

1. Fluor. mikroskopie (alle)

**Behandlung: UV, Färbung mit
DiOC₆, Hoechst**

2. Caspaseassay als Apoptose-Nachweis

3. Zellzyklus und sub-G1

Inhalt Theorie

Cytotoxische Assays

Apoptose-Detektion (außer Caspase)

JC-1

Kern-, DNA-Fragmentierung:

Kernfärbung mit DAPI, Hoechst

DNA-Fluoreszenzfärbung mit PI,
Messung von sub-G1 am FACS (s.
Zellzyklus)

Fluoreszenzmikroskopie

Membranfärbung mit TMRM (Rhodamin)
oder DiOC6

Zellzyklus

Techniken in der Zellbiologie

Fluoreszenzmessungen

Flow Cytometer: Analyse und Sortieren

Mikrotiterplattenfluorimeter

(Konfokales Laser-) Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzspektrophotometer

Absorptionsmessungen

ELISA-Reader

Absorptionsspektralphotometer

Mikroskopie

Phasenkontrastmikroskop

(Raster-)Elektronenmikroskop

Fluoreszenzmikroskop w.o.

andere

Elektrophysiologische Messungen

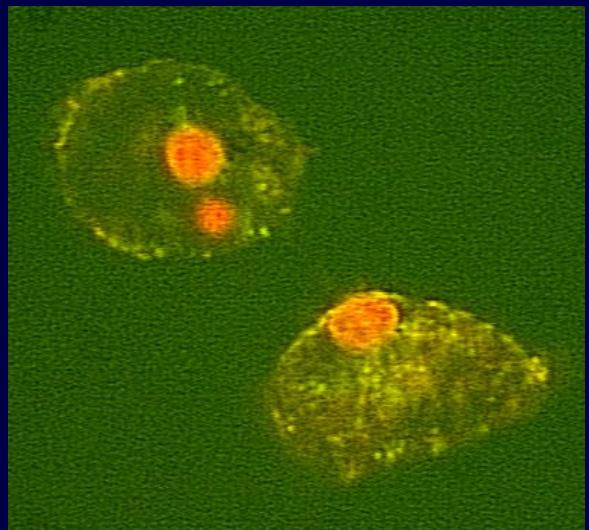
Cytotoxische Assays

MTT: Umsetzung von Tetrazolium-Salz zu blauem Formazan durch intakte Mitochondrien;

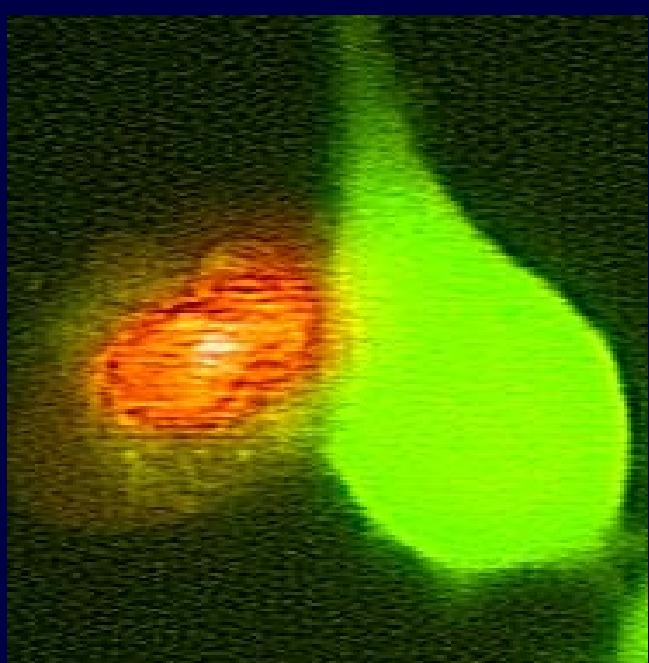
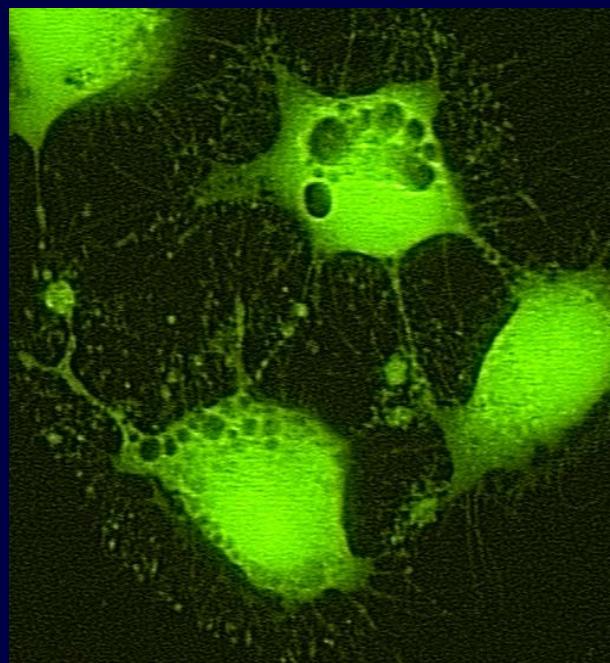
TB: Trypan Blue Letalfärbung, zeigt fehlende Membranintegrität an;

