

**Institut für Technische Chemie
Leibniz Universität Hannover
Arbeitsgruppe
„Zell- und Gewebekultur“**

PD Dr. Cornelia Kasper



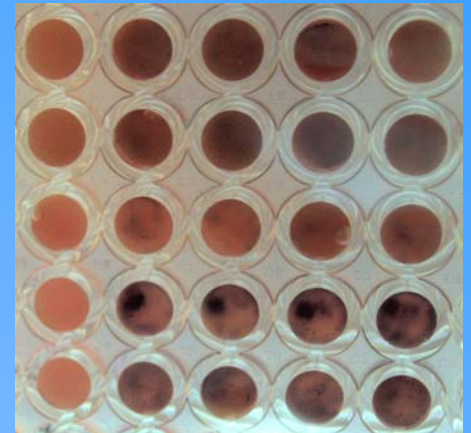
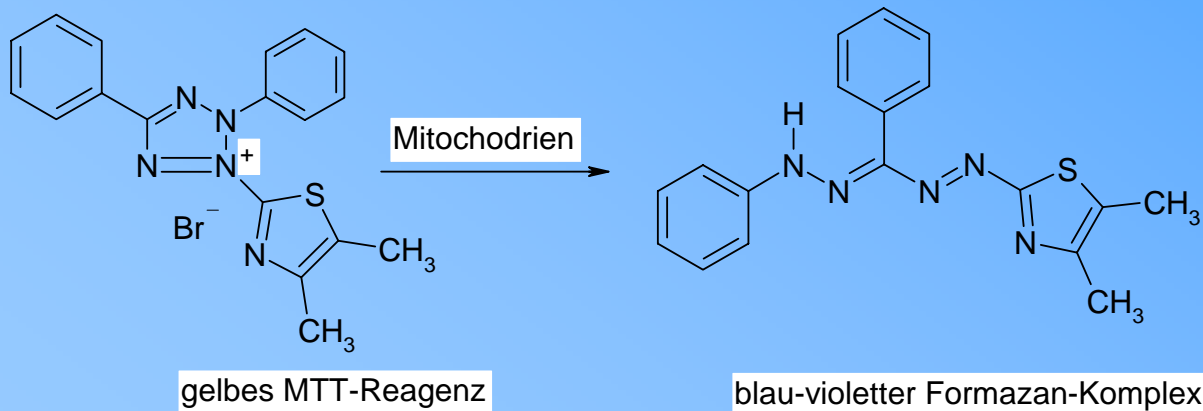
Einführung- in vitro Testung

- Allgemeine Methoden
- Schnelle Untersuchung des Zellverhaltens, für alle Zellsysteme geeignet
 - Viabilität (MTT-Test, Glucose-/Laktat-Gehalt)
 - Proliferation (BrdU-Assay, DNA-Gehalt)
- Untersuchung des Zellkulturüberstandes
 - Proteinbestimmung (Bradford, Lowry)
- Spezifische Methoden
- Aufwendigere Methoden zur Untersuchung spezifischer Marker des gewählten Zellsystems
 - Marker (Elisa, z.B Alkalische Phosphatase, Kollagen)

(1) Viabilität

MTT-Test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium-bromide)

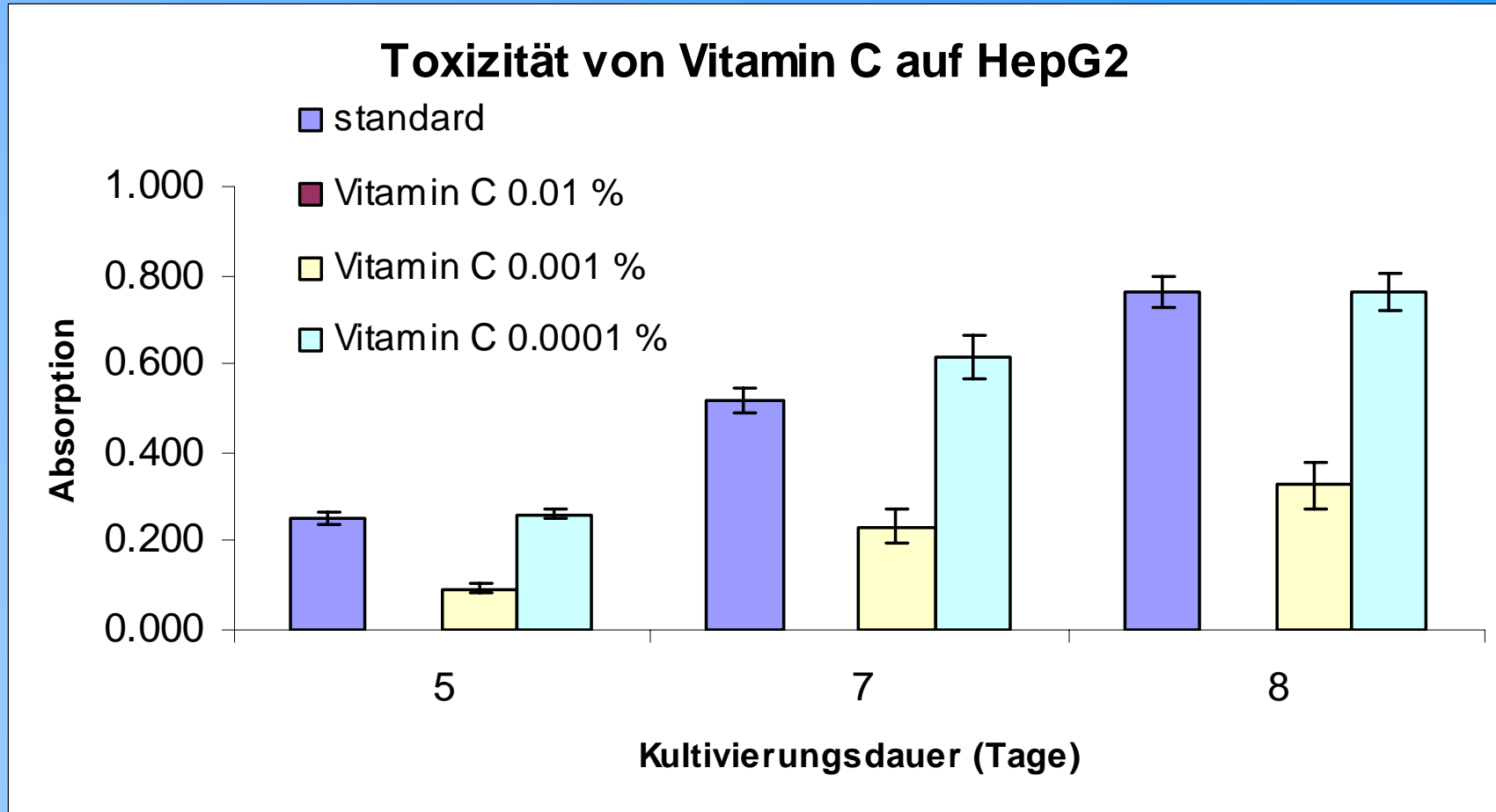
- Inkubation der Zellen mit MTT-Lösung für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂: Umsetzung des MTT Reagenzes der vitalen Zellen zum blau-violetten Formazan-Komplex
- Auflösung des Formazan-Komplexes mit SDS-Lösung über Nacht
- Detektion der Absorption bei 570/630 nm



- Bestimmung der Toxizität von Substanzen auf Zellen
- Indirekte Methode zur Bestimmung des Zellwachstums

(1) Viabilität

MTT-Test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium-bromide)



(1) Viabilität

Glucose/Laktat-Gehalt

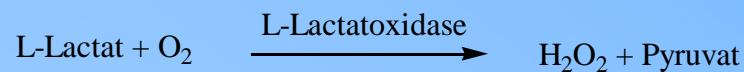
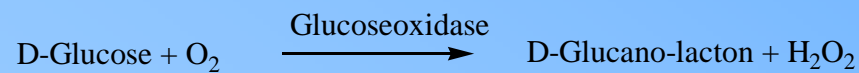
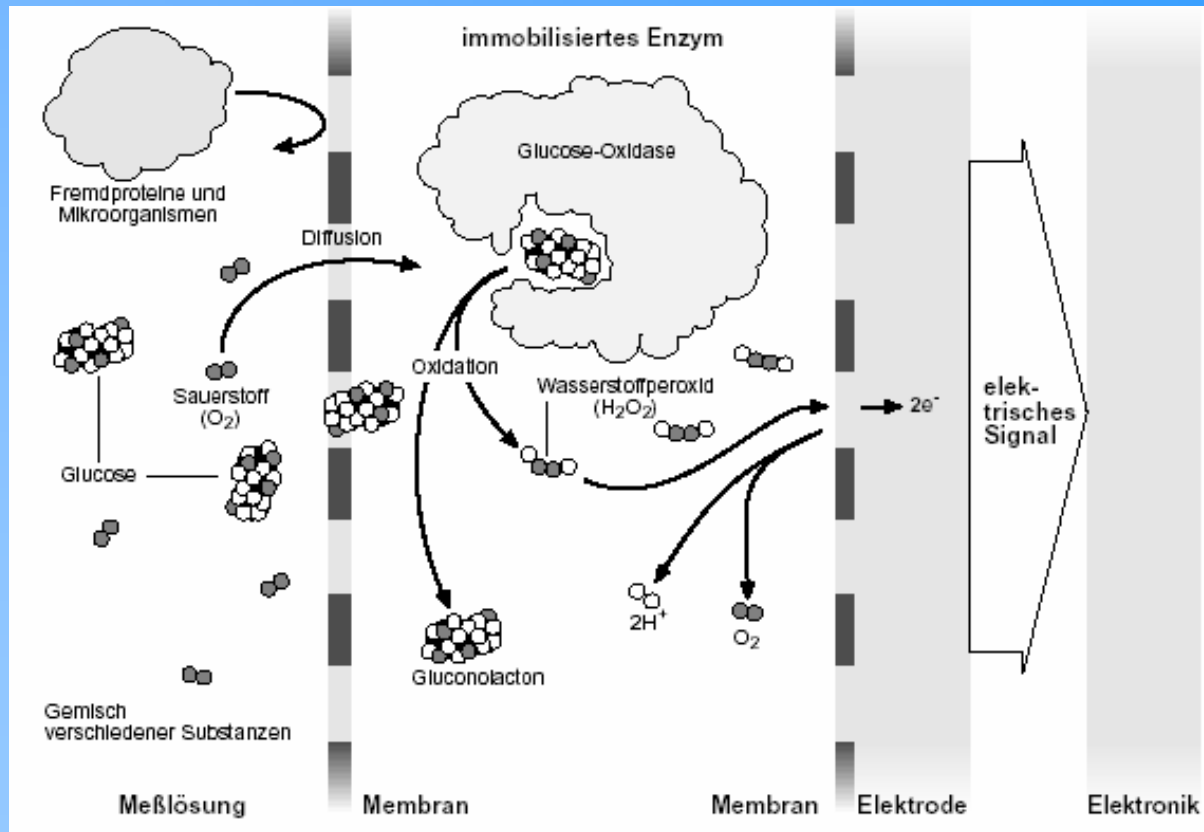
- Messung der Stoffwechselaktivität von Zellen
- Untersuchung des zellfreien Zellkulturmediums auf Glucose und Laktat

- Messprinzip:

Die Messung erfolgt über Enzymelektroden. Die Elektrode besteht aus Glucoseoxidase bzw. L-Lactatoxidase, die als immobilisierte Enzyme zwischen einer Membran aus Polycarbonat und einer zweiten Membran, bestehend aus Celluloseacetat, vorliegen. Die Membranen sind für Glucose bzw. Lactat und Sauerstoff durchlässig, weshalb in Abhängigkeit von der Glucose-/Lactatkonzentration Wasserstoffperoxid gebildet wird. Wasserstoffperoxid diffundiert durch die Cellulosemembran und oxidiert an einer Elektrode (Platinanode). Durch die Abgabe von zwei Elektronen pro Molekül Wasserstoffperoxid wird ein elektrisches Signal gesetzt, das über eine entsprechende Elektronik im YSI gemessen werden kann.

