

# Inhalt Theorie

## Zellkultur

## 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

# Zellkultur-Zellkultivierung

## Primärkulturen und Sekundärkulturen

Herstellung von Primärkulturen aus  
Hautfibroblasten:

Hautstück wird gewaschen und in ca. 1mm  
kleine Teile zerschnitten

Teile in Petrischale mit Nährmedium

Deckglas darüber

1 Woche wachsen lassen

Medium wechseln und Blutreste wegwaschen

Sekundärkulturen werden weiter passagiert:  
subkultiviert oder eingefroren; Teilungen  
erfolgen 50 – 100 mal, was der Lebensdauer  
des Individuums entsprechen soll

## Zählen

Casy-Zählgerät oder Hämocytometer-Kammer:  
9 große Felder auf jeder Seite einer Einkerbung,  
mit weiterer Unterteilung in 16 kleine Felder;  
von den 9 großen Feldern werden 5 (oder 10  
beidseitig) ausgezählt und gemittelt;  
jedes ist 1 x 1 mm groß und 0.1 mm tief;  
d.h. Volumen =  $0.1 \text{ mm}^3$ ;  
die mittlere Anzahl der Zellen in einem großen  
Feld  $\times 10^4$  ergibt die Anzahl der Zellen in einem  
 $\text{cm}^3 = 1 \text{ ml}$ .

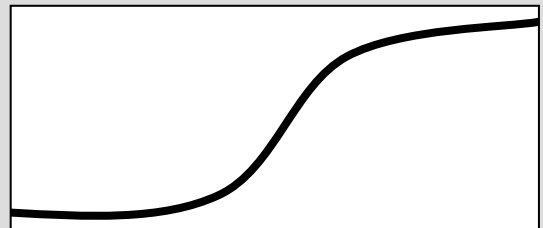
## Kulturwachstums-Charakteristik

Anlauf (lag) -phase

log-Phase

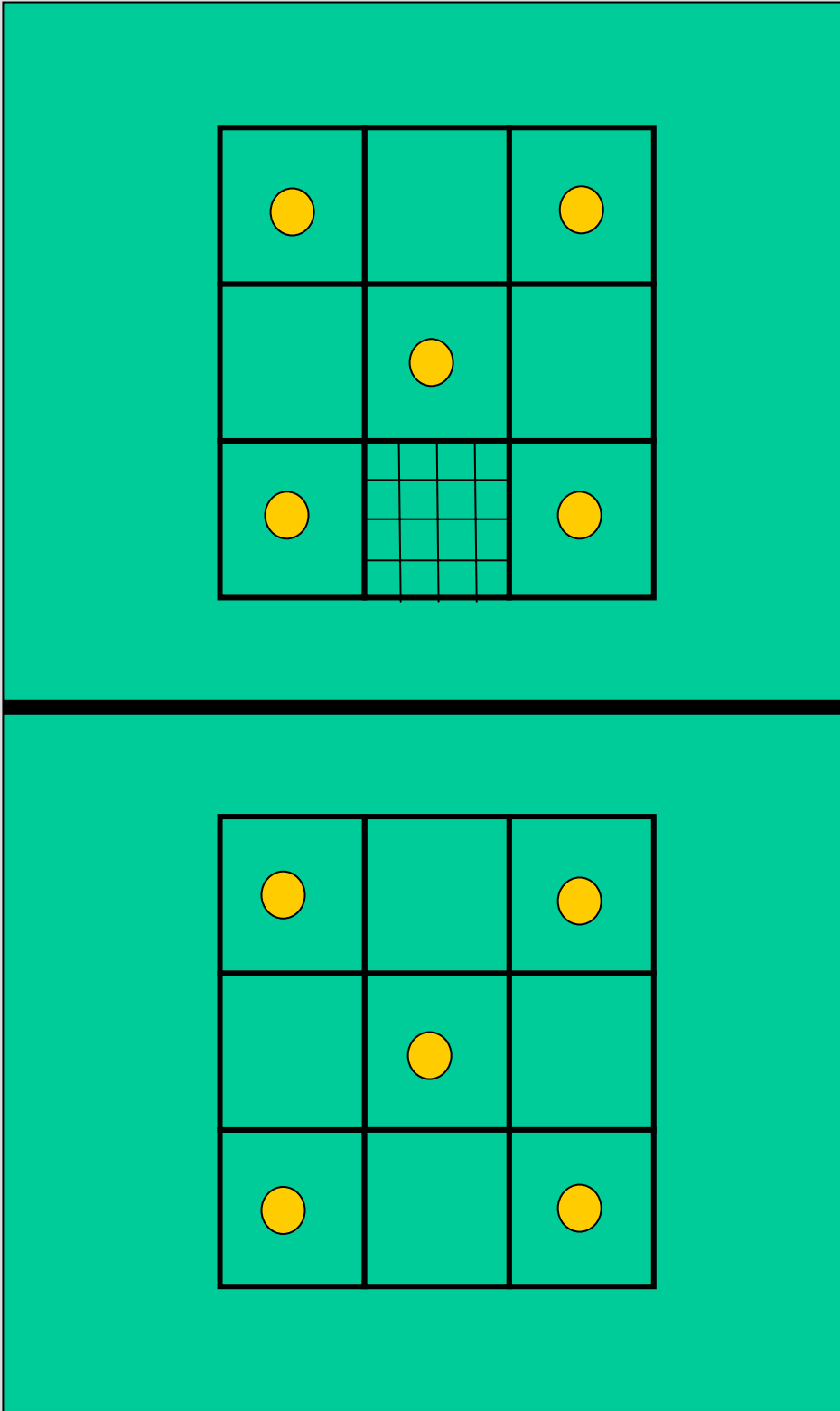
Plateau (Konfluenz);

