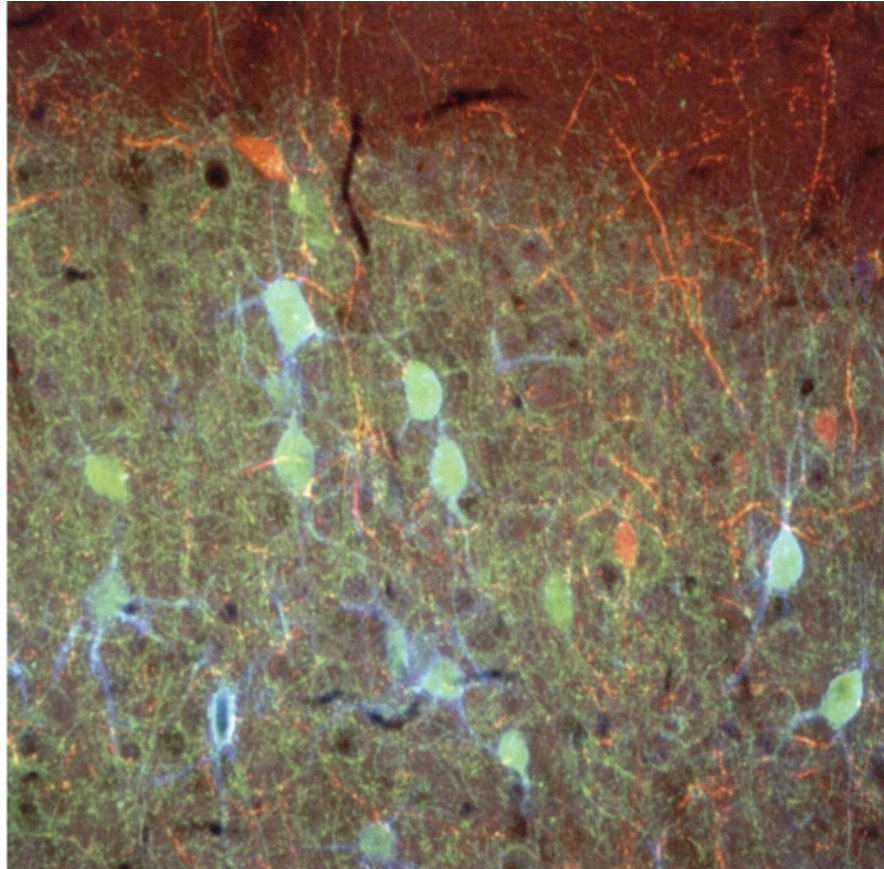


Abbildung 3: Carbocyanin-Dreifachmarkierung: Detektion von Chondroitinsulfat-Proteoglykanen (CSPG) in perineuronalen Netzen der extrazellulären Matrix der Ratte (türkis) kombiniert mit der Immunmarkierung von Parvalbumin (grün) und Calretinin (rot) im Cortex der Ratte: Falschfarbendarstellung mit Hilfe des LSM 510 (Zeiss)

Detektionsprinzip:

(Cocktail primärer Antikörper)

Kaninchen-anti-CSPG

Maus-anti-Parvalbumin

Ziege-anti-Calretinin

ò

ò

ò

(Cocktail sekundärer Antikörper)

Cy5-Esel-anti-Kaninchen IgG

Cy2-Esel-anti-Maus IgG

Cy3-Esel-anti-Ziege IgG

Alternative Färbevarianten mit fluorochromierten Antikörpern :

Steht kein für die Detektion von Cy5 geeignetes Laserscanningmikroskop zu Verfügung, ist die Visualisierung von Kaninchen-anti-CSPG auch mit blau fluoreszierendem AMCA-Esel-anti-Kaninchen IgG möglich. Für die Darstellung von Parvalbumin-Immunreaktivität mittels grüner Immunfluoreszenz stehen auch FITC- Konjugate von Esel-anti-Maus IgG zur Verfügung. Rot fluoreszierende Konjugate von TRITC oder Texas Red und Esel-anti-Kaninchen IgG bieten sich ebenfalls für die Darstellung von Calretinin-Immunreaktivität an.

Stabilität der Präparate

Markierungen mit Cy5 und anderen Indocarbocyaninen (Cy2, Cy3) sind langzeitstabil, wenn sie mit (luftblasenfreiem) Entellan (in Toluol; Merck) eingedeckt werden. Die Lagerung mit in Entellan eingeschlossener Präparate in der Dunkelheit bei 4°C gewährleistet eine in der Regel monatelange, meist mehrere Jahre dauernde Stabilität der Färbungen.

Wäßrige Eindeckmedien wie z.B. Histosafe sind zu bevorzugen, wenn Gewebedeformationen beim Eindecken weitgehend vermieden werden sollen. Um das Ausbleichen (Fading) während der Lagerung und vor allem bei der mikroskopischen Analyse zu reduzieren, sollten kommerziell erhältliche Eindeckmittel genutzt werden, die Anti-Fading-Substanzen enthalten. Alternativ können kostengünstige wäßrige Einschlußmittel wie Glycerol/Gelatine kurz vor ihrer Nutzung mit derartigen Substanzen (wie z.B. n-Propyl-Gallat oder para-Phenylendiamin) versetzt werden.