(1) Viabilität

Glucose/Laktat-Gehalt



(3) Proliferation

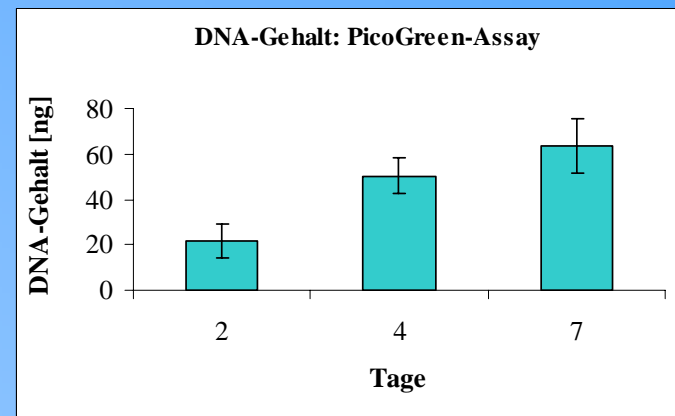
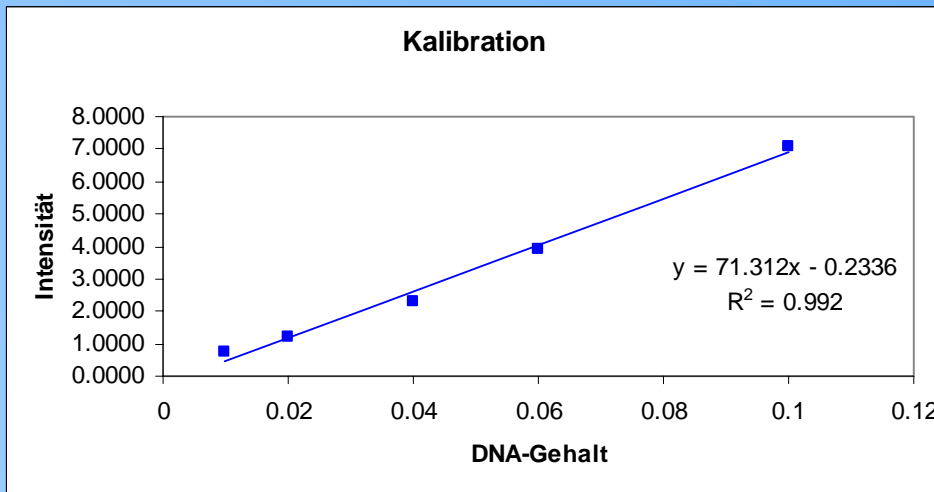
DNA-Gehalt

- direkte Untersuchung der Proliferation über indirekte Methoden der Viabilitätsbestimmungen hinaus (aufwendiger, kostenintensiver)
 - Bestimmung des DNA-Gehalts
 - BrdU-Assay

(3) Proliferation

DNA-Gehalt

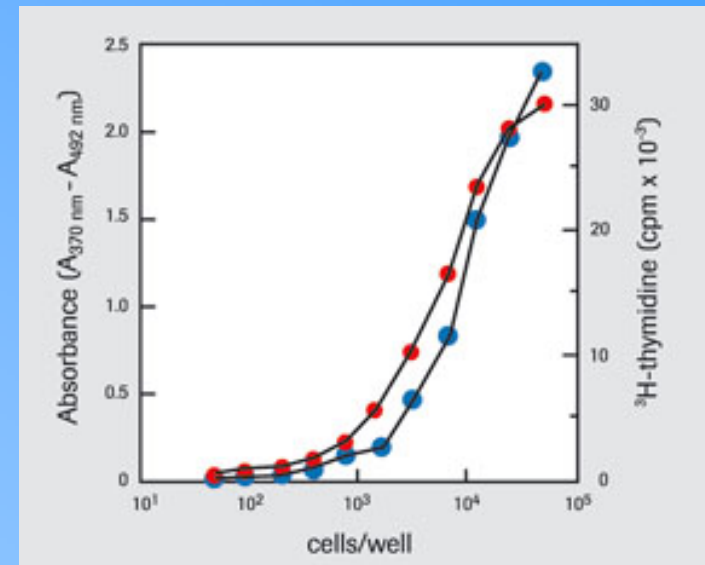
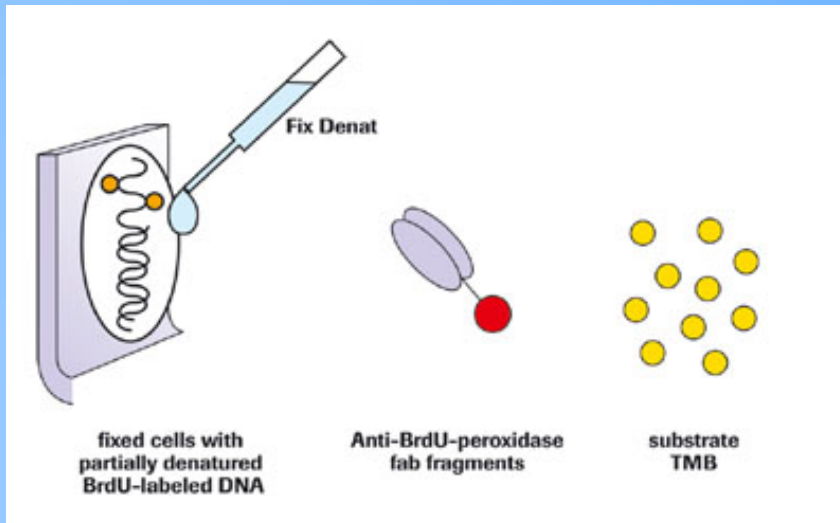
- Zellaufschluss
- Überstand in TE-Puffer (pH 7,4) verdünnen
- Zugabe von 100 µl einer Lösung aus 0,5 µl PicoGreen in 99,5 µl TE-Puffer
- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten 96-Lochplatte
- Messung der Fluoreszenzintensität
- Kalibrationsreihe mit Kalbsthymus-DNA bekannter Konzentrationen in TE-Puffer



(2) Proliferation

BrdU-Assay

- Inkubation der Zellen mit BrdU-Lösung für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂: Einbau von Brom-Desoxyuridin (BrdU) anstatt Thymidin in proliferierende Zellen
- Fixieren der Zellen, DNA-Denaturierung
- Anti-BrdU-POD Antikörper bindet an BrdU, welches in neu synthetisierte DNA eingebaut wurde
- Detektion des Immunkomplexes durch quantitative Substratreaktion



(3) Proteine

Proteinbestimmung

Bestimmung der Proteine aus Zellkulturüberständen

Allgemeines Prinzip:

- Herstellung einer Kalibrationsreihe mit einem Standardprotein (BSA) zur Bestimmung des Proteingehaltes einer unbekannt Probe
- Zugabe von Reagenzien zur Durchführung von Farbreaktion
- photometrische Messung der Lösung

Methoden:

- Proteinbestimmung mit Micro BCA
- Proteinkonzentration nach Bradford
- Proteinkonzentration nach Lowry

(3) Marker

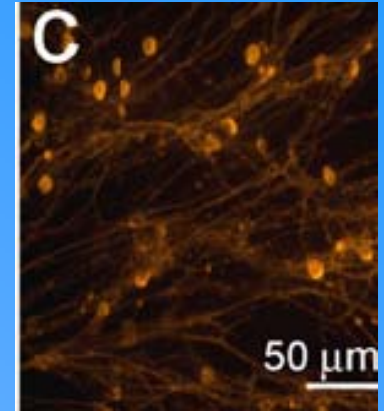
- Identifizierung, Quantifizierung oder Analyse spezifischer Markerproteine:
 - Oberflächenproteine
 - Syntheseprodukte (intrazellulär und Sekretionsprodukte)
 - Proteine entsprechend des Differenzierungsmusters

- Informationsgehalt:
 - Identifikation der Zelle und des Differenzierungsstatus (besonders wichtig bei Primär-, Stamm und Progenitorzellen)
 - Identifikation von Gewebestrukturen
 - Untersuchung des Stoffwechsels durch Quantifizierung von Stoffwechselprodukten
 - Genexpressionsanalyse auf der Stufe der Proteinsynthese

(3) Marker

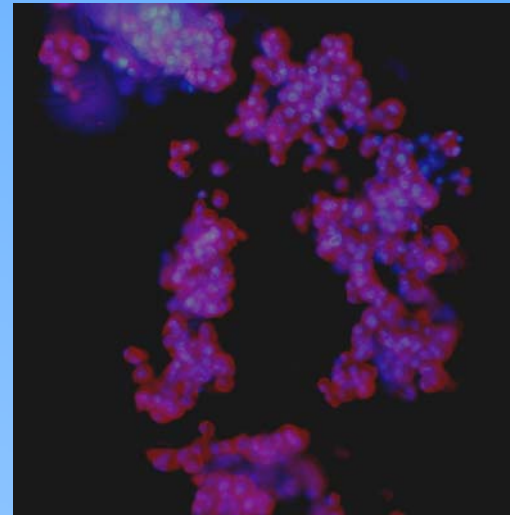
Identifikation der Zelle und des Differenzierungsstatus

→ Immunocytochemie des low affinity nerve growth factor receptor p75^{LNGFR} zur Identifikation und Charakterisierung von adulten Schwannzellen der Ratte nach Isolation aus dem Spenderorganismus und während der laufenden Versuche



Quelle: Y.Haile et al., Biomaterials, 2007

→ Immunocytochemie der Thyrosinhydroxylase zur Kontrolle des Differenzierungsstatus neuronal differenzierter PC-12 Zellen