transformierte Zellen halten sich nicht an  
Wachstumsschranken, sondern bilden Foci.



B. Krammer: UE in-vitro Technik und Zellkultur SS 06

● wird gezählt



# Techniken in der Zellbiologie

## *Fluoreszenzmessungen*

Flow Cytometer: Analyse und Sortieren

Mikrotiterplattenfluorimeter

(Konfokales Laser-) Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzspektrophotometer

## *Absorptionsmessungen*

ELISA-Reader

Absorptionsspektrophotometer

## *Mikroskopie*

Phasenkontrastmikroskop

(Raster-)Elektronenmikroskop

Fluoreszenzmikroskop w.o.

## *andere*

Elektrophysiologische Messungen

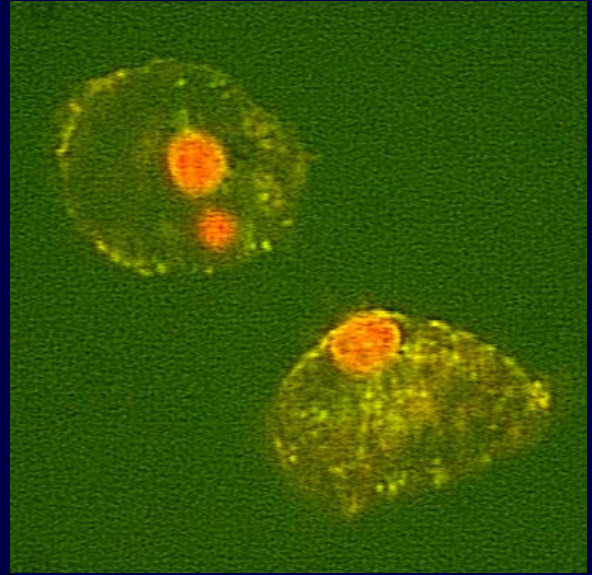
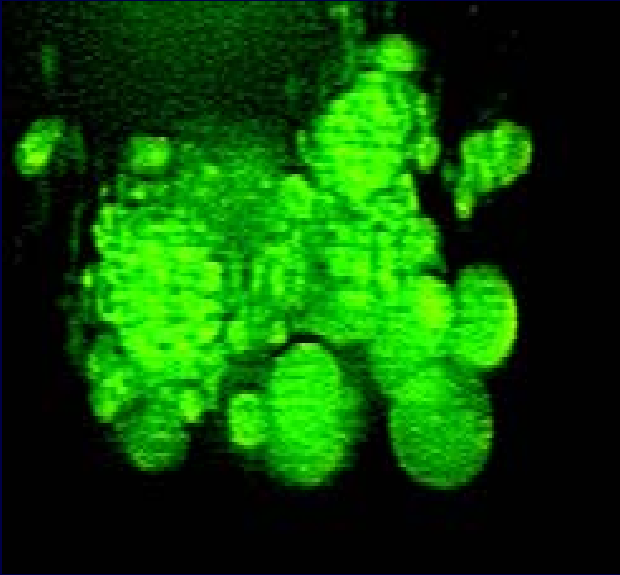
## Cytotoxische Assays