PI: Propidium Iodid, DNA-interkalierender Farbstoff, fluoresziert;

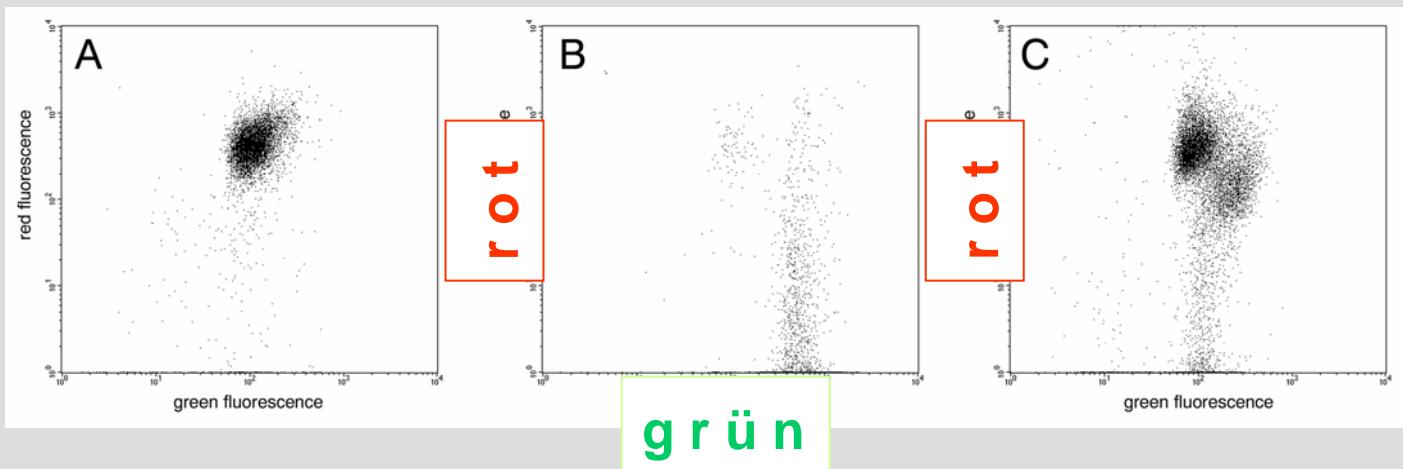
Live/Dead (Calcein AM und Ethidium Homodimer) zum Nachweis von lebenden (Calcein \Rightarrow Esterasen) und toten (Ethidium Homodimer wie PI) Zellen, fluoresziert



Staining of fibroblasts with Annexin V + PI or calcein + ethidium homodimer



Apoptose-Detektion: Mitochondriales Membranpotential (JC-1)

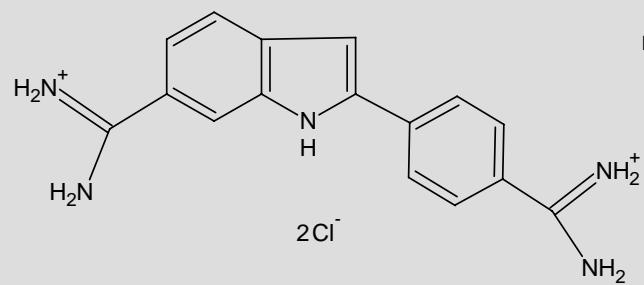


Kontrollen (A, unbehandelt), Nekrose (B, hitzebehandelte Zellen, 30 min bei 56° C) und eine Mischpopulation nach Behandlung; eine neue Population tritt auf.