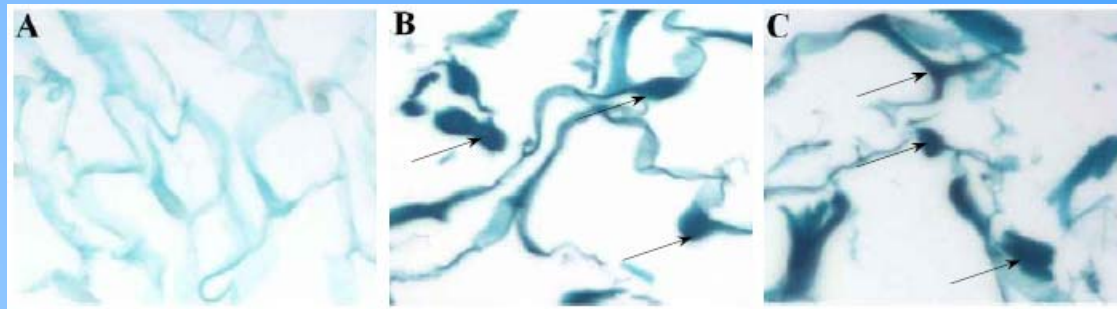


Quelle: S.Stark, J Biomed Mat Res A, under revision

(3) Marker

Identifikation von Gewebestrukturen

→ Histologische Färbung von Knorpelzellen auf Collagen-Material mit Safranin O zur Untersuchung der Expression von Glykosaminoglykanen

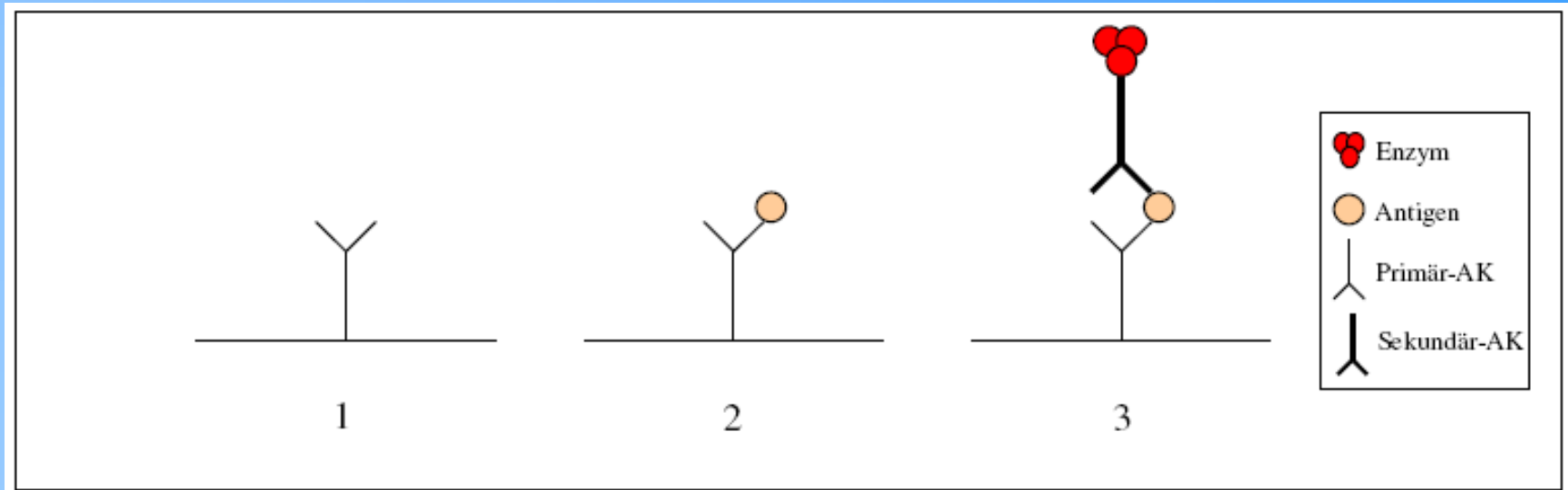


Quelle: S.Stark, Einsatz von Kollagenmatrices im Tissue Engineering, Diplomarbeit, 2004

(3) Marker

Untersuchung des Stoffwechsels durch Quantifizierung von Stoffwechselprodukten

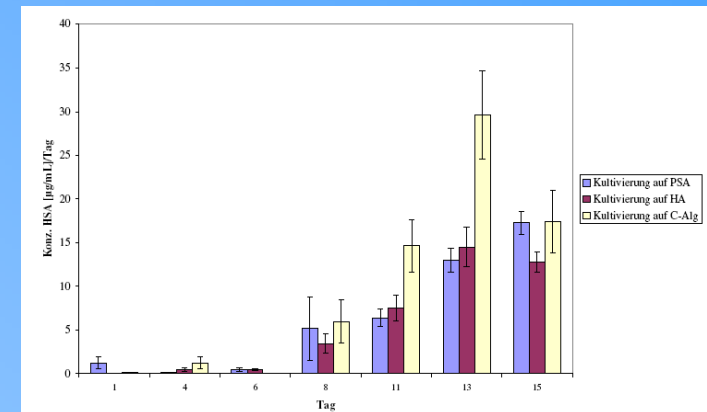
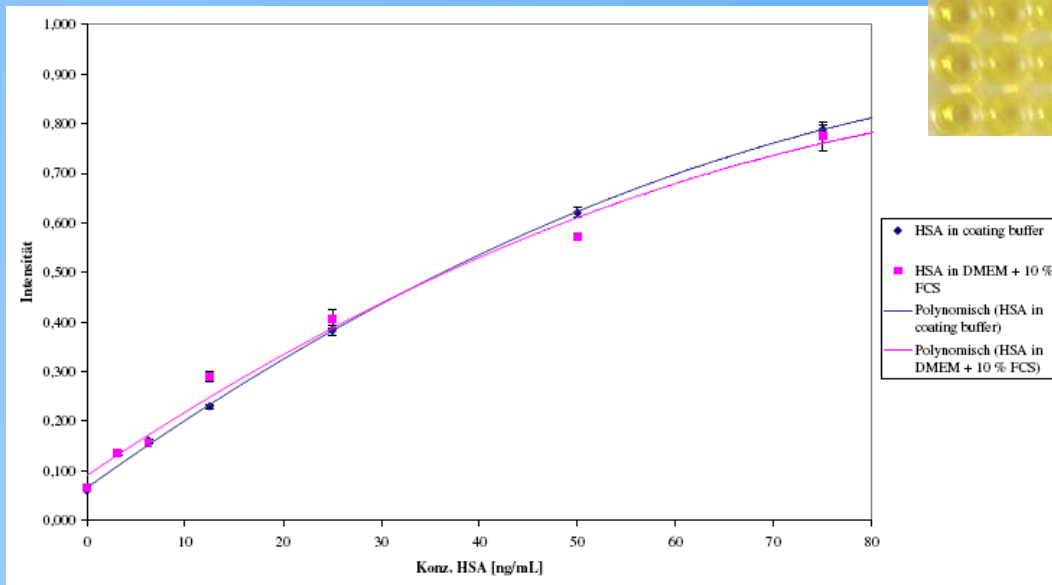
→ Quantifizierung des von Hepatozyten sezernierten Albumins als Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen mittels ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay)



(3) Marker

Untersuchung des Stoffwechsels durch Quantifizierung von Stoffwechselprodukten

→ Quantifizierung des von Hepatozyten sezernierten Albumins als Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen mittels ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)



(3) Marker

Genexpressionsanalyse auf der Stufe der Proteinsynthese

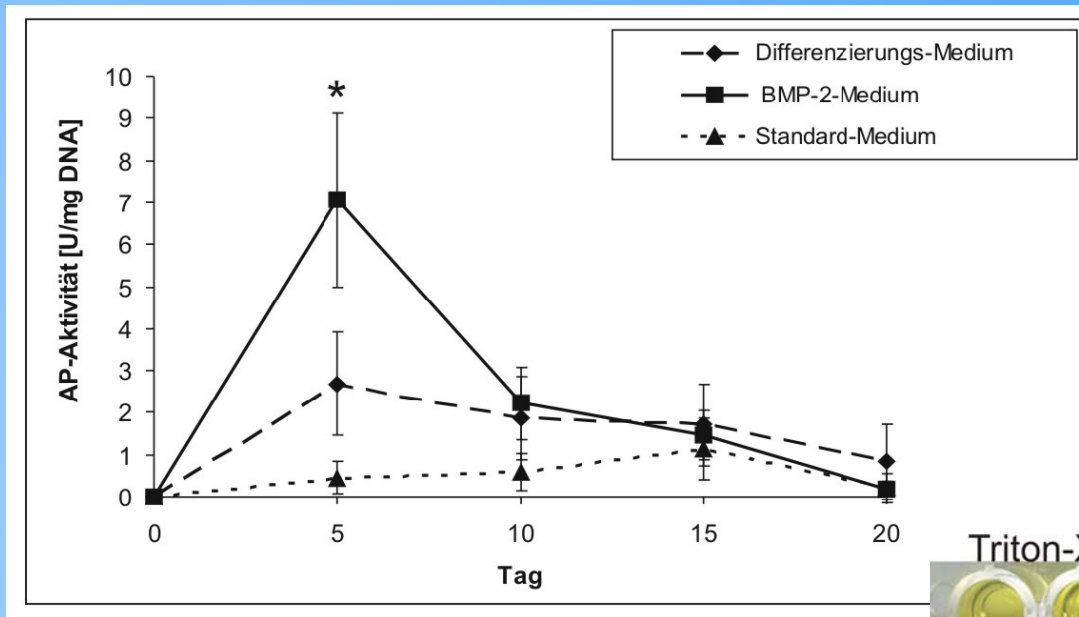
Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) ist ein früher Marker der Knochenentwicklung und ein häufig verwendetes Marker-Protein um Differenzierungsprozesse zu untersuchen. MC3T3-E1 sind Vorläuferzellen, die oft zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen zu Knochengewebe eingesetzt werden. Sie lassen sich u. a. durch Zugabe von BMP-2 zu Osteoblasten differenzieren.

- Aufschließen der Zellen mit 0,01 % Triton X-100 in PBS im Ultraschallbad
- Zugabe von 0,012 M p-Nitrophenylphosphat in 0,05 M Ethanolamin pH 9,8
Überstand
- 30 min bei 37°C inkubiert
- Stoppen der Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 2,5 M NaOH
- Messung der relativen Aktivität der Alkalischen Phosphatase durch Messung der optischen Dichte bei 405 nm im Plattenlesegerät gegen einen Blindwert. Als Blindwert diene eine Probe von 0,01 % Triton X-100 in PBS.

