

Inhalt Theorie

Zellkultur

Cytotoxische Assays: MTT

Apoptose-Detektion:

JC-1

Caspase

Kern-, DNA-Fragmentierung:

Kernfärbung mit DAPI, Hoechst

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

Fluoreszenzmikroskopie

Zellzyklus

GSH Bestimmung

Fluoreszenzspektrophotometrie

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 Hämozytometer-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 mm^3 ;
die mittlere Anzahl der Zellen in einem großen
Feld x 10^4 ergibt die Anzahl der Zellen in einem
 $\text{cm}^3 = 1 \text{ ml}$.

Kulturwachstums-Charakteristik

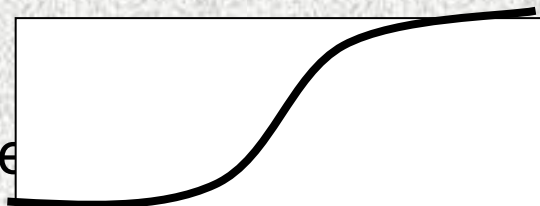
Anlauf (lag) -phase


log-Phase

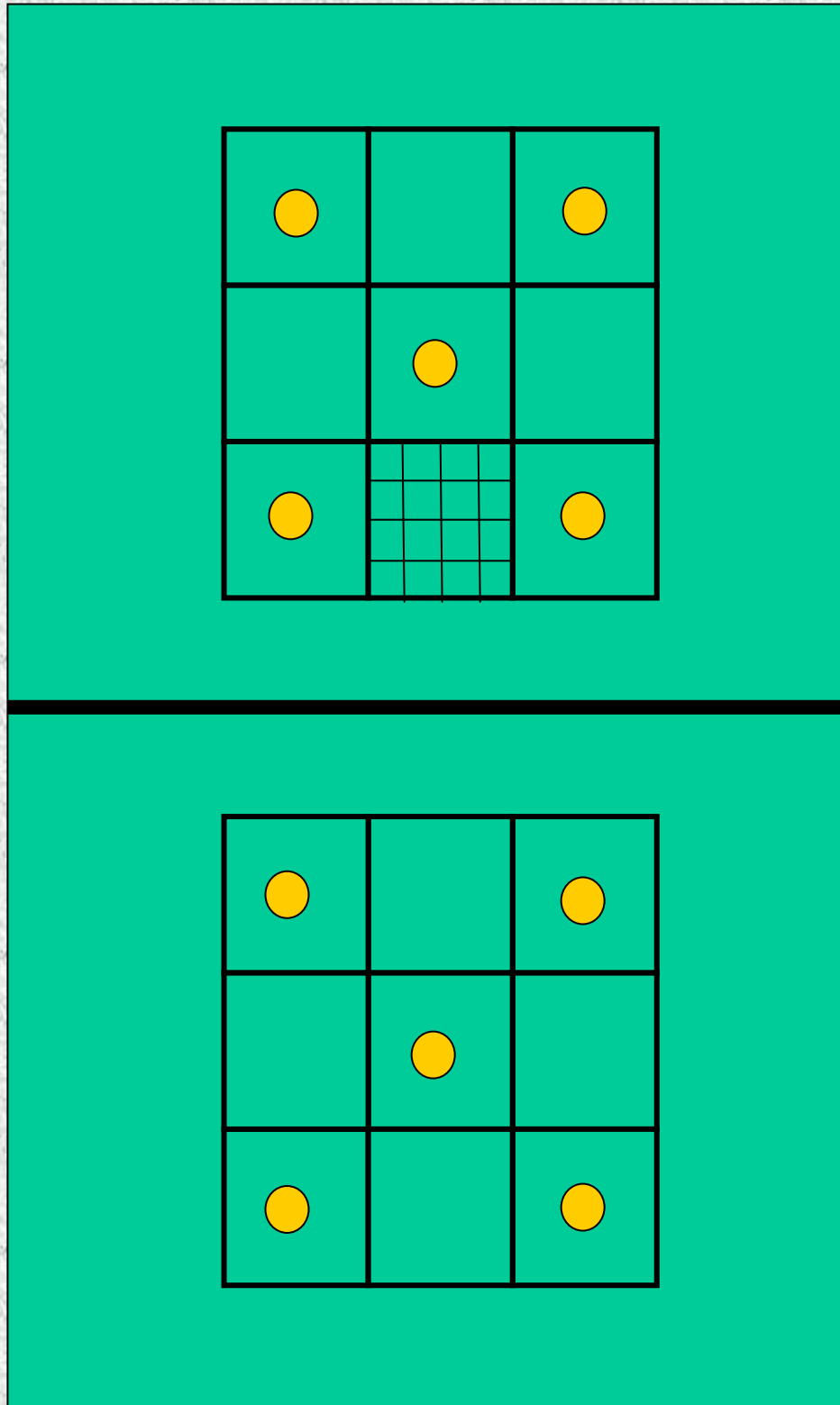
Plateau (Konfluenz);

