

### Applikation Durchflusszytometrie

## Detektion von Oxidativem Stress

Als Oxidativer Stress wird das zelluläre Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und antioxidativen Schutzmechanismen bezeichnet. ROS, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxyl-Radikale ( $HO\cdot$ ) oder Hyperoxid ( $O_2^-$ ), entstehen u.a. im Zuge des aeroben Stoffwechsels bei der Reduktion molekularen Sauerstoffs in der Atmungskette oder beim Abbau der Katecholamine. ROS sind in der Lage, mit biologischen Makromolekülen (Lipiden, Proteinen, Nucleinsäuren und Kohlenhydraten) zu reagieren und neue ROS zu generieren. Dabei werden Lipide und Proteine durch das Einfügen von Carbonyl-Gruppen, Quervernetzungen oder Fragmentierungen degradiert, sowie DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche hervorgerufen. Diese durch oxidativen Stress hervorgerufenen Schäden sind mit der Alterung von Zellen oder auch pathologischen Veränderungen wie Atherosklerose, Karzinogenese oder auch neurodegenerativen Veränderungen assoziiert.

Im Folgenden wird eine Auswahl verschiedener Methoden der durchflusszytometrischen Detektion von oxidativem Stress, ihrer spezifischen Applikationen und Anforderungen an die Probe vorgestellt.

**Tabelle 1:** Spezifische Anwendungen einer Auswahl geeigneter Reagenzien für den Nachweis des zellulären oxidativen Stress-Status.

Verfahren	Nachweis
2'-7'- Dichlorodihydrofluorescein Diacetat CellROX <sup>®</sup> Oxidative Stress Reagents	Allgemeiner oxidativer Stress-Status
Image-iT <sup>™</sup> Lipid Peroxidation Kit Dihydroethidium	Oxidative Degradation zellulärer Lipide
MitoSOX <sup>™</sup> Red Mitochondrial Superoxide Indicator	Oxidativer Stress durch Superoxide ( $O_2^-$ )
2-Amino-5-Methylamino-2',7'- Difluorofluorescein Diacetat Cell Meter <sup>™</sup> Intracellular Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit	Oxidativer Stress durch Stickstoffmonoxid (NO) Oxidativer Stress durch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )
ThiolTracker <sup>™</sup> Violet	Zellulärer Spiegels an reduziertem Glutathion (GSH)

### 2'-7'- Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFH-DA)

#### Eigenschaften

- Membran-permeables DCFH-DA ist chemisch reduzierte Form des Fluoresceins
- Nach Abspaltung der Acetat-Gruppe durch intrazelluläre Esterasen und Oxidation durch ROS wird das nicht-fluoreszierende DCFH-DA in stark fluoreszierendes DCF umgewandelt
- Anregung 492 - 495 nm, Emission 517 - 527 nm

#### Protokoll

- Zellen in DCFH-DA aufnehmen (applikationsabhängige Konzentration von 1 - 10  $\mu$ M)
- Inkubation 5 - 60 Minuten
- *optional:* Zellen in Zellkulturmedium aufnehmen und eine zu testende Substanz hinzugeben
- Messung am Durchflusszytometer

## Hinweis

DCFH-DA wird nicht von den reaktiven Sauerstoffspezies  $H_2O_2$  und  $O_2^-$  oxidiert (diese werden bei der Bestimmung des allgemeinen oxidativen Stresses folglich nicht berücksichtigt).

Eine nachteilige Beeinflussung der Bestimmung des allgemeinen oxidativen Stresses ist durch geringe Esterase-Aktivität oder die Lokalisation von Esterasen in schwer-zugänglichen Zellkompartimenten möglich (Einsatz modifizierter Sonden empfehlenswert).

## CellROX<sup>®</sup> Oxidative Stress Reagents (Thermo Fisher)

### Eigenschaften

- Im reduzierten Zustand sind die Farbstoffe Membran-permeabel und nicht-fluoreszierend bzw. nur sehr schwach fluoreszierend
- Starke Fluoreszenz erst nach Oxidation durch ROS
- Erhältlich als:
  - CellROX<sup>®</sup> Green Reagent: Anregung 485 nm, Emission 520 nm
  - CellROX<sup>®</sup> Deep Red: Anregung 640 nm, Emission 665 nm
  - CellROX<sup>®</sup> Orange Reagent: Anregung 545 nm, Emission 565 nm

### Protokoll

- *optional*: Zugabe einer zu testenden Substanz
- Zugabe CellROX<sup>®</sup> Reagenz (Endkonzentration 5  $\mu$ M)
- Inkubation 30 Minuten bei 37° C
- Medium entfernen und Zellen mit PBS waschen
- Messung am Durchflusszytometer

## Hinweis

Sowohl optional zu testende Substanzen als auch CellROX<sup>®</sup> Reagenzien können direkt zu den Zellen in Zellkulturmedium dazugegeben werden.

**Tabelle 1:** Vergleich der CellROX<sup>®</sup> Oxidative Stress Reagents hinsichtlich verschiedener Aspekte ihrer Anwendbarkeit.