(3) Marker

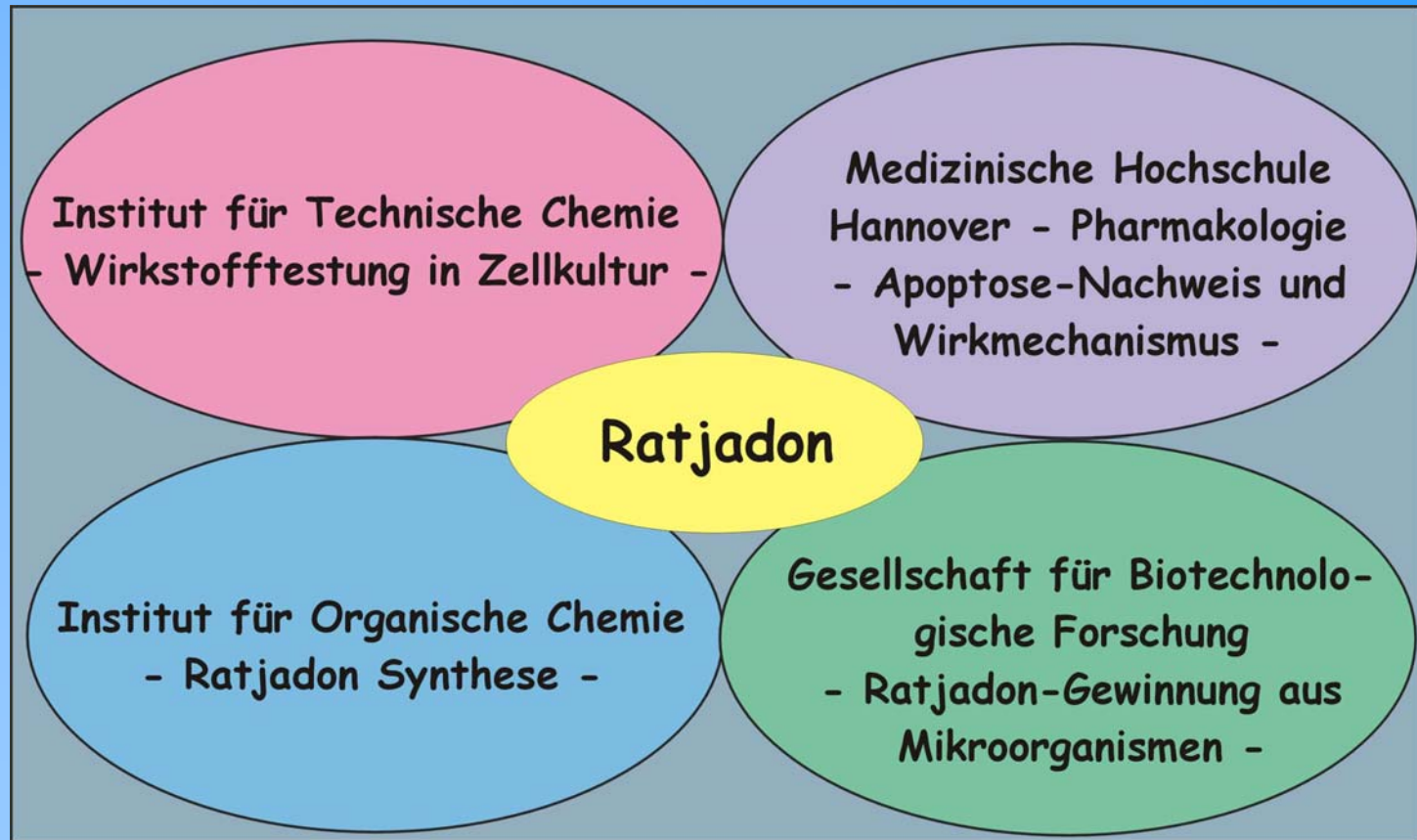
Genexpressionsanalyse auf der Stufe der Proteinsynthese

→ Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram in Standard-, Differenzierungs- und BMP-2-Medium zur Bestimmung der beginnenden Differenzierung