transformierte Zellen halten

Wachstumsschranken, sondern bilden Foci.



 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

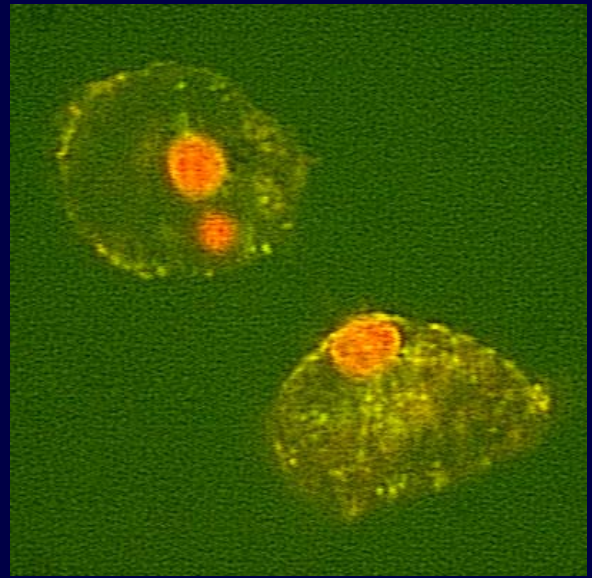
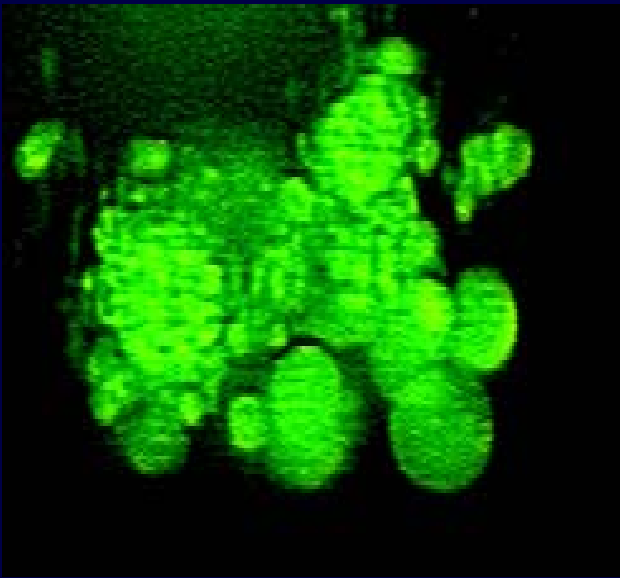
Cytotoxische Assays