3 Populationen: 1) Kontrollzellen (A) mit hoher Rot- und niedriger Grünfluoreszenz; 2) Nekrosen (B) mit hoher Grün- und stark reduzierter Rotfluoreszenz, und 3) nach PDT (C) eine zusätzliche Population mit erniedrigter Rot- und leicht erhöhter Grünfluoreszenz = Apoptosen.

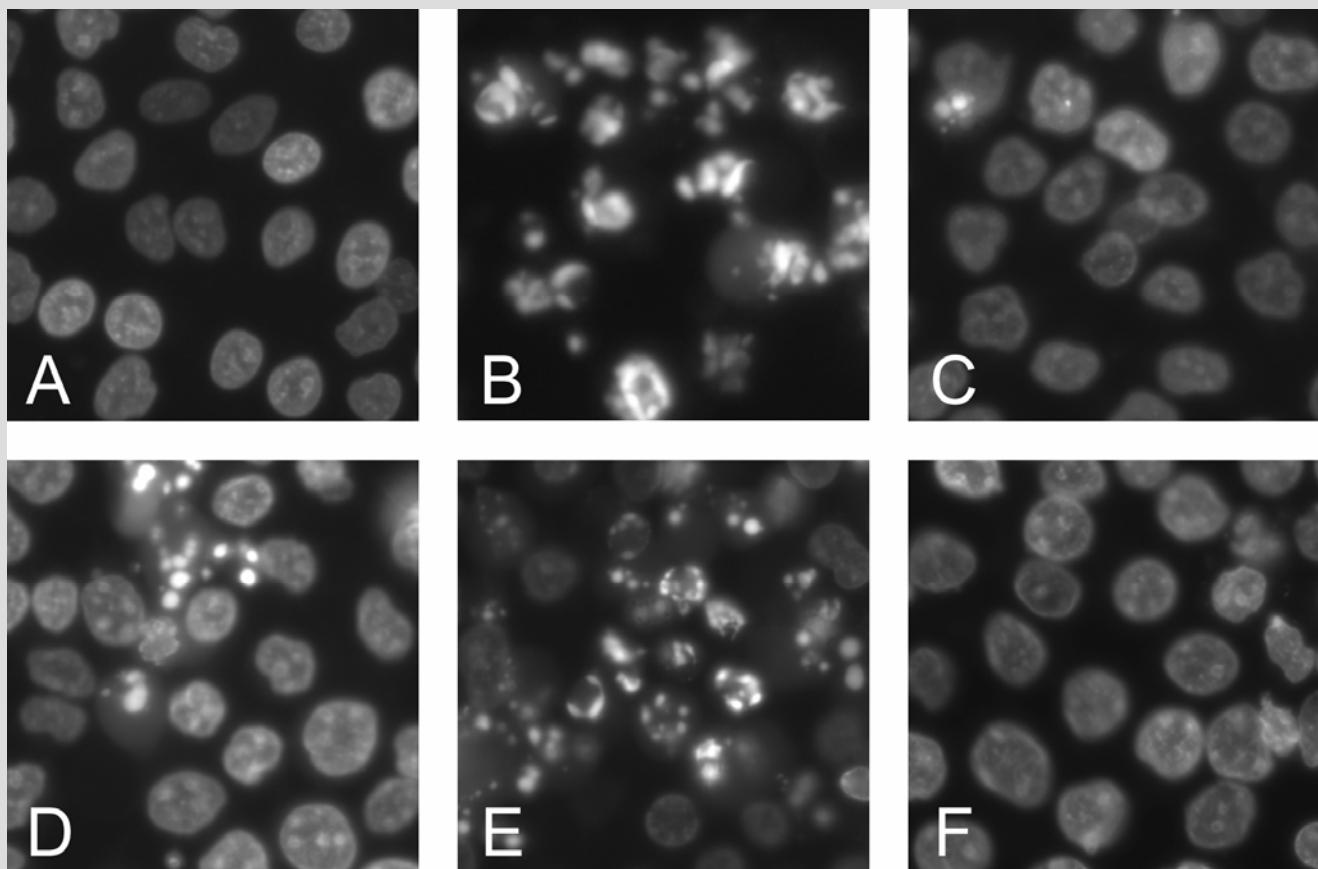
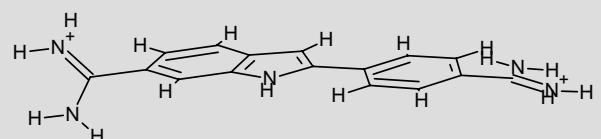
Kernfärbung: DAPI (Hoechst)