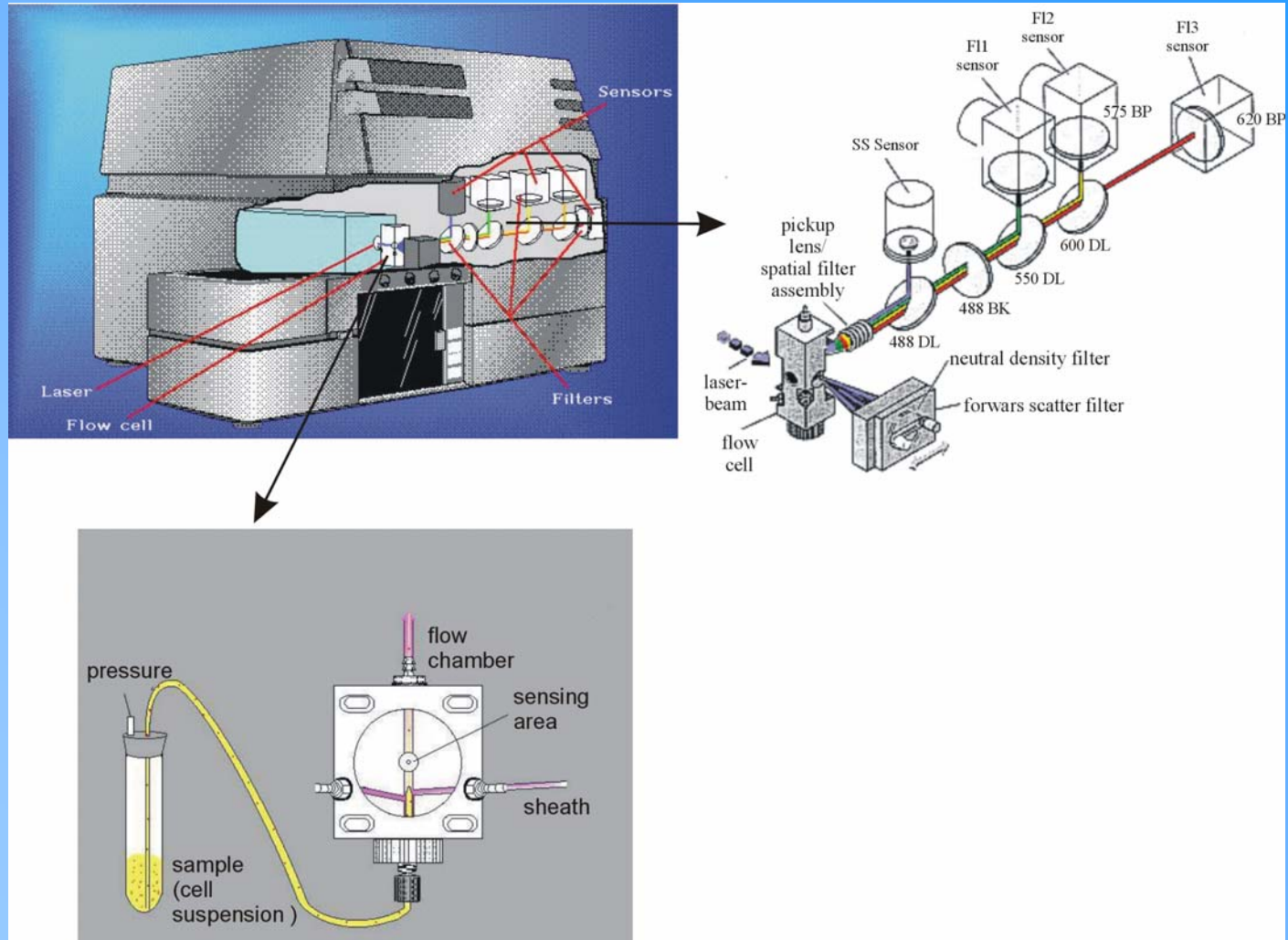


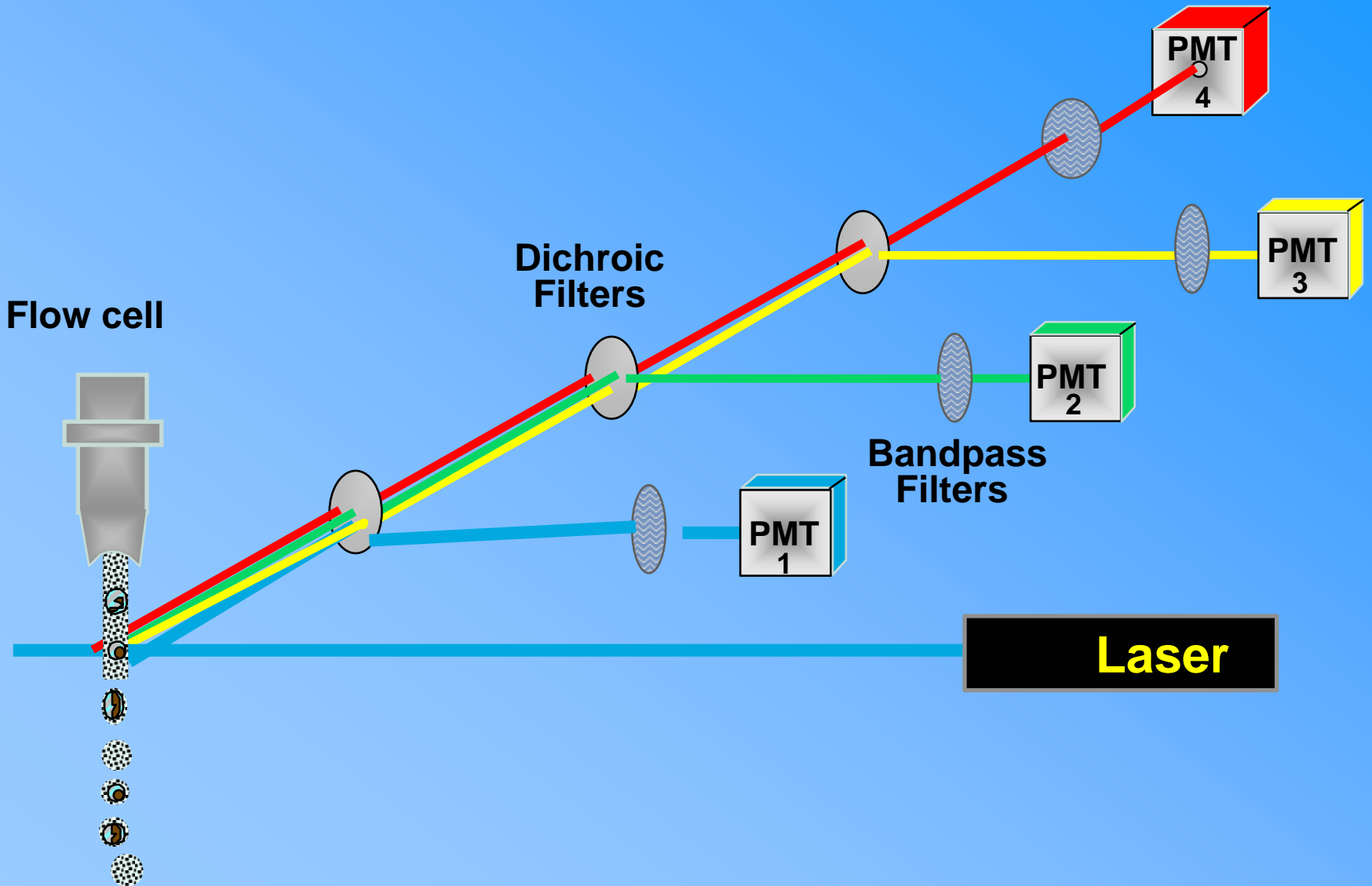
Zellen als Testsysteme

In Vitro Tests

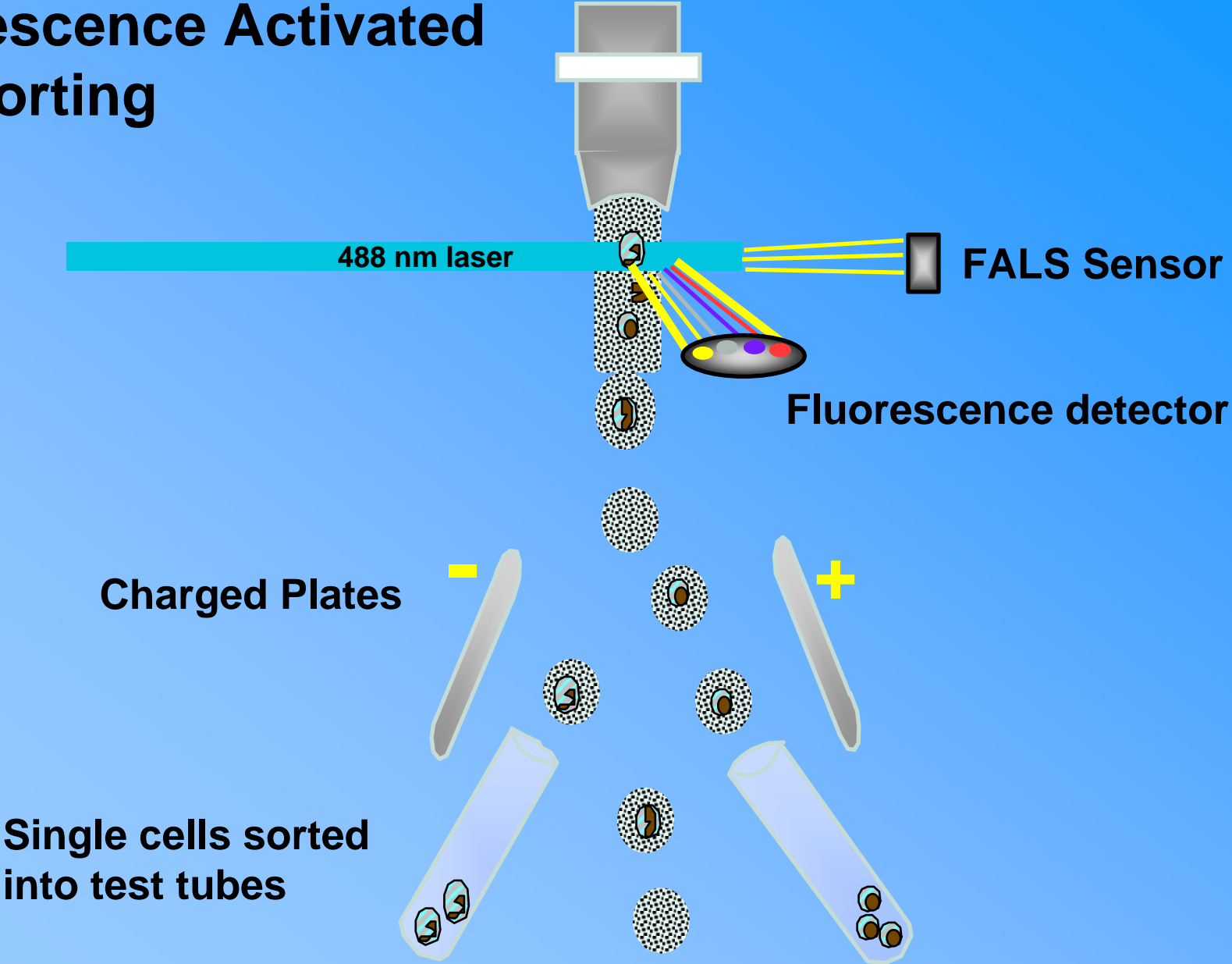


Coulter Epics XL





Fluorescence Activated Cell Sorting

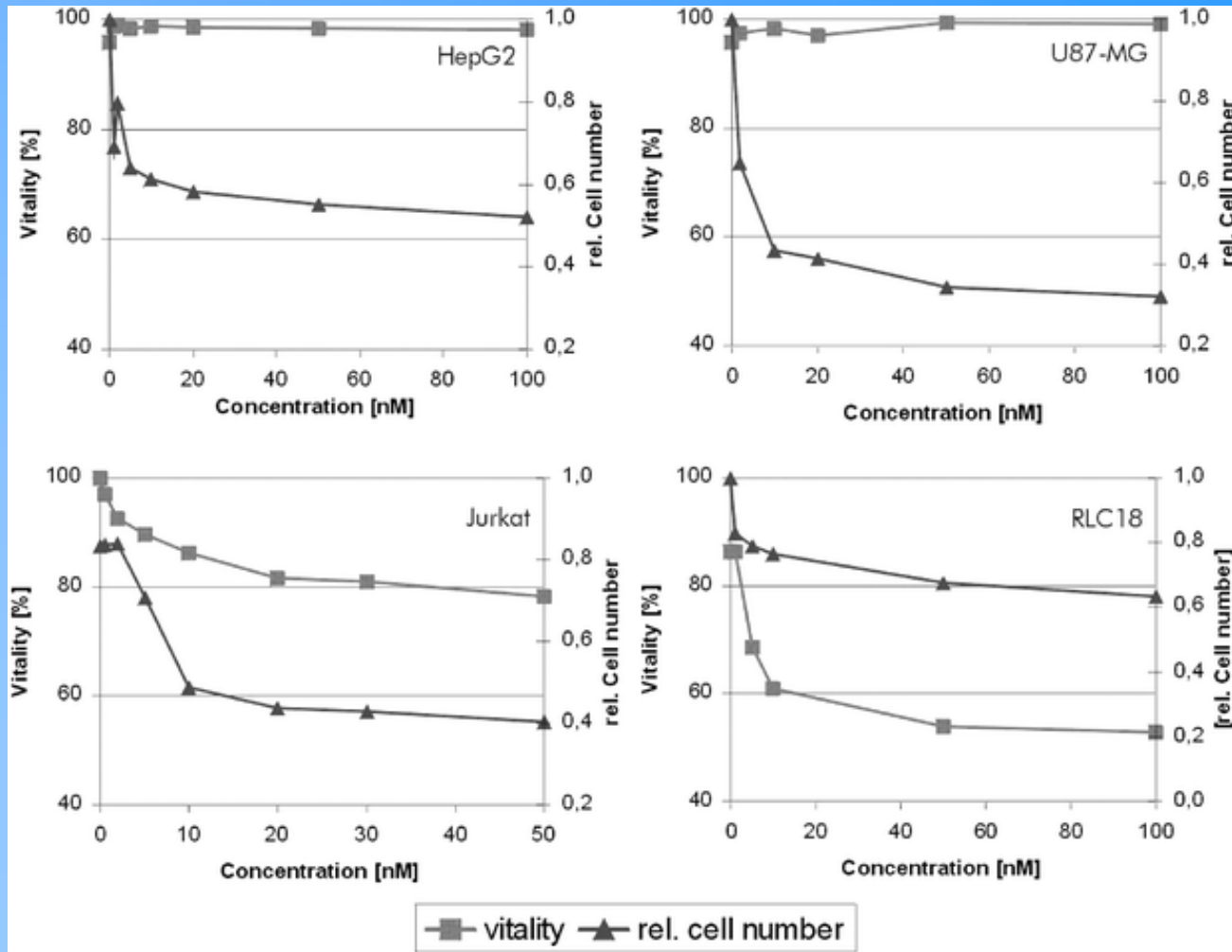


Fluoreszenzfarbstoffe

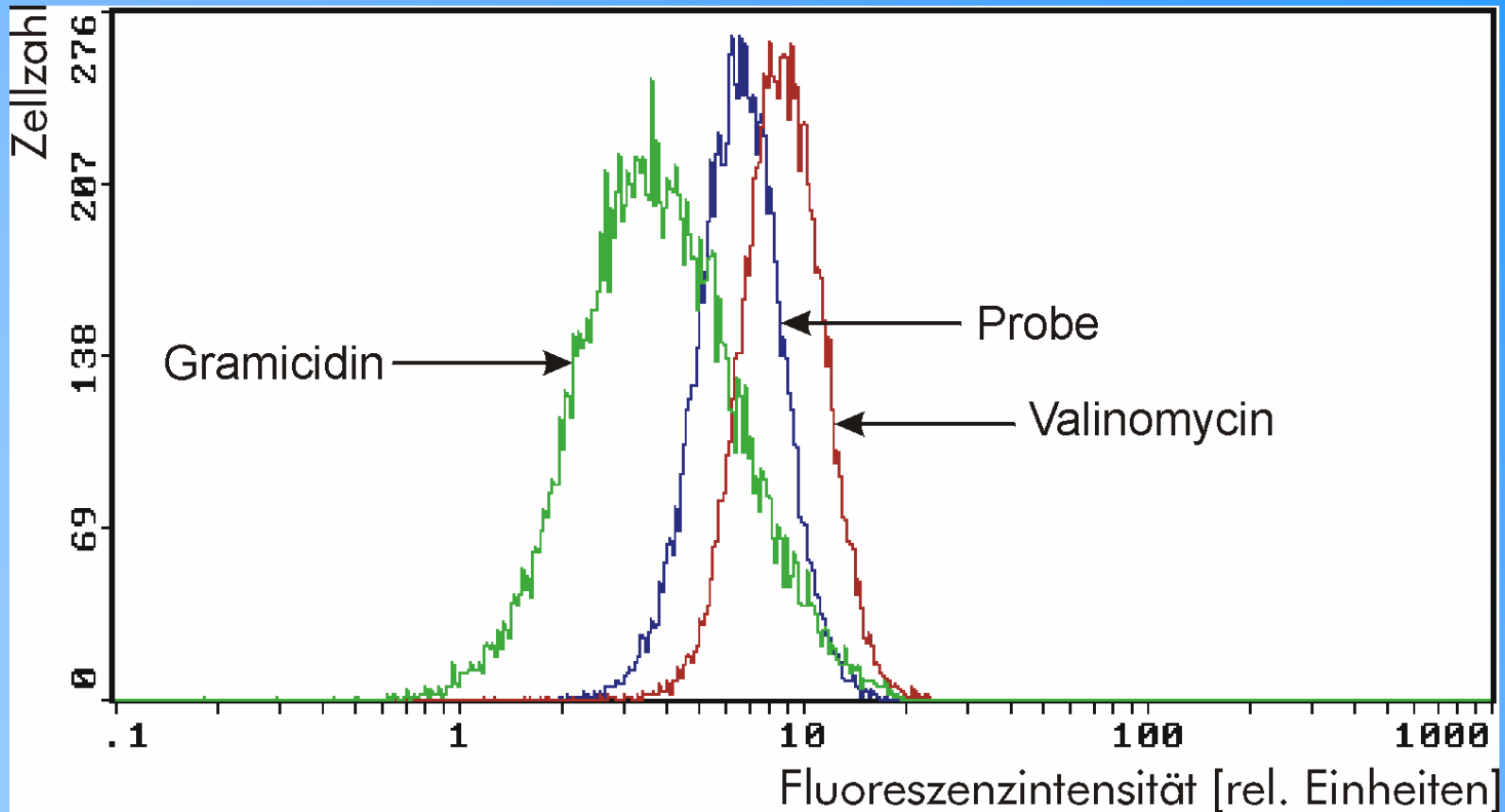
Parameter	Farbstoff
Expressionsmarker	BFP, GFP, YFP
DNA	PI, DAPI, Hoechst 33342
Apoptose	Annexin V
Proteine	FITC, PE
Membranpotential	JC-1, DiOC ₆ 3
Metabolismusaktivität	AM-Ester, Coumarin
Lipidgehalt	Nil Rot
pH _i	BCECF
Oberflächenproteine	gelabelte Antikörper