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

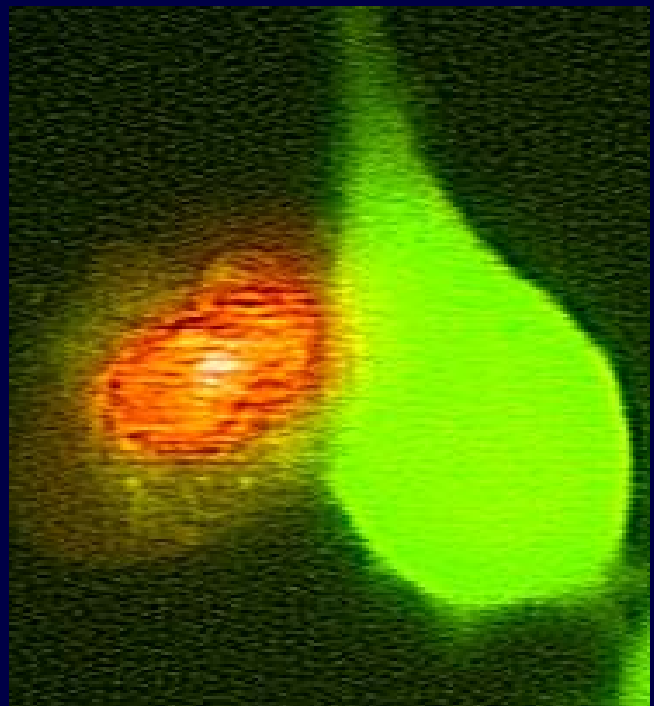
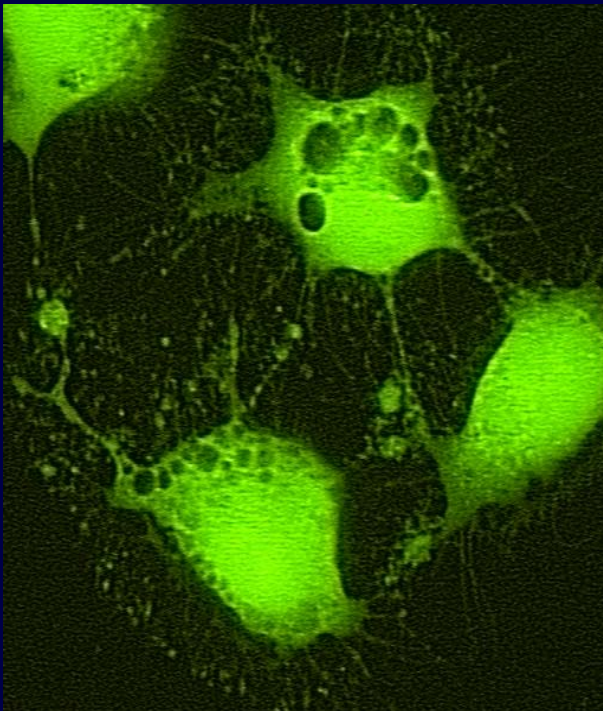
TB: Trypan Blue Letalfärbung, zeigt fehlende Membranintegrität an;