Struktur für DAPI



4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochlorid

3D-optimiert

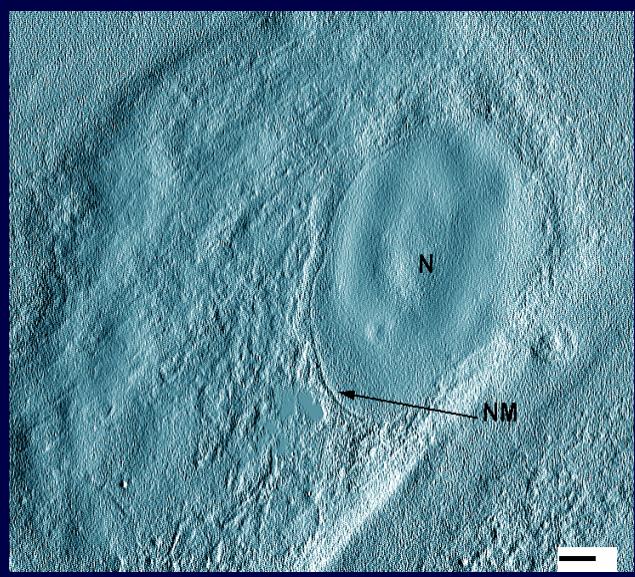
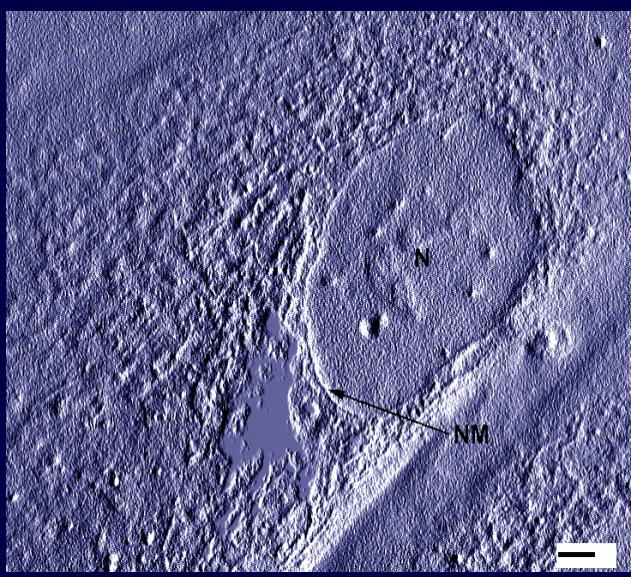
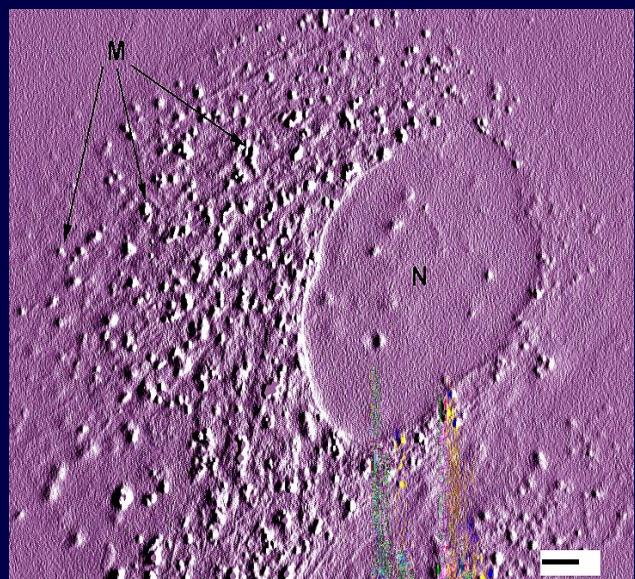
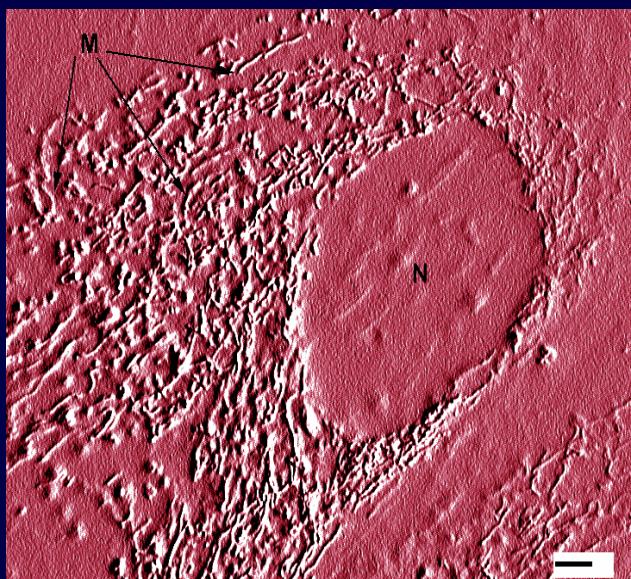