Parameter	Measurement
Cell size	Light scattering, FSC
Granularity	Light scattering, SSC
DNA-content (cell cycle)	Fluorescence; Propidiumiodid
RNA-content	Fluorescence; Sytox Green
Total protein	Fluorescence; FITC
Lipides	Fluorescence; Nile Red
Antigenes	Fluorescence labeled antibodies
Apoptose	Fluorescence labeled antibodies (Annexin V)
Enzyme activity	Fluorescence labeled substrates
Membran permeability (viability)	FSC or Fluorescence; Propidiumiodid
Intercellular pH	Fluorescence: BCECF-AM
Membrane potential	Fluorescence; DiOC₆ (3)

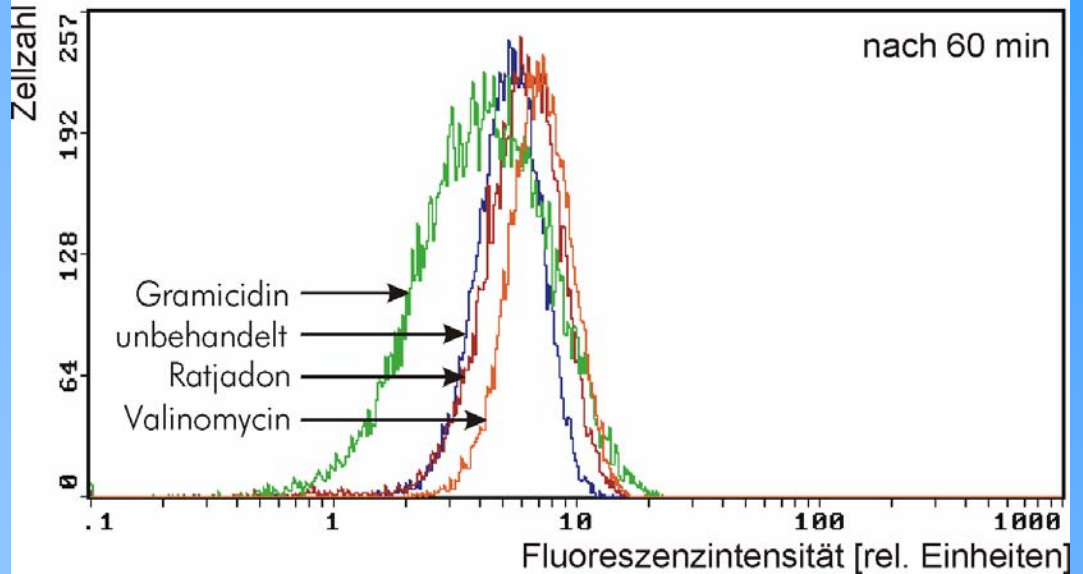
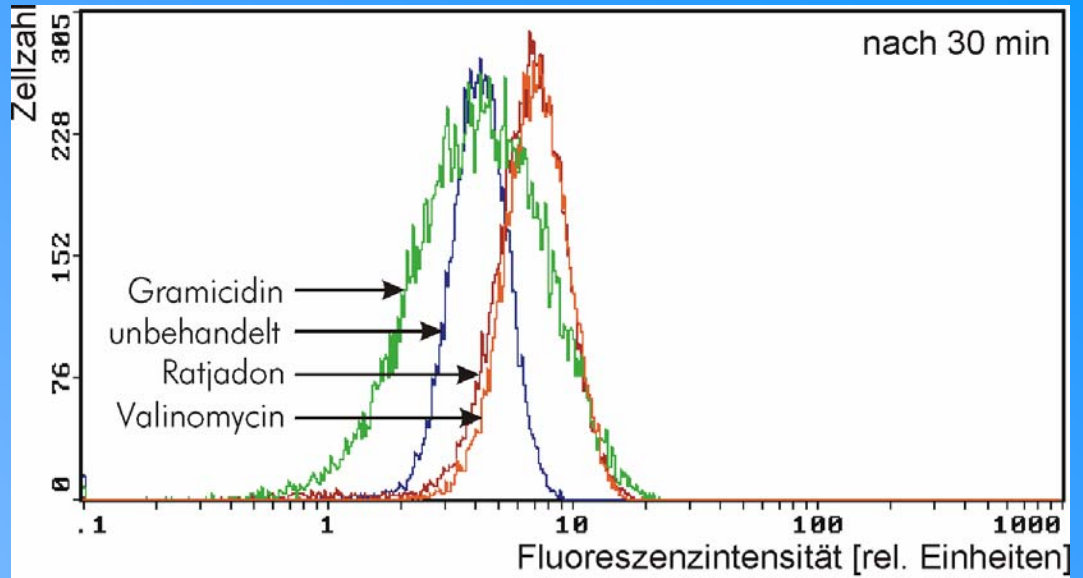
Effekt von Ratjadon auf Zellzahl und Viabilität von verschiedenen Zelllinien



