

## Applikation Durchflusszytometrie

# Hypoxie

Hypoxie bezeichnet den Sauerstoffmangel in Zellen und wird nicht nur mit der Entstehung von Erkrankungen des Lipidstoffwechsels, des Herz-Kreislauf- und des muskuloskeletalen Systems assoziiert, sondern auch mit der Tumorentstehung und dem Therapie-Ansprechen.

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  ist eins von vielen Schlüsselmolekülen, welches unter normoxischen Bedingungen konstitutiv degradiert wird. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck, wird HIF-1 $\alpha$  auf Proteine-Ebene stabilisiert und bewirkt, dass die Zelle u.a. ihren Stoffwechsel von aerober Atmung zu anaerober Glykolyse umstellt, um eine ausreichende Energieversorgung und damit die normale Zellfunktion aufrecht zu erhalten.

Nachfolgend ist eine Auswahl an kommerziellen Kits aufgeführt, mit denen Hypoxie durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Unbedingt die Herstellerangaben beachten!

**Tabelle 1:** Übersicht über durchflusszytometrische Nachweisverfahren von Hypoxie

Verfahren	Nachweis
Hypoxia Green for Flow Cytometry (Invitrogen)	Sauerstofflevel durch Rhodamin-Freisetzung
Hypoxic Response Human Flow Cytometry Kit (abcam)	HIF-1 $\alpha$ bzw. responsive Proteine
Hypoxyprobe™	Protein-Addukte mit Sauerstoff-sensitiver Probe

## Hypoxia Green for Flow Cytometry (Invitrogen)

### Eigenschaften

- Membran-permeante, fluorogene Probe, die bei Sauerstoffreduktion Rhodamin freilässt.
- Rhodamin Ex/Em 505 nm/524 nm.
- Signal ist direkt proportional zum Hypoxie-Status.

### Verwendung

- End-Punkt-Analyse.

### Protokoll.

1. 1  $\mu$ l der 1 mM Hypoxia Green Reagent Stock-Lösung zu  $1 \times 10^6$  Zellen geben.
2. Inkubation bei 37 °C für 2-3 h.
3. Optional: Zellen mit PBS waschen.
4. Am Durchflusszytometer messen.

## Hypoxic Response Human Flow Cytometry Kit (abcam)

### Eigenschaften

- HIF-1 $\alpha$  responsive Proteine akkumulieren unter hypoxischen Bedingungen in der Zelle.
- Primär-Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$  und dessen Zielproteine.

### Verwendung

- Quantifizierung von HIF-1 $\alpha$  und responsiven Proteinen wie BNIP3, GLUT1, PDK1.

## **Protokoll**

1. Zellen ernten.
2. In 4 % PFA fixieren, pellettieren.
3. In 90 % eiskaltem MetOH resuspendieren, bei -20° C für ≥ 30 min inkubieren.
4. MetOH entfernen und Zellen in Blockierungspuffer waschen und 30 min inkubieren.
5. Inkubation mit Primärantikörper für 1h, waschen.
6. Inkubation mit Sekundärantikörper für 1h, waschen.
7. Am Durchflusszytometer messen.

## **Hypoxyprobe™**

### **Eigenschaften**

- Grundlage sind Pimonidazol Hydrochlorid und CCI-103F, welche unter hypoxischen Bedingungen durch Reduktion aktiviert werden.
- Die aktivierte Zwischenstufe bildet kovalente Addukte mit Thiol-Gruppen von Proteinen, Peptiden oder Aminosäuren.
- Diese Addukte können über Fluoreszenz-gekoppelte AK nachgewiesen werden.

### **Verwendung**

- Hypoxienachweis in Histoschnitten oder durchflusszytometrisch

### **Protokoll**

- Zellen unter hypoxischen Bedingungen für 1-2 h mit der gewünschten Probe inkubieren
- Fixieren.
- Mit den entsprechenden AK inkubieren, waschen.
- Am Durchflusszytometer messen.