Literatur zu Fluochromen und zur Fluorochromierung von Antikörpern

Brinkley, M. (1992) A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and crosslinking reagents. *Bioconjug. Chem.* 3, 2-13

Mujumdar, R.B., Ernst, L.A., Mujumdar, S.R., Lewis, C.J. & Waggoner, A.S. (1993) Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidylesters. *Bioconjug. Chem.* 4, 105-111

Cullander, C. (1994) Imaging in the far-red with electronic light microscopy: Requirements and limitations. *J. Microsc.* 176, 281-286

Härtig, W. & Fritschy, J.-M. (2000) Immunofluorescence: conjugation of dyes to antibodies. In: *Embryonic Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group London. [www.els.net]

Literatur zu Einfach- und Mehrfach-Markierungen

Svensson, M.A.J. (1991) Increased sensitivity of the indirect immunofluorescence method by use of a tertiary fluorochrome-labeled antibody. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 235-237

Schnell, S.A. & Wessendorf, M.W. (1995) Bisbenzimidazole: a fluorescent counterstain for tissue autoradiography. *Histochemistry* 103, 111-114

Härtig, W., Brückner, G., Brauer, K., Seeger, G. & Bigl, V. (1996) Triple immunofluorescence labelling of parvalbumin, calbindin-D28k and calretinin in rat and monkey brain. *J. Neurosci. Methods* 67, 89-95

Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T. & Takata, K. (1997) DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 49-53

Ferri, G.-L., Gaudio, R.M., Castello, I.F., Berger, P. & Giro, G. (1997) Quadruple immunofluorescence: A direct visualization method. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 155-158

Weruaga E., Alonso, J.R., Porteros, A., Crespo, C., Arévalo, R., Briñón, J.G., Velasco, A. & Aijón, J. (1998) Nonspecific labeling of myelin with secondary antisera and high concentrations of Triton X-100. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 109-117

Wouterlood, F.G., van Denderen, J.C.M., Blijleven, N., van Minnen, J. & Härtig, W. (1998) Two-channel dual-immunofluorescence confocal laser scanning microscopy using Cy2- and Cy5-conjugated secondary antibodies for the unequivocal detection of co-localization of neuronal markers. *Brain Res. Prot.* 2, 149-159

Hanzel, D.K., Trojanowski, J.Q., Johnston, R.F. & Loring, J.F. (1999) High-throughput quantitative histological analysis of Alzheimer's disease pathology using a confocal digital microscanner. *Nat. Biotechnol.* 17, 53-57

Literatur zur Beseitigung von Eigenfluoreszenz in Geweben

Schnell, S.A., Staines, W.A. & Wessendorf, M.W. (1999) Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. J. Histochem. Cytochem. 47, 719-730

Weiterführende Literatur zu Fluoreszenzmarkierungen

Brelje, T.C., Wessendorf, M.W. & Sorenson, R.L. (1993) Multicolor laser scanning confocal immuno-fluorescence microscopy: Practical application and limitations. Methods Cell. Biol. 38, 97-131

Storch, W.B. (1997) Immunfluoreszenzfibel . Grundlagen und neue Anwendungen in der klinischen Immunologie. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin . Wien

Fritschy, J-M. & Härtig, W. (2000) Immunofluorescence. In: Embryonic Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group London. [www.els.net]

Die von der dianova GmbH angebotenen Sekundärantikörper stammen ausschließlich vom Hersteller Jackson ImmunoResearch Inc. (West Grove, PA, USA).

Die Abbildungen 1-4 wurden von Dr. Wolfgang Härtig (Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität Leipzig) und Dr. Jens Grosche (IZKF, PFI, Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt.

Diese komplette Ausarbeitung stammt aus der Feder von Herrn Dr. W. Härtig. Hierfür möchten wir uns an dieser Stelle nochmals bedanken

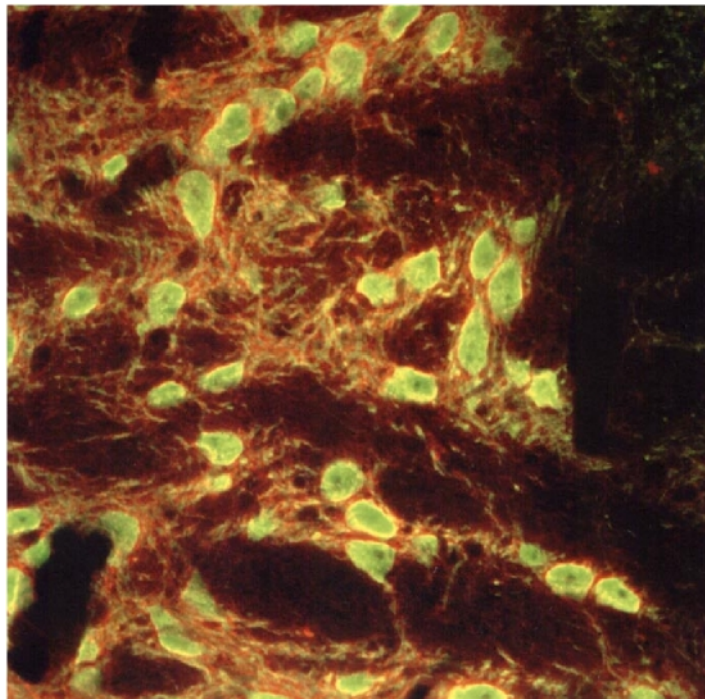


Abbildung 4: Carbocyanin-Doppelmarkierung von Parvalbumin (Cy2, grün) und Chondroitinsulfat-Proteoglykanen (Cy3, rot) in einem subcorticalen Kerngebiet der Maus. Konfokales Laserscanning mit Zeiss LSM 510.