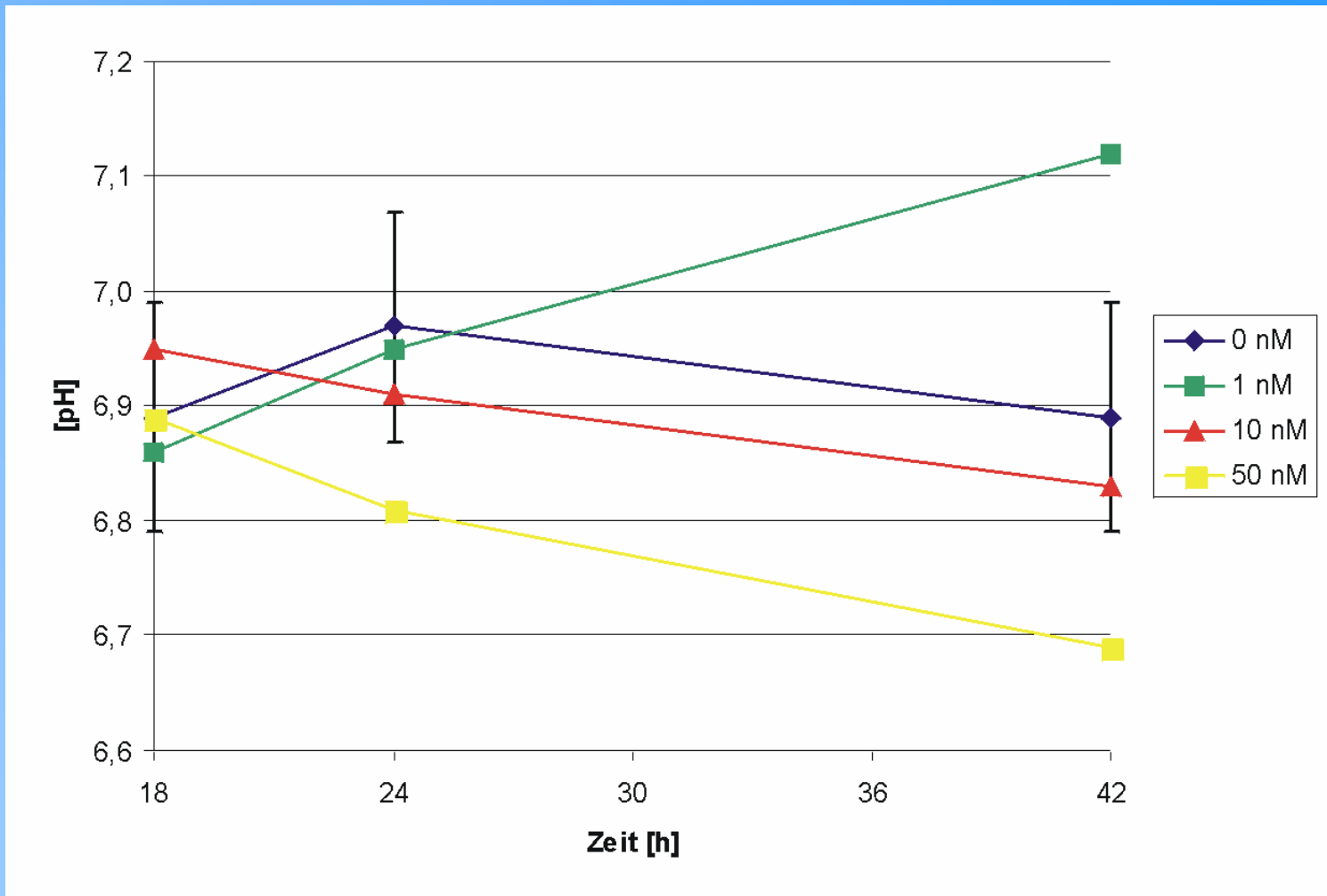
Bestimmung des Membranpotentials



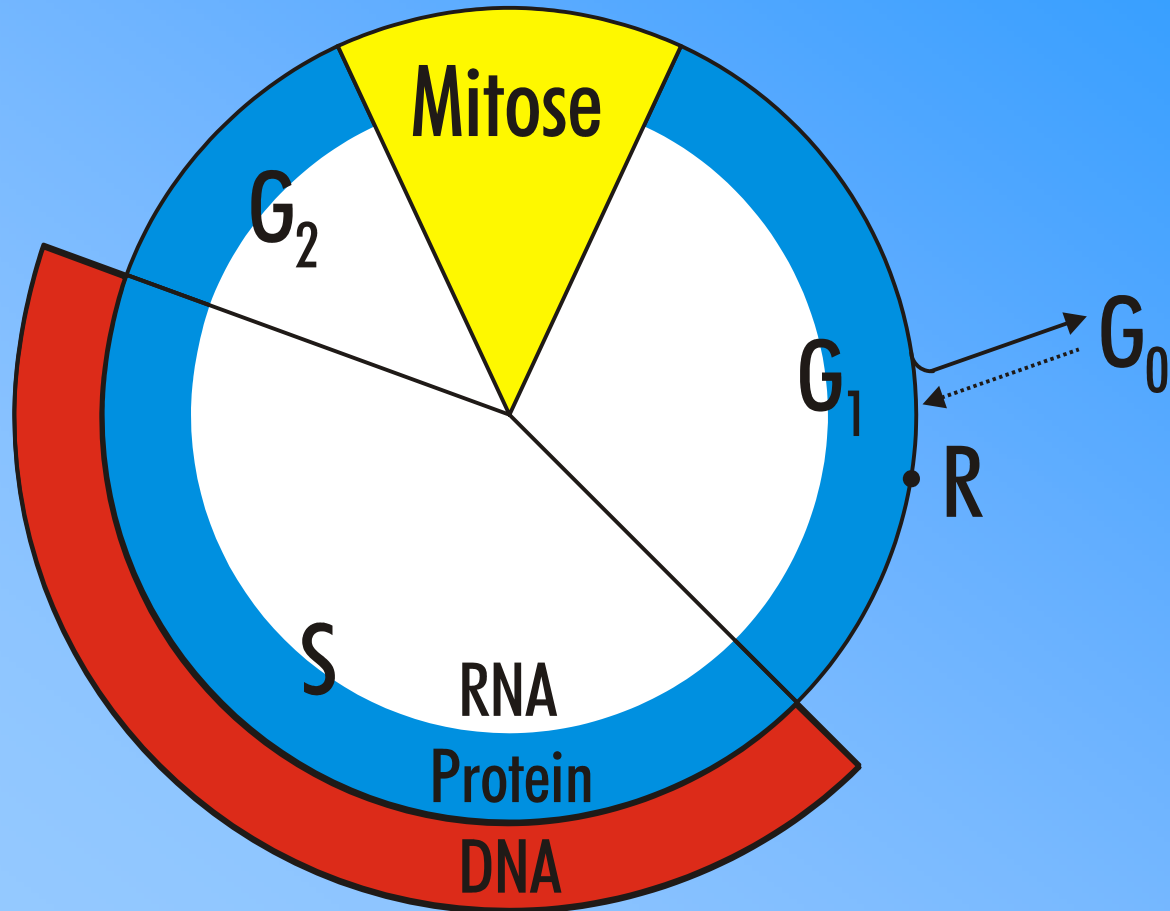
Bestimmung des Membranpotentials an Jurkat-Zellen nach Ratjadon-Einwirkung



Auswirkung von Ratjadon auf den intrazellulären pH-Wert (Jurkat-Zellen, vollsynthetisch hergestelltes Ratjadon)

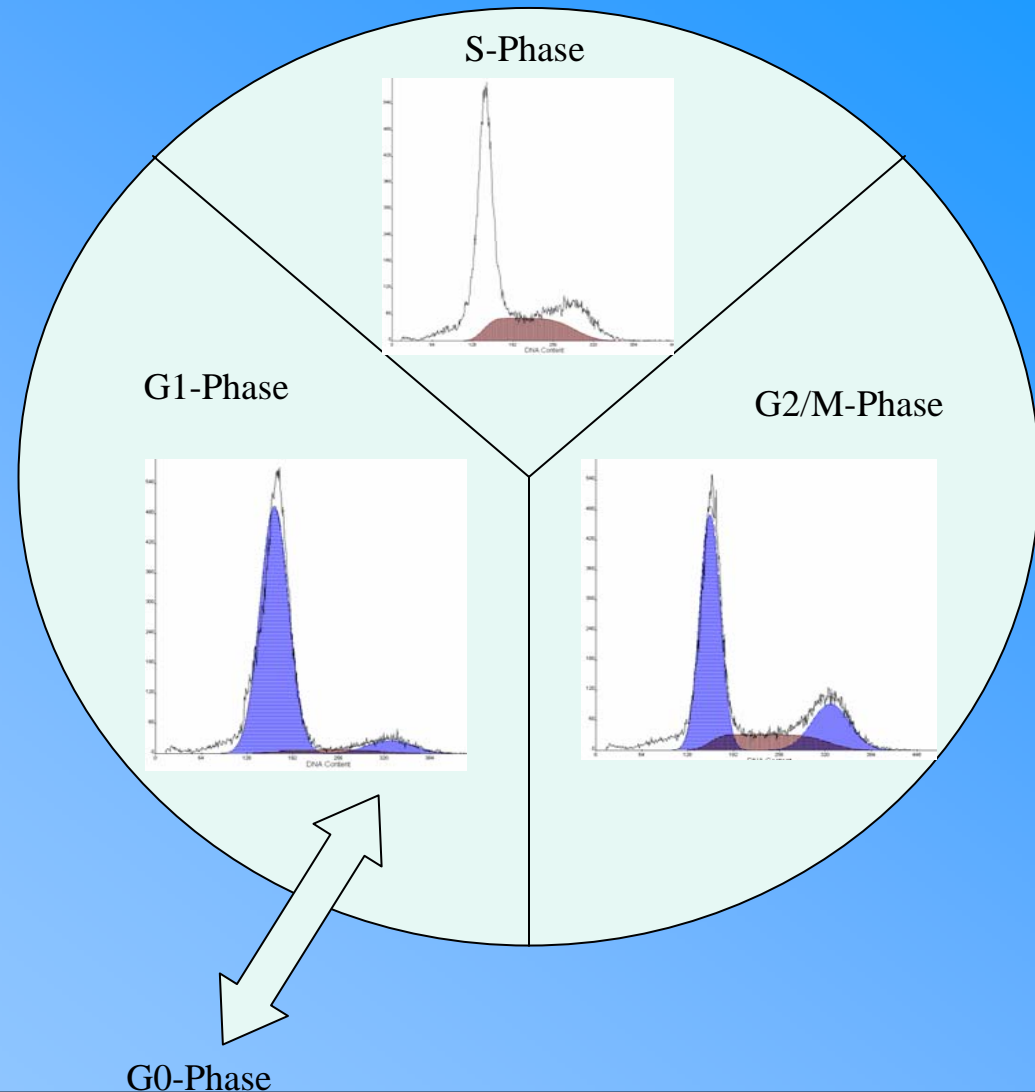


Zellzyklus

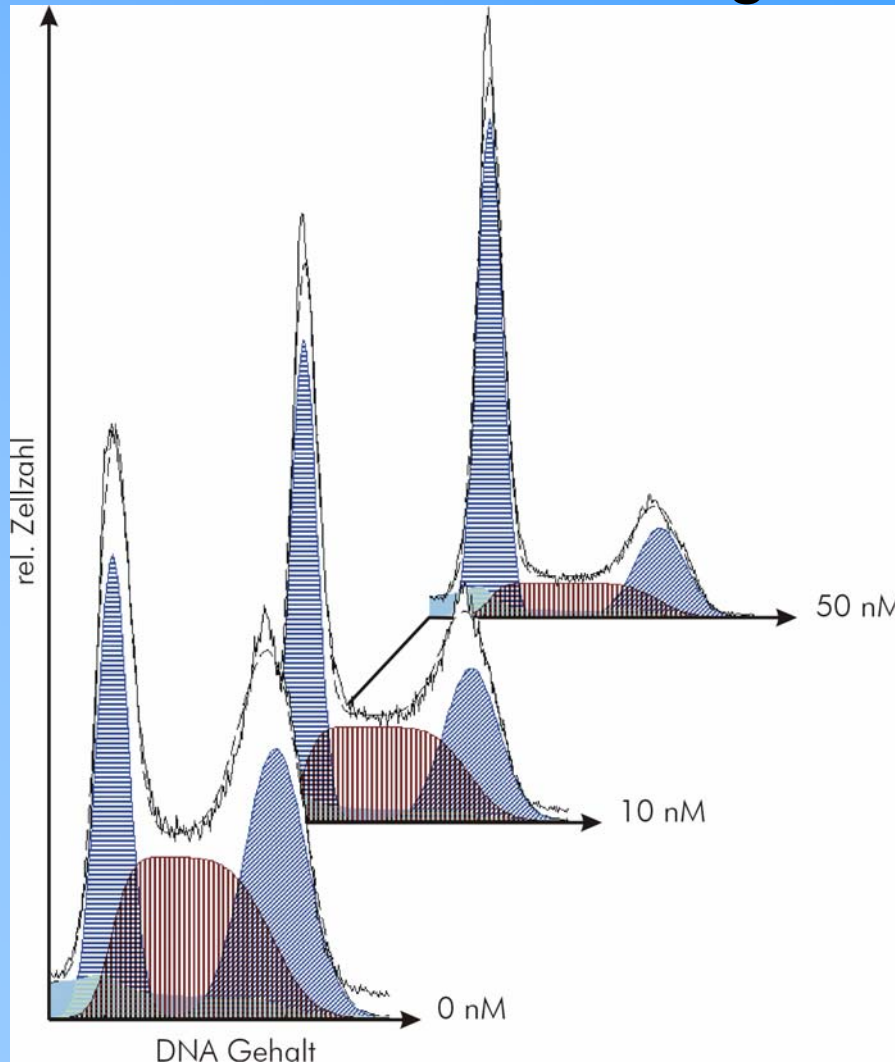


Zellzyklusanalyse

- Messung verschiedener Stadien im Zellzyklus, G0/1-, S-, G2/M-Phase
- Detektion von Zellen im aktiven Teilungsprozess
- Färbung mit DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (Propidiumiodid)