A: Kontrolle; B: UV; C-F: photodyn. Behandlung

Fluoreszenz-Mikroskopie

Färbung von geschädigten Mitochondrien mit Rhodamin

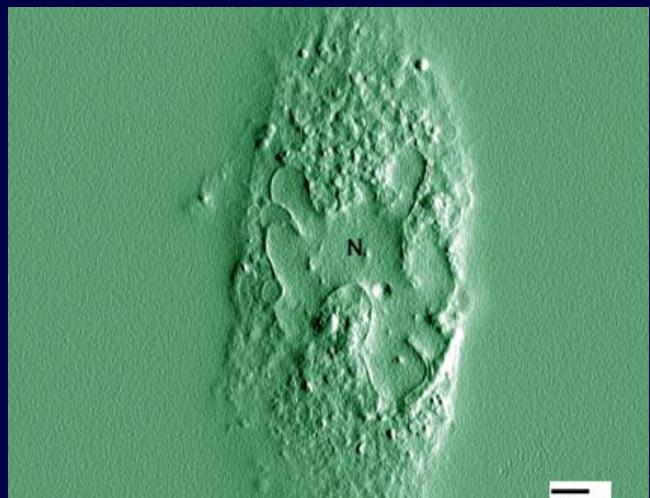
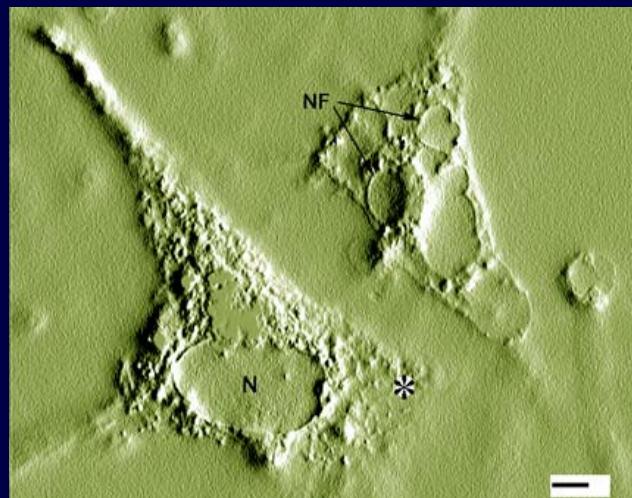
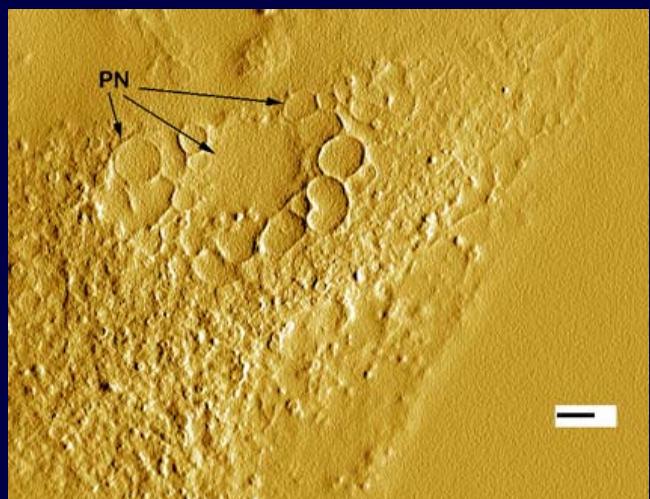