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

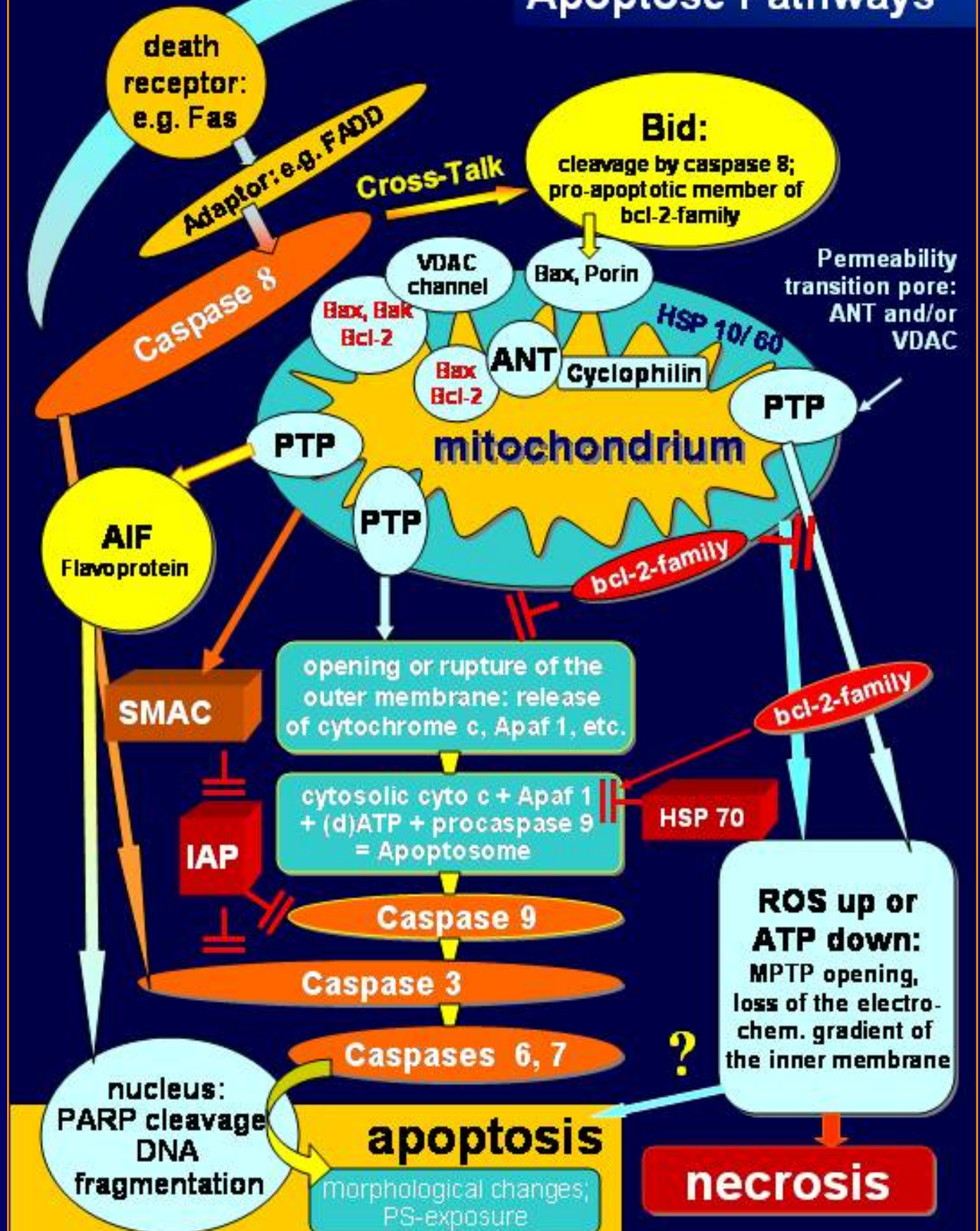


**Staining of fibroblasts with  
Annexin V + PI or  
calcein + ethidium homodimer**





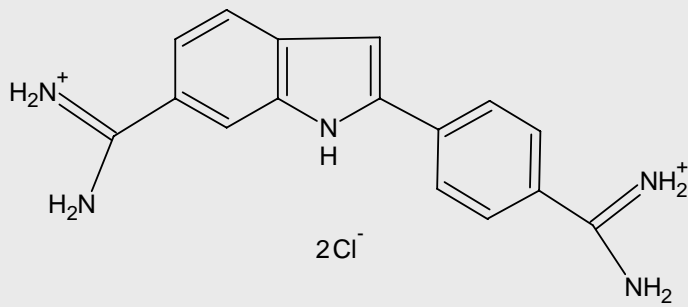
# Apoptose Pathways



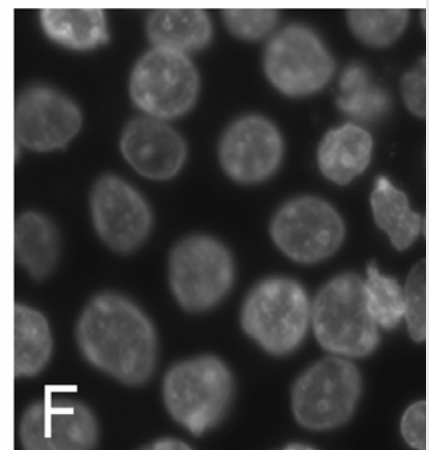