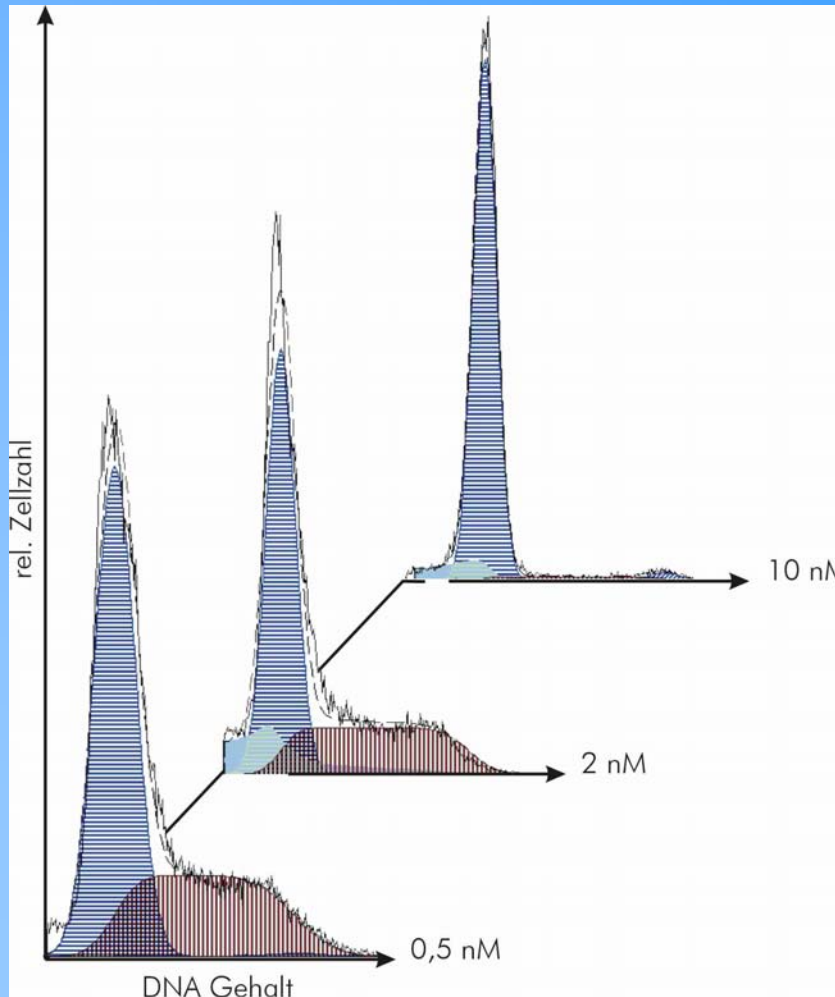


Zellzyklusanalyse von Jurkat-Zellen nach Behandlung mit Ratjadon



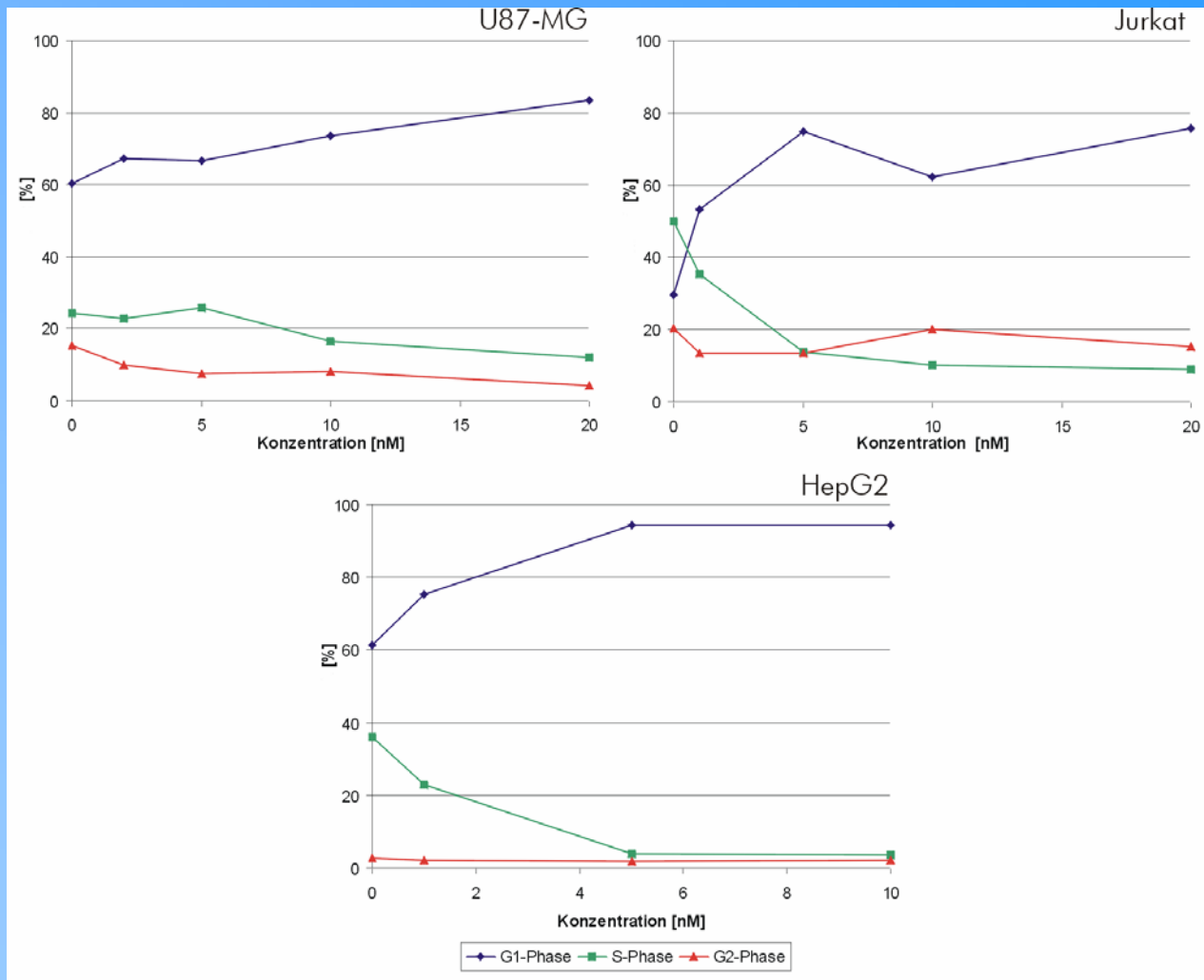
G 1: blau, S: rot, G 2: hellblau

Zellzyklusanalyse von Hepatozyten (Hep G 2) nach Behandlung mit Ratjadon

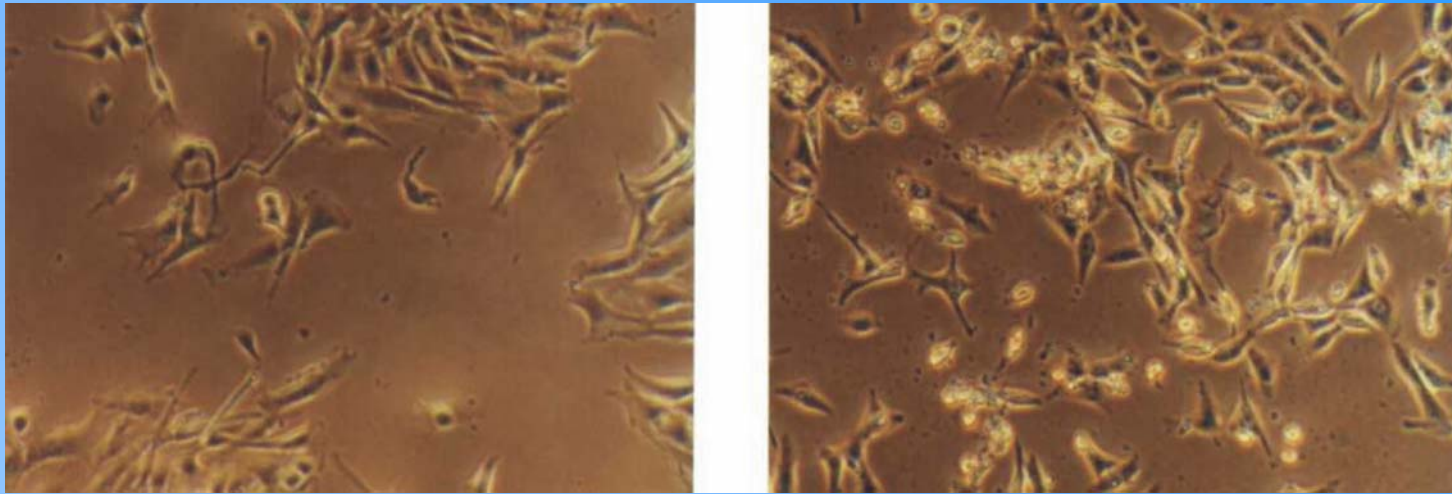


G 1: blau, S: rot, G 2: hellblau

Auswirkung von Ratjadon auf die Zellzyklusphasen



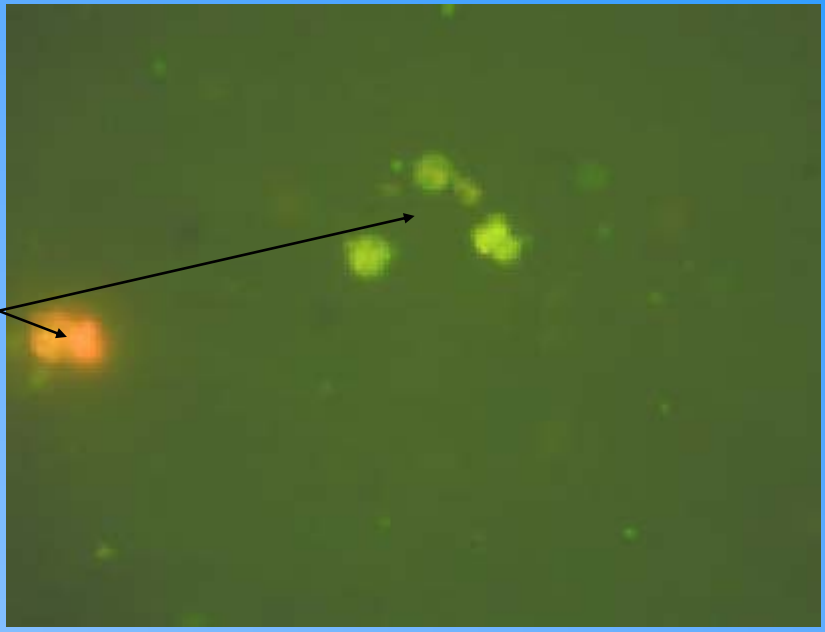
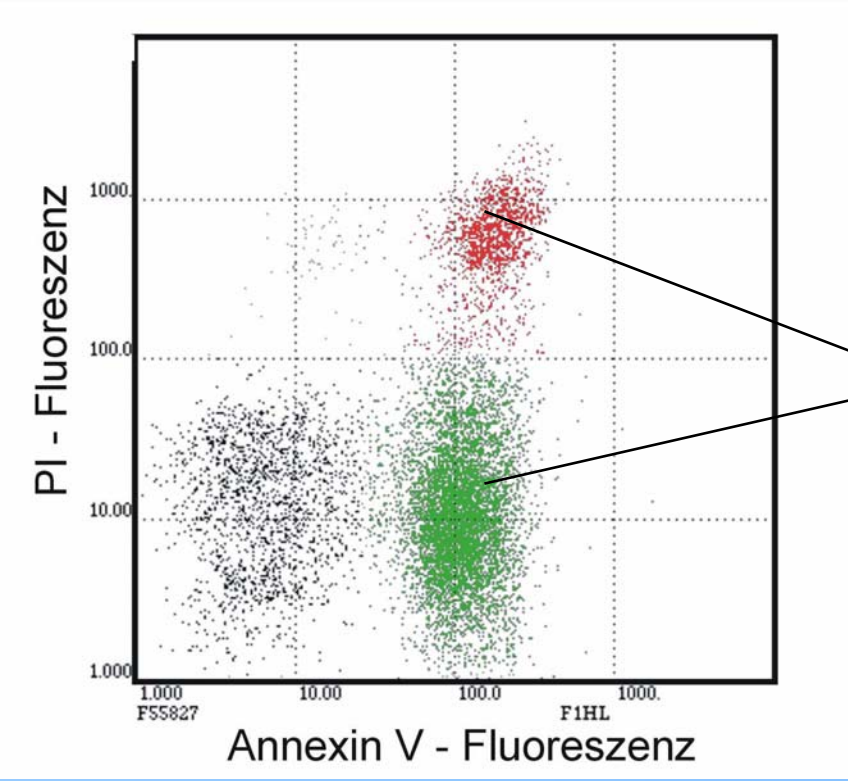
Mikroskopische Aufnahmen von Glioblastomzellen



Vor Behandlung

Nach Behandlung mit Ratjadon
(50 nM nach 48 Stunden)

Example II: Apoptosis



Zellen als Testsysteme

Ratjadon:
Wirksamkeit bereits ab 5 nM;
löst ab 10 nM Apoptose aus