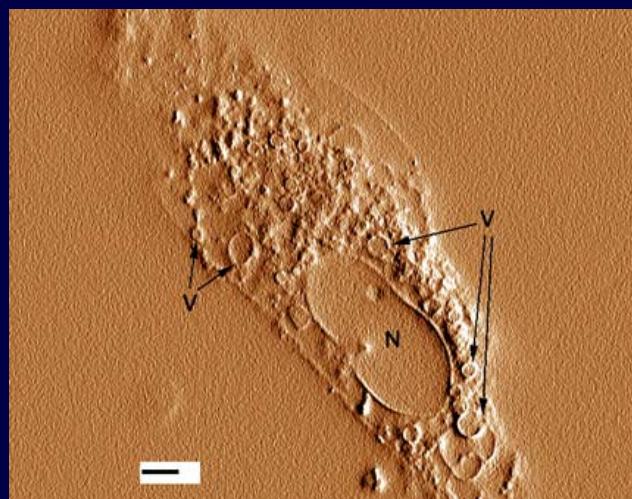
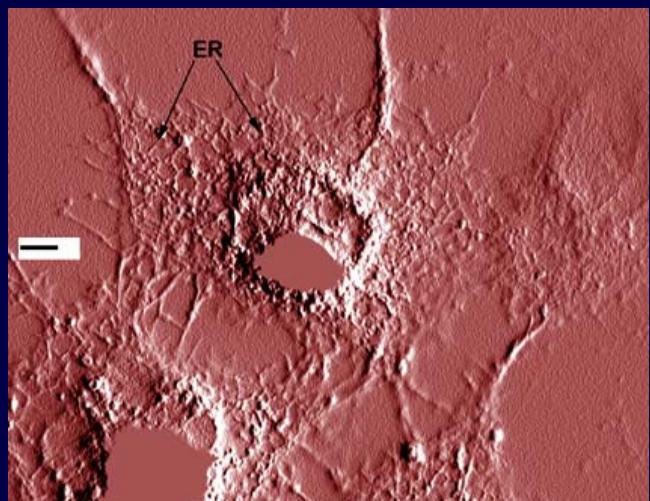
Kontrolle



Technik: Low Light Imaging und Bildanalyse

Färbung von geschädigten intrazellulären Membransystemen von Fibroblasten mit DiOC_6