	CellROX <sup>®</sup> Deep Red Reagent	CellROX <sup>®</sup> Orange Reagent	CellROX <sup>®</sup> Green Reagent
Live cell compatible	Yes	Yes	Yes
Labeling in complete medium	Yes	Yes	Yes
Formaldehyde fixable	Yes	No	Yes
Detergent resistant	No	No	Yes
Compatible platforms	<ul style="list-style-type: none"><li>• Imaging</li><li>• HCS†</li><li>• HTS‡</li><li>• Flow cytometry</li><li>• Attune<sup>®</sup> Acoustic Focusing Cytometer</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Imaging</li><li>• HCS</li><li>• Flow cytometry</li><li>• Tali<sup>®</sup> Image-based Cytometer</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Imaging</li><li>• HCS</li><li>• HTS</li><li>• Flow cytometry</li><li>• Tali<sup>®</sup> Image-based Cytometer</li><li>• FLoid<sup>™</sup> Cell Imaging Station</li><li>• Attune<sup>®</sup> Acoustic Focusing Cytometer</li></ul>

Quelle: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10444>

## Image-iT™ Lipid Peroxidation Kit (Thermo Fisher)

### Eigenschaften

- Anreicherung des Reagenz BODIPY® 581/591 C11 an Membranen lebender Zellen
- Oxidation durch Lipidhydroperoxide (Oxidationsprodukte von Lipiden) resultiert in der Verschiebung des Anregungs- und Emissionspeaks von 581 nm auf 488 nm bzw. 591 nm auf 510 nm

### Protokoll

- *optional*: Zugabe eines Stimulanz der Lipid-Peroxidation
- Zugabe BODIPY® 581/591 C11 Reagenz (Endkonzentration 10 µM)
- Inkubation 30 Minuten bei 37° C
- Medium entfernen und Zellen mit PBS waschen
- Messung am Durchflusszytometer

### Hinweis

Der Kit beinhaltet zusätzlich Cumolhydroperoxid, ein Induktor der Lipid-Peroxidation, welcher als Positivkontrolle verwendet werden kann.

## Dihydroethidium (DHE)

### Eigenschaften

- Im reduzierten Zustand blau-fluoreszierend (Anregung 355 nm, Emission 420 nm)
- Bei Oxidation durch Superoxide bildet sich 2-Hydroxyethidium, welches in die DNA interkaliert und anschließend rot fluoresziert (Anregung 518 nm, Emission 605 nm)

### Protokoll

- Zugabe DHE (direkt zu den Zellen in Zellkulturmedium)
- Inkubation 5 - 60 Minuten bei RT oder 37° C
- *optional*: Zugabe einer zu testenden Substanz
- Messung am Durchflusszytometer

### Hinweis

Die zu verwendende Konzentration des DHE ist den Angaben des jeweiligen Herstellers zu entnehmen und das entsprechende Protokoll zu beachten!

## MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Thermo Fisher)

### Eigenschaften

- Vorwiegende Anreicherung des permeablen Reagenz in den Mitochondrien lebender Zellen
- Bei Oxidation durch Superoxid rot-fluoreszierend (Anregung 510 nm, Emission 580 nm)
- Selektivere Detektion von Superoxiden (keine Detektion anderer ROS oder reaktiver Stickstoffspezies)

### Protokoll

- Zugabe von MitoSOX™ (direkt zu den Zellen in Zellkulturmedium)
- Inkubation 30 Minuten bei 37° C
- Zellen waschen
- Messung am Durchflusszytometer

## Hinweis

Die zu verwendende Konzentration an MitoSOX™ für durchflusszytometrische Anwendungen ist spezifischen Versuchsprotokollen zu entnehmen!

## 2-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetat (DAF-FM Diacetat)

### Eigenschaften

- Membran-permeables DAF-FM Diacetat im reduzierten Zustand nicht-fluoreszierend
- Nach Abspaltung Acetat-Gruppe durch intrazelluläre Esterasen, Reaktion mit Stickstoffmonoxid zu einem fluoreszierenden Benzotriazol (Anregung 495 nm, Emission 515 nm)

### Protokoll

- Zellen in DAF-FM Diacetat aufnehmen
- Inkubation 30 Minuten bei 37° C
- Zellen waschen und erneute Inkubation für 15 Minuten bei 37° C
- *optional*: Zugabe einer zu testenden Substanz
- Messung am Durchflusszytometer

## Hinweis

Die zu verwendende Konzentration des DAF-FM Diacetats ist den Angaben des jeweiligen Herstellers zu entnehmen und das entsprechende Protokoll zu beachten!

## Cell Meter™ Intracellular Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit (AAT Bioquest®)

### Eigenschaften

- Membran-permeables OxVision™ Reagenz fluoresziert nach Reaktion mit Wasserstoffperoxid blau
- Anregung 405 nm, Emission 450 nm

### Protokoll

- Zugabe von OxVision™ Blue Peroxide Sensor (direkt zu den Zellen in Zellkulturmedium)
- Inkubation 20 - 30 Minuten bei 37° C
- *optional*: Zugabe einer zu testenden Substanz
- Messung am Durchflusszytometer

## Hinweis

Die zu verwendende Konzentration des OxVision™ Blue Peroxide Sensors ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen und das entsprechende Protokoll zu beachten!

## ThiolTracker™ Violet (Thermo Fisher)

### Eigenschaften

- ThiolTracker™ Violet reagiert mit reduzierten Thiolen intakter Zellen
- Anregung 404 nm, Emission 526 nm

### Protokoll

- *optional*: Zugabe einer zu testenden Substanz
- Zellkulturmedium entfernen, Zellen waschen und in ThiolTracker™ Violet (10 µM in DMSO) aufnehmen
- Inkubation 30 Minuten bei 37° C im Dunkeln
- Zellen waschen und Zugabe Zellkulturmedium
- Messung am Durchflusszytometer

**Hinweis**

Ein für die Durchflusszytometrie spezifisches Versuchsprotokoll kann den Angaben des Herstellers entnommen werden!