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

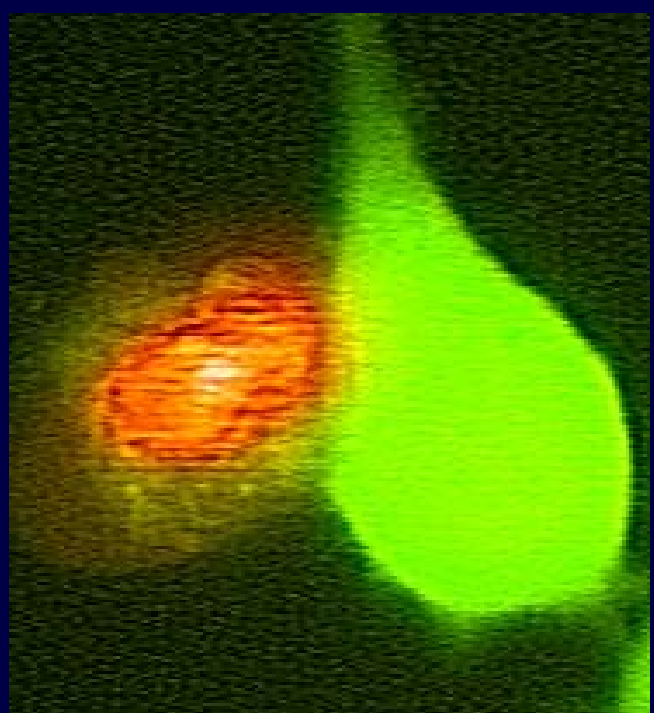
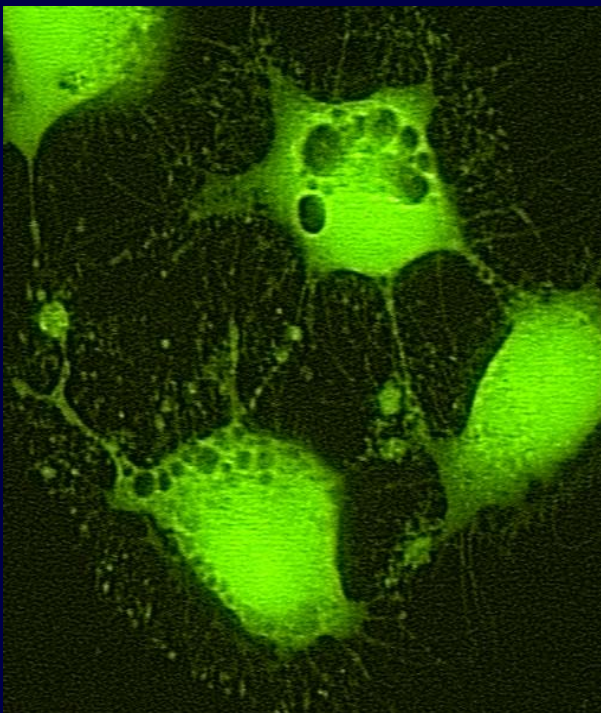
TB: Trypan Blue Letalfärbung, zeigt fehlende Membranintegrität an;

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