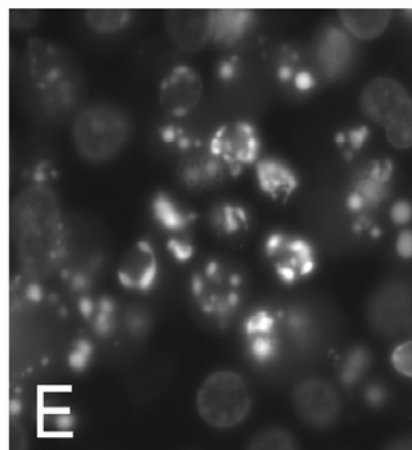
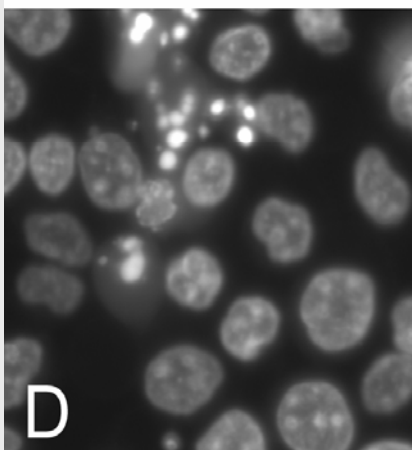
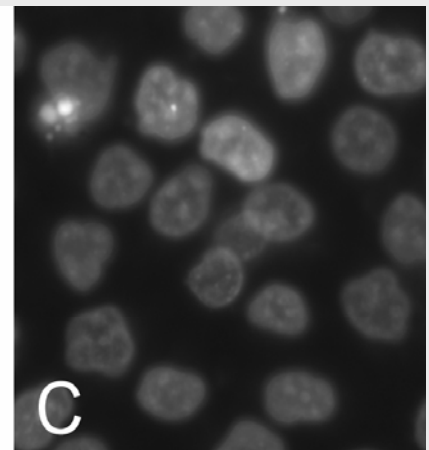
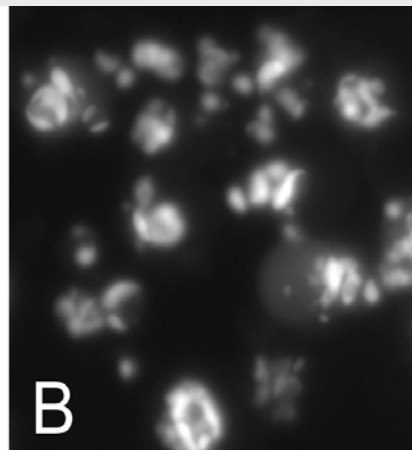
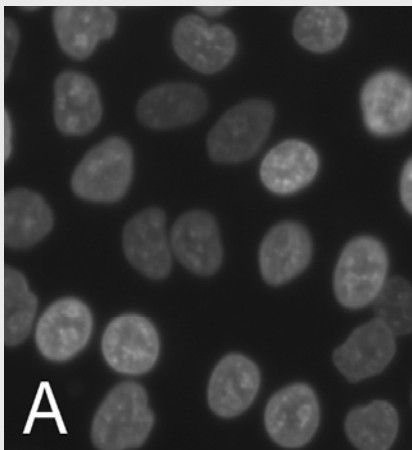
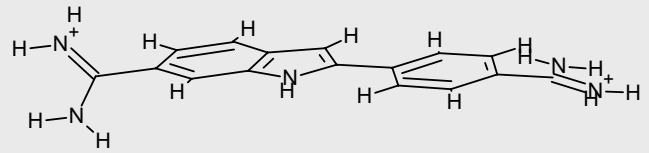