Kontrolle



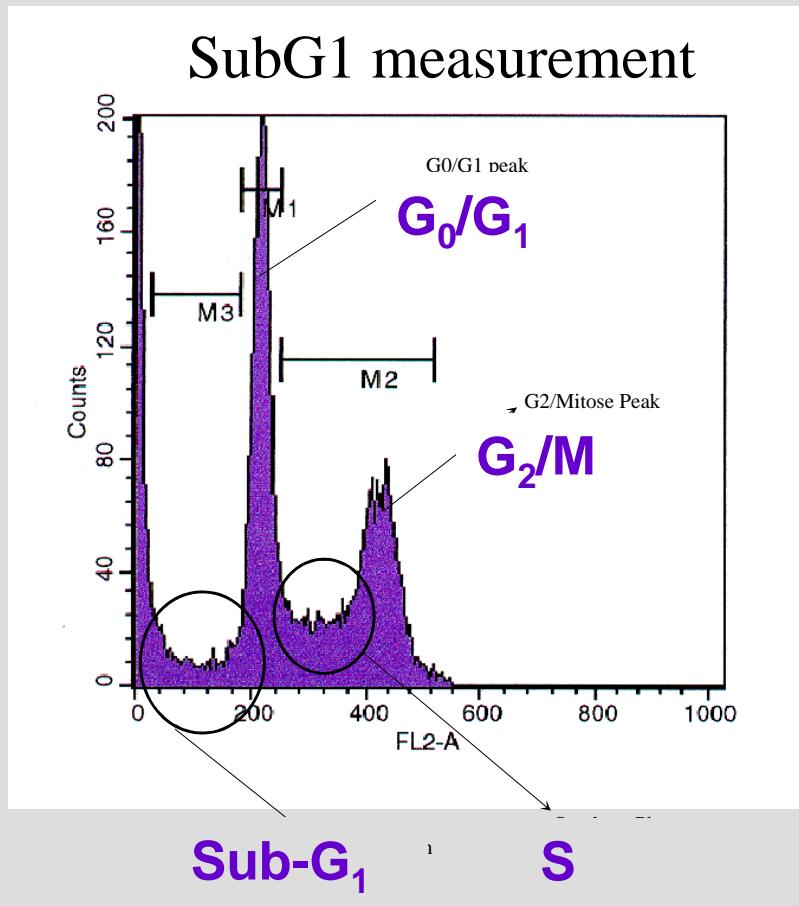
Zellzyklus – Messungen im FACS

Im Histogramm (Zellzahl/ events gegen DNA-Menge) nach FACS-Analyse mindestens zwei peaks:

G_1/G_0 -peak (diploide Zellen)

G_2 -peak (postreplikativer Status).

Dazwischen Zellen mit intermediärem DNA-Gehalt, welche gerade die Synthesephase des Zellzyklus durchlaufen (S-Phase).

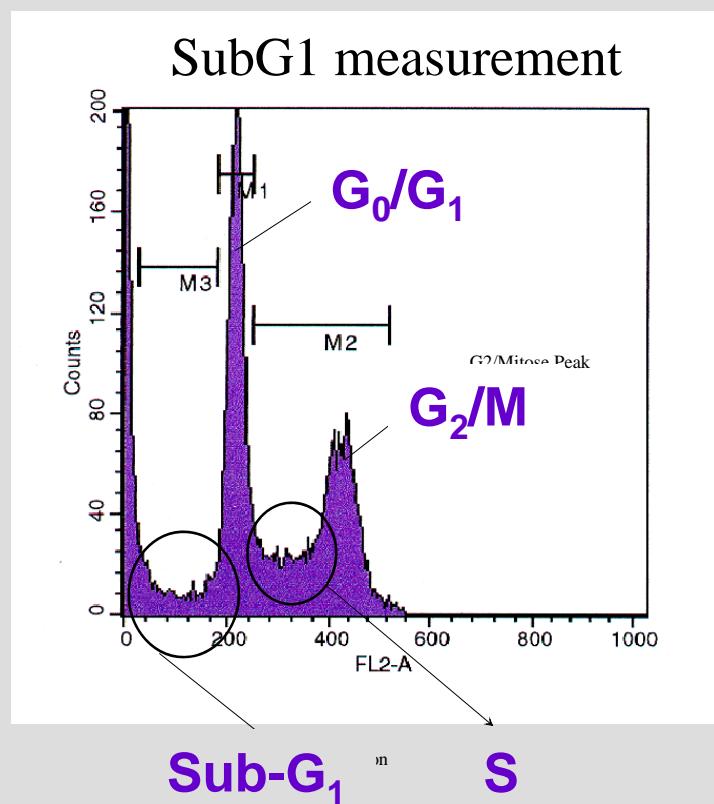


Sub-G₁-Peak zeigt Kernfragmentierung

Apoptotische Zellen: Kondensation des Chromatins, Fragmentierung der DNA und der Kerne → reduzierter DNA-Gehalt;

Anzahl von events in sub-G₁- Bereich des DNA-Histogramms bei einer Zelllinie:
Quantifizierung von Apoptose.

Zellzyklus-Analyse: Zellen mit Ethanol fixieren,
DNA mit PI färben und RNA (welche von PI
auch gefärbt werden könnte) mittels DNase
freier RNase entfernen.



Zellzyklus und Apoptose