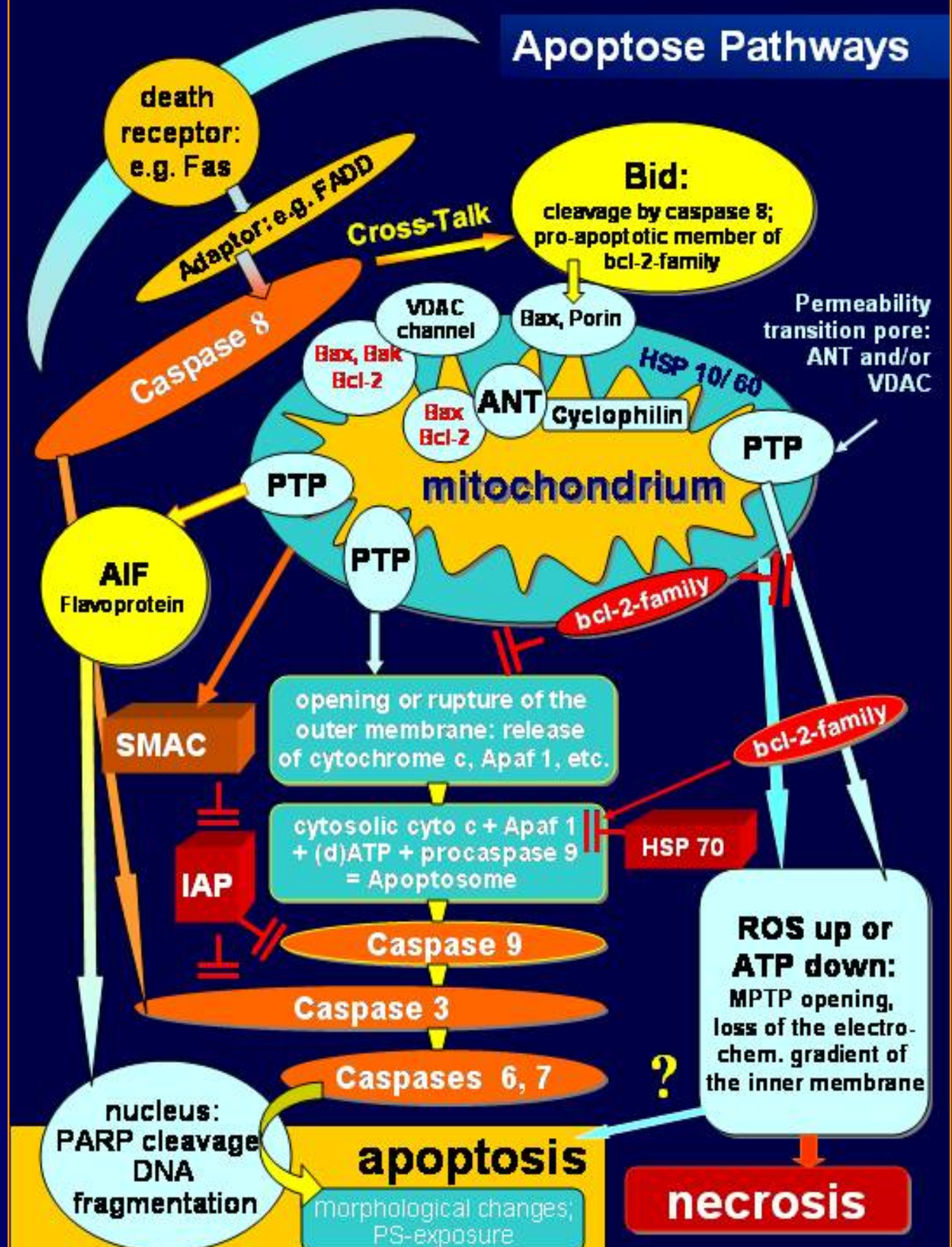
Live/Dead (Calcein AM und Ethidium Homodimer) zum Nachweis von lebenden (Calcein \Rightarrow Esterasen) und toten (Ethidium Homodimer wie PI) Zellen, fluoresziert