# Kernfärbung: DAPI (Hoechst)

Struktur für DAPI



3D-optimiert



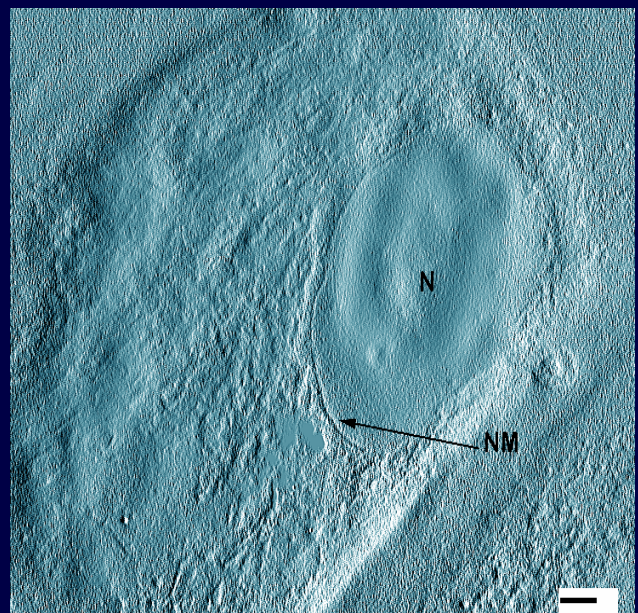
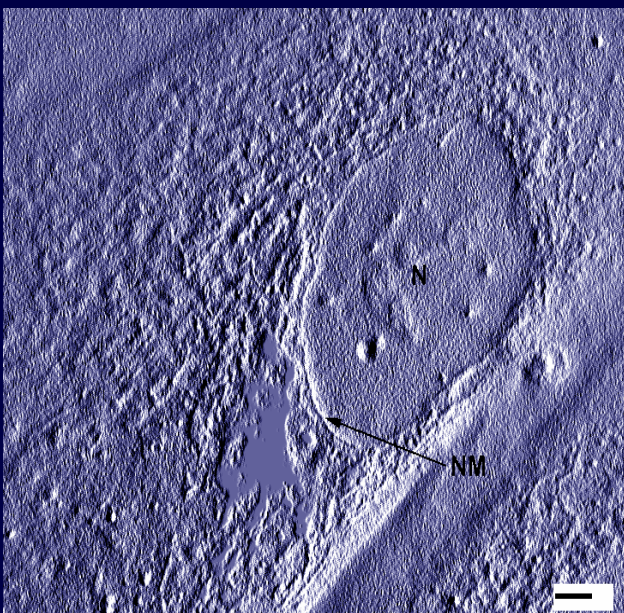
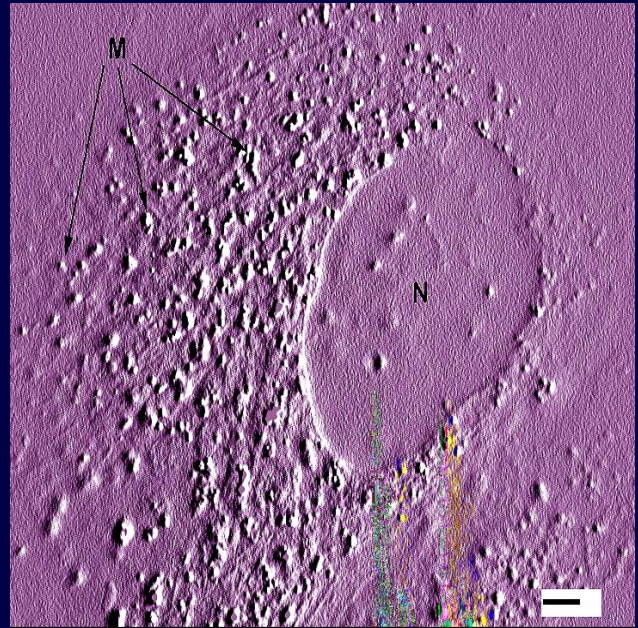
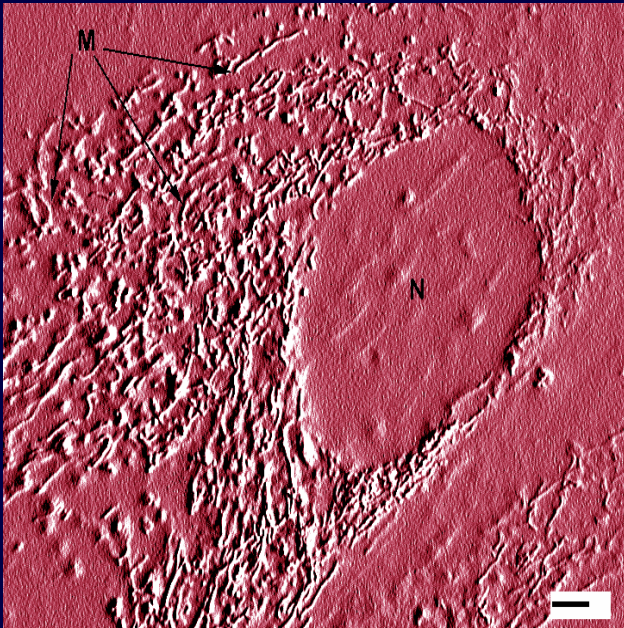
A: Kontrolle; B: UV; C-F: photodyn. Behandlung



