

Applikation Durchflusszytometrie Apoptose Assay

Apoptose ist ein physiologischer Prozess des programmierten Zelltods, der in geschädigten oder gealterten Zellen in kontrollierten Schritten abläuft: Zunächst erfolgt der Verlust der Plasmamembran-Symmetrie, dann die Kondensation des Zytoplasmas, gefolgt von der Degradation von Proteinen und Defragmentierung der DNA. Diese einzelnen Schritte können durch optimierte Färbungen durchflusszytometrisch sichtbar gemacht werden. Dabei kommen Farbstoffe zum Einsatz, die die kompromittierte Membran (siehe Abb.1.), die erhöhte Caspase-Aktivität, das veränderte Mitochondrien-Membranpotential oder die Fragmentierung der DNA visualisieren.

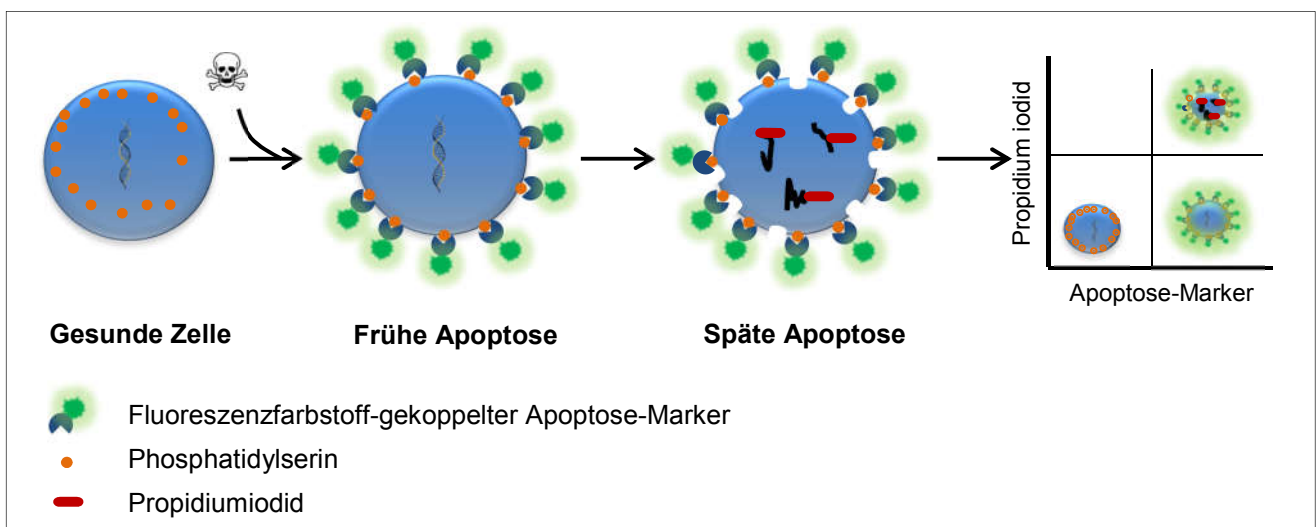


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Apoptose-Assays, bei dem sich die Desintegration der Zellmembran zunutze gemacht wird. Die Stadien der Apoptose können aufgrund ihrer unterschiedlichen Färbemuster durchflusszytometrisch visualisiert werden.

Nachfolgend sind Methoden aufgeführt, die die beschriebenen apoptotischen Prozesse nachweisen (keine Garantie auf Vollständigkeit).

Assay/Nachweis von	Applikation	Apoptosestadium
Caspase	Apoptose	Früh
Mitochondriales Potenzial (JC-1)	Zelltoxizität, Nekrose, Zellzyklusarrest	Sehr Früh
TUNEL	Apoptose	Spät
AnnexinV	Apoptose	Früh - spät
Lactadherin	Apoptose	Früh - spät

Caspase-Aktivität (Invitrogen od. BD Biosciences)

Prinzip

- Aktivierte Caspasen (frühe Apoptose) schneiden Targets wie Bcl-2 oder PARP
- Mehrere Detektionsmöglichkeiten, u.a.
 - über Antikörper (BD), der die aktive Form der Caspase-3 erkennt oder
 - über ein fluorogenes Substrat, welches durch die Caspasen-3/7 geschnitten wird und das freiwerdende Fluoreszenzmolekül bindet anschließend an DNA
 - über ein AK, der die durch Caspase-3 entstandenen PARP-Fragmente detektiert

Verwendung

- Apoptose

Protokoll

- Herstellerabhängig.

Mitochondriales Potenzial (JC-1 Assay)

Prinzip

- Membranpermeable lipophile, kationische Fluorochrome dringen in die Zelle ein und fluoreszieren in Abhängigkeit vom Membranpotential der Mitochondrien.
- JC-1 liegt monomerisch vor und formt nach Akkumulation in den Mitochondrien Aggregate, was eine spektrale Verschiebung hin zu einer roten Fluoreszenz zur Folge hat.
- Im Falle depolarisierter Mitochondrien verbleibt JC-1 als Monomer im Zytoplasma und fluoresziert schwach rot bis grün.

Verwendung

- Zelltoxizität
- Nekrose (Depolarisation)
- Zellzyklusarrest (Hyperpolarisation)

Protokoll

- 1×10^6 Zellen/mL
- Inkubation 10-30 min bei 37° C, 5% CO₂

Hinweis

Bitte die Herstellerangaben beachten.

TUNEL Assay

Prinzip

- Basiert auf Endonukleasen-vermittelter DNA Fragmentierung in der späten Phase der Apoptose.
- TdT katalysiert die Inkorporation von dUTP in die DNA.
- Der Nachweis erfolgt über einen AK gegen Br-dUTP oder durch die Verwendung von fluoreszenz-markierten dUTP.

Verwendung

- Apoptose
- Unter Verwendung von PI auch Zellzyklus

Protokoll

- 1×10^6 Zellen/mL
- Fixieren und permeabilisieren
- Inkubation ~ 60 min bei 37° C

Hinweise

Bitte die Herstellerangaben beachten.

AnnexinV-FITC

Prinzip

- AnnexinV bindet an Phosphatidylserin-Reste (PS) der inneren Membran, welche in der frühen Phase der Apoptose nach außen gestülpt werden.
- Nachweis über FITC-gekoppeltes Annexin, o.ä. Fluorophor.
- Oft in Kombination mit PI/7-AAD zu verwenden.

Verwendung

- Apoptose
- Unter Verwendung von PI auch Zellzyklus

Protokoll

- Inkubation 10-15 min mit AnnexinV-FITC bei RT

Hinweise

AnnexinV bindet Ca^{2+} -abhängig an PS, d.h. unbedingt den mitgelieferten Ca^{2+} -haltigen Binde-Puffer verwenden!

Lactadherin-FITC

Prinzip

- Lactadherin bindet mit höherer Affinität als AnnexinV an Phosphatidylserin-Reste (PS) der inneren Membran, welche in der frühen Phase der Apoptose nach außen gestülpt werden.
- Bindung erfolgt Ca^{2+} -unabhängig.
- Fluoreszenz-Signal ist proportional zum PS-Gehalt.

Verwendung

- Apoptose
- Unter Verwendung von 7-AAD/PI auch Zellzyklus

Protokoll

- 1×10^6 Zellen/mL
- Inkubation 20 min mit Lactadherin-FITC bei RT

Hinweise

Lactadherin bindet Ca^{2+} -unabhängig an PS, d.h. es kann ein normaler PBS-basierter Puffer verwendet werden.