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



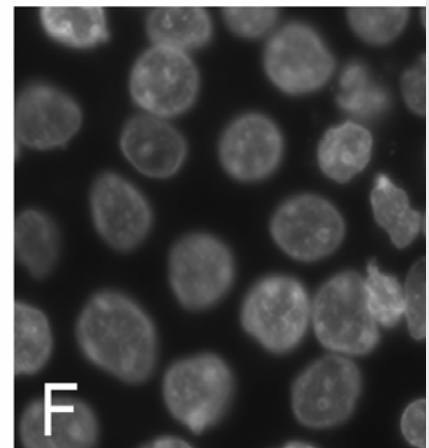
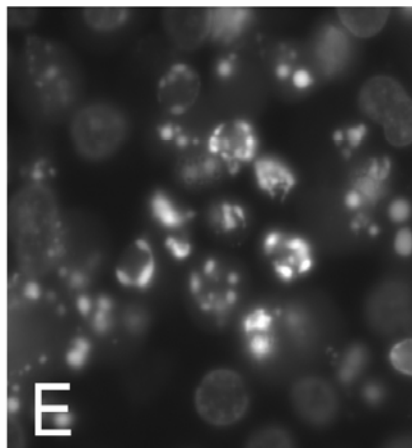
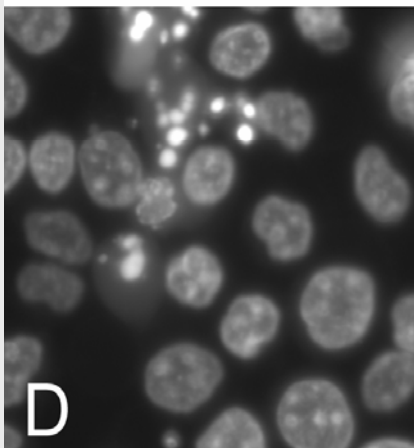
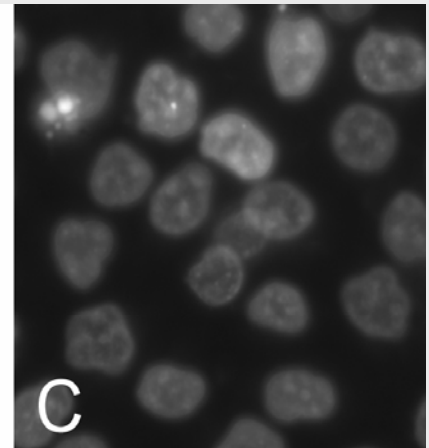
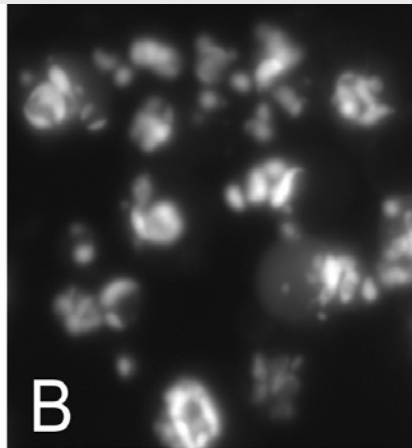
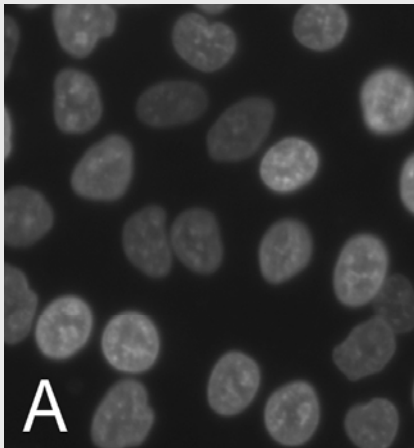
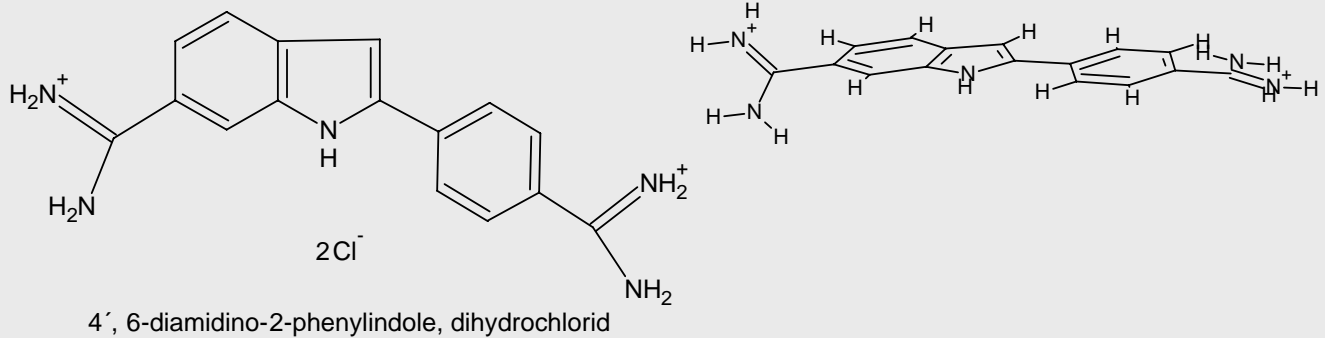
Apoptose Pathways



Kernfärbung: DAPI (Hoechst)