# Fluoreszenz-Mikroskopie

## Färbung von geschädigten Mitochondrien mit Rhodamin

### Kontrolle

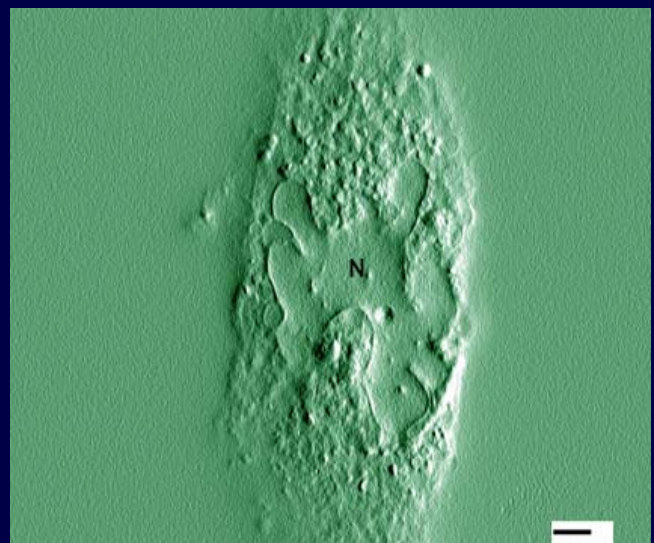
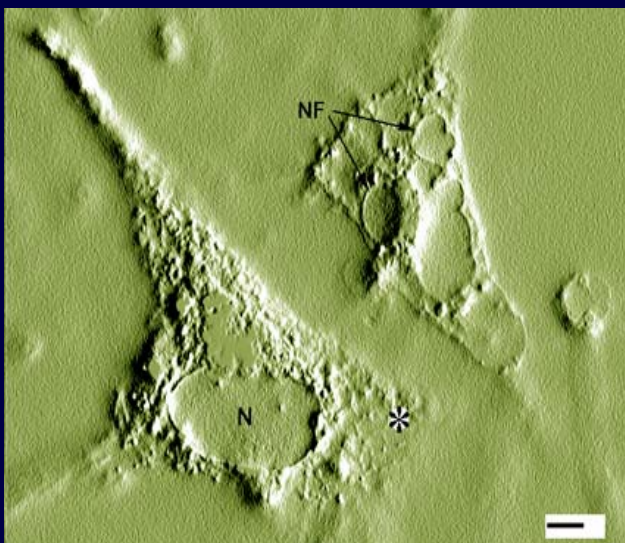
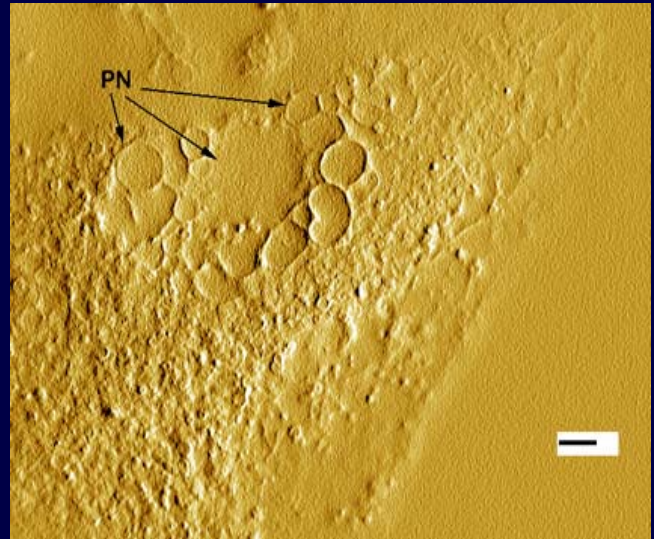
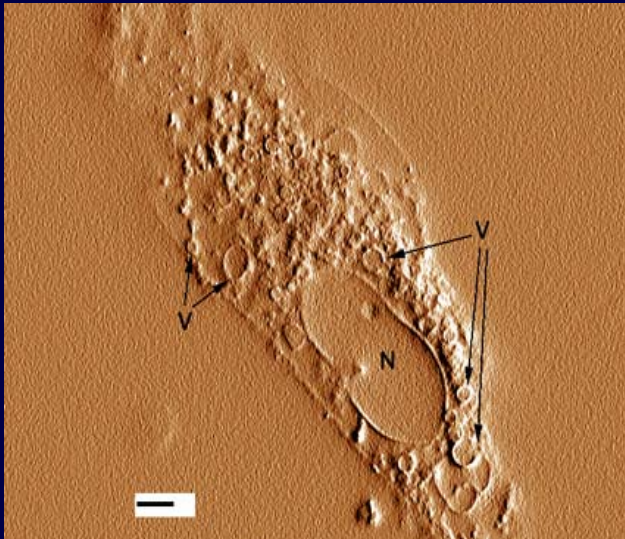
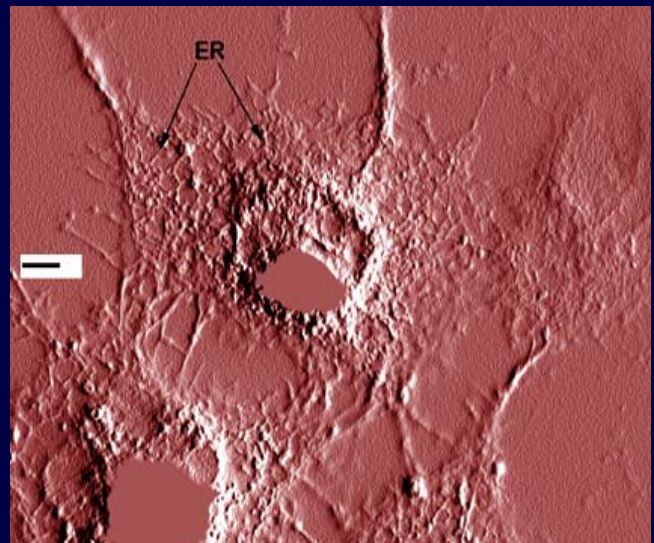