Struktur für DAPI

3D-optimiert

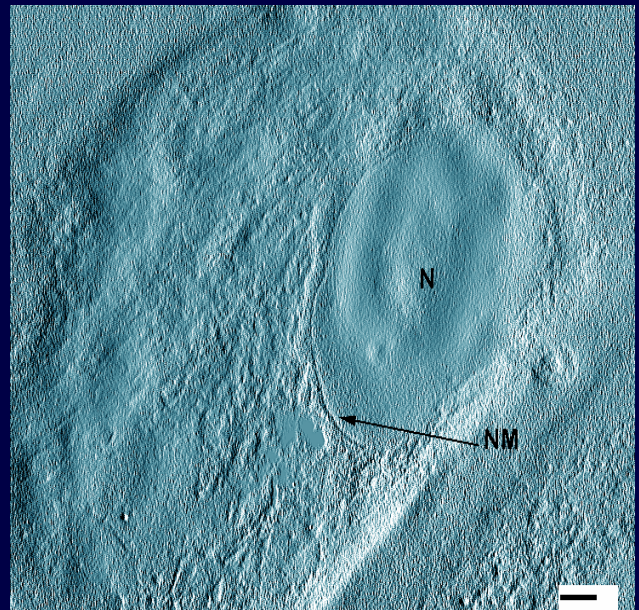
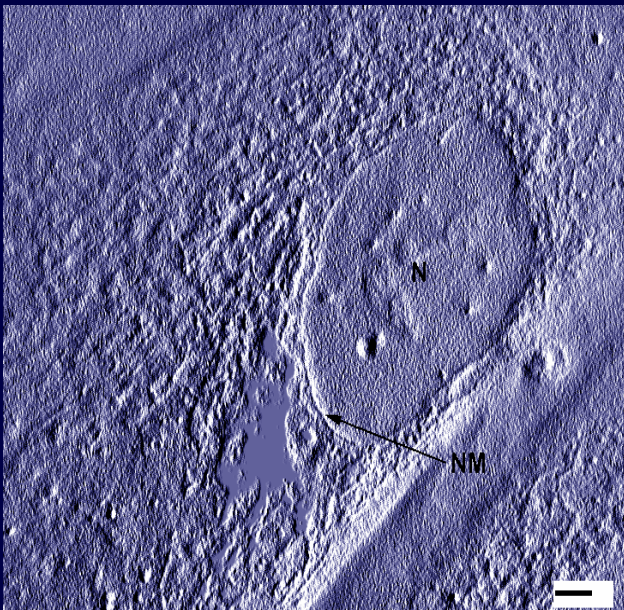
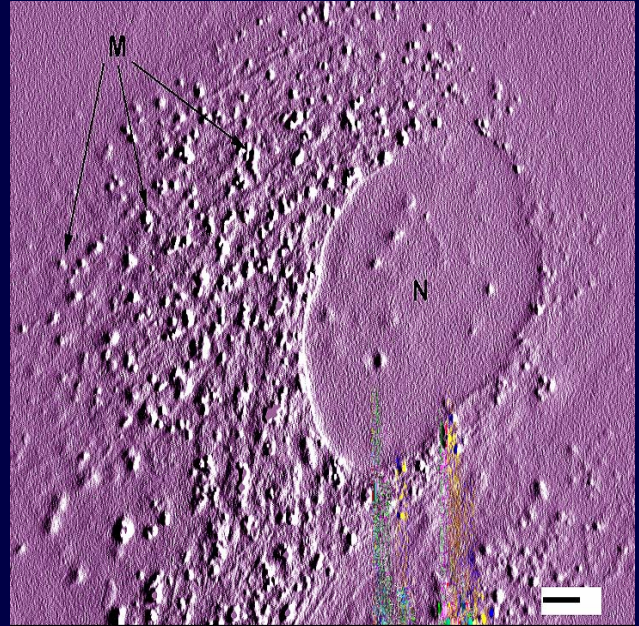
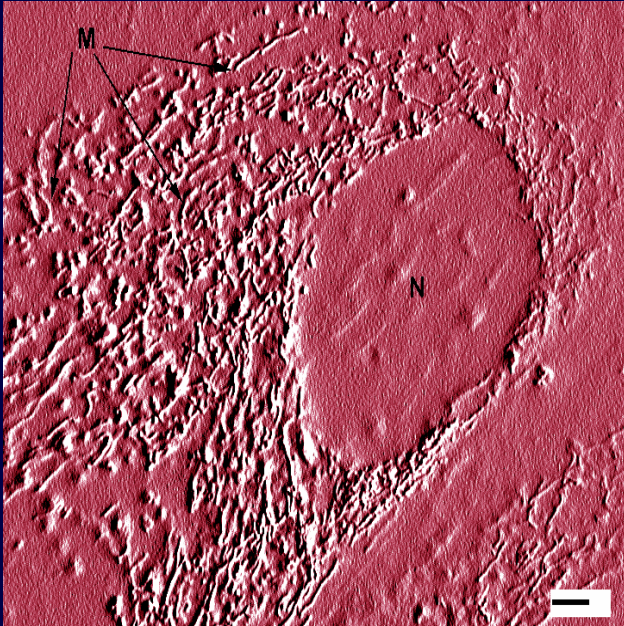


A: Kontrolle; B: UV; C-F: photodyn. Behandlung

Fluoreszenz-Mikroskopie

Färbung von geschädigten Mitochondrien mit Rhodamin

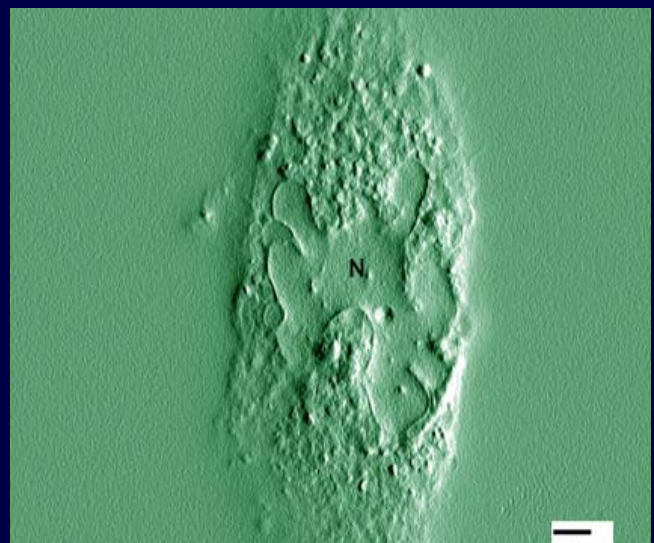
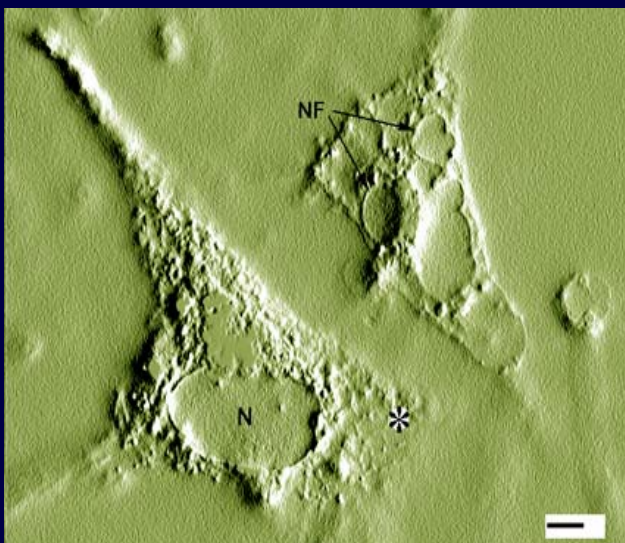
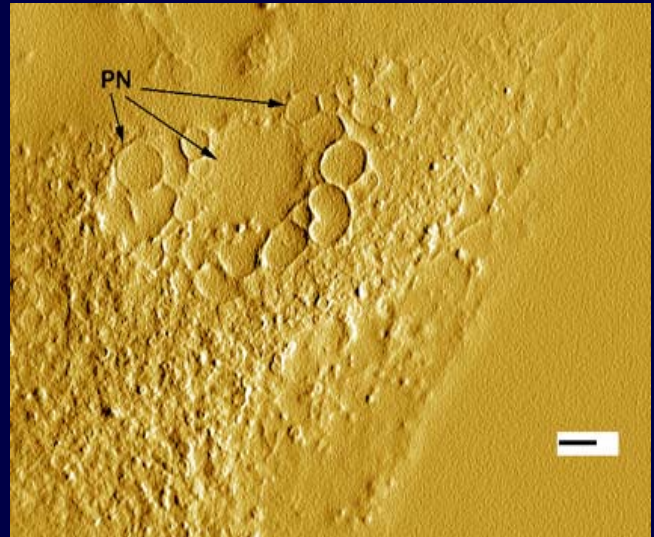
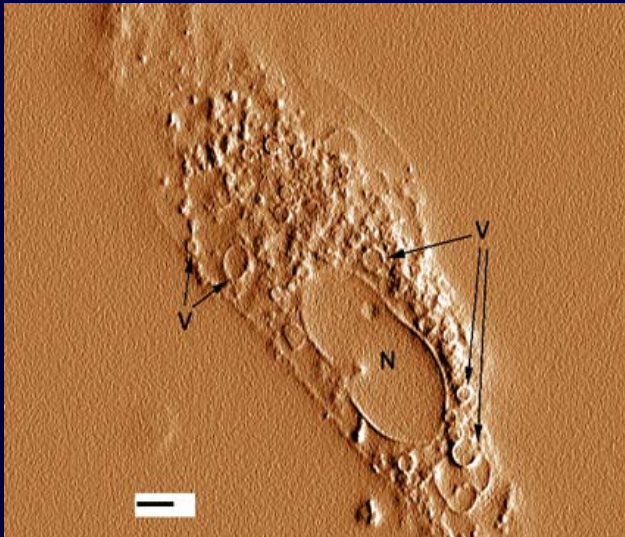
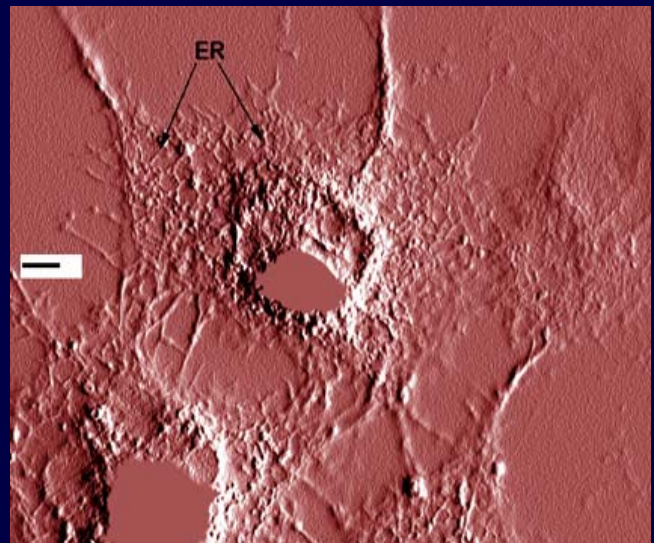
Kontrolle