Technik: Low Light Imaging und Bildanalyse



# Kontrolle

Färbung von geschädigten intrazellulären Membransystemen von Fibroblasten mit DiOC<sub>6</sub>



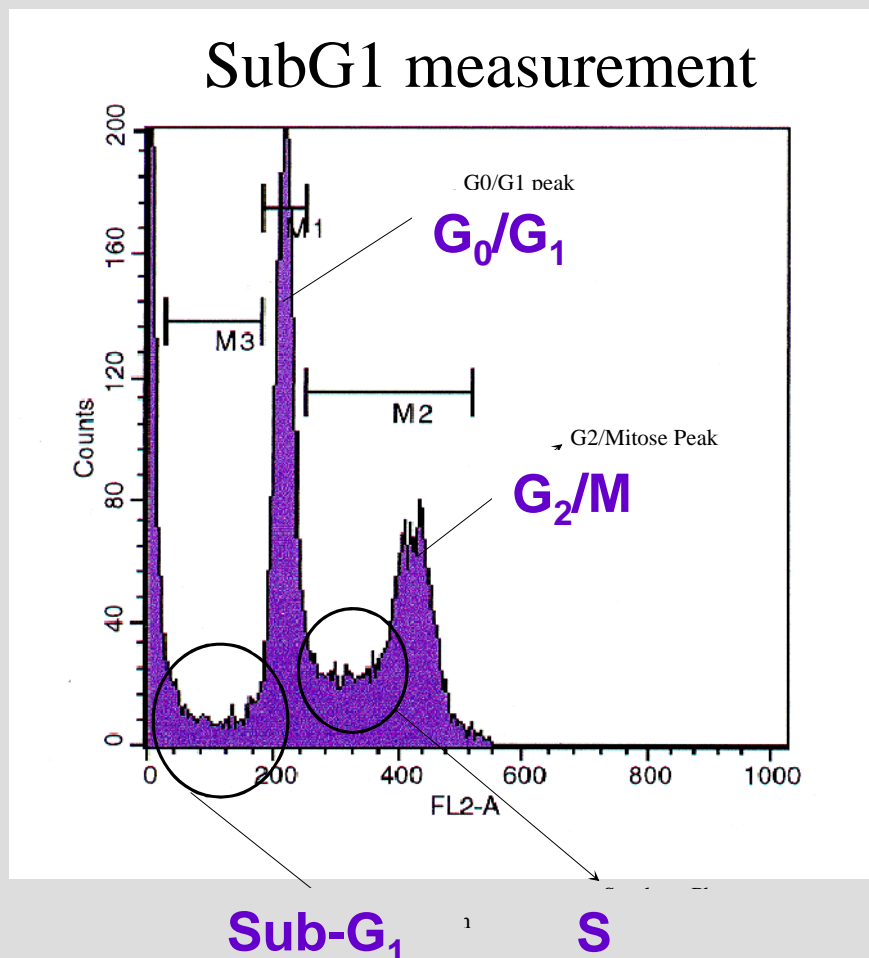
# Zellzyklus – Messungen im FACS

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-G<sub>1</sub>-Peak zeigt Kernfragmentierung

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

Anzahl von events in sub-G<sub>1</sub>- 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.