Technik: Low Light Imaging und Bildanalyse

Färbung von geschädigten intrazellulären Membransystemen von Fibroblasten mit DiOC₆

Kontrolle



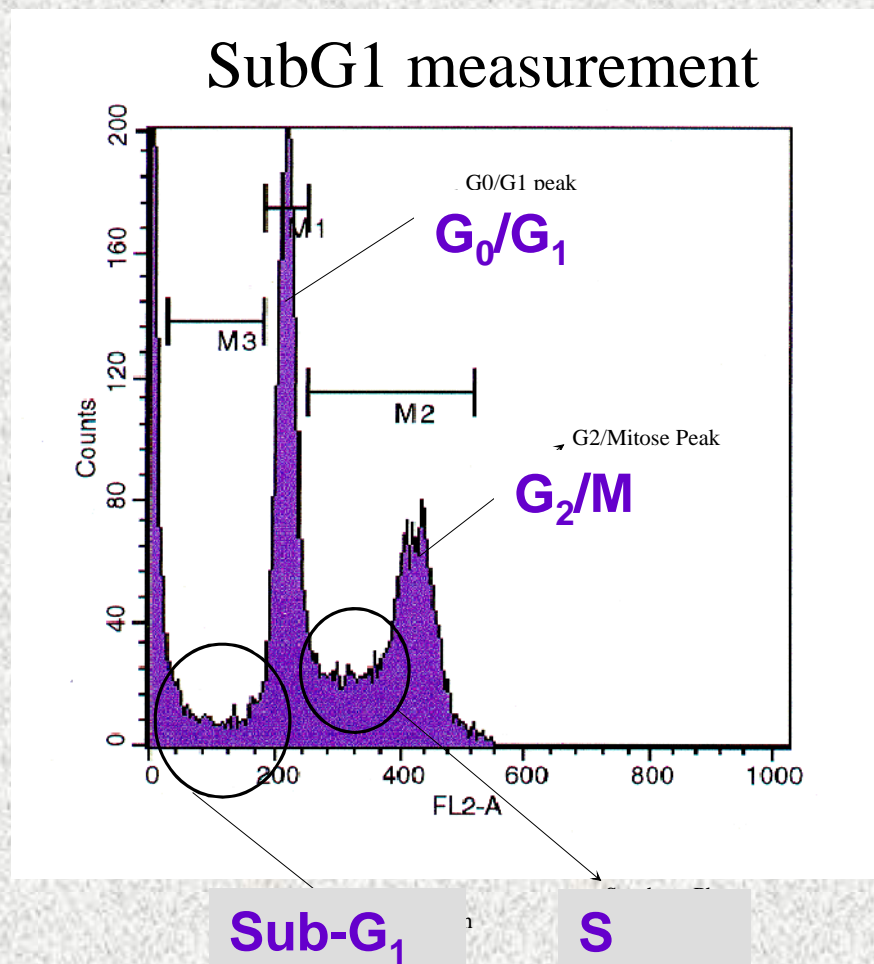
Zellzyklus – Messungen im FACS

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.

