

Praktikum (30023)

Zell-Material-Interaktion Zellbiologische Techniken

**Im Arbeitsbereich Zellbiologie,
Universitätsmedizin Rostock**

WS 2018/2019

Di (13/20/27.11, & 11.12.2018)

Gruppe:

Oberflächenbehandlung: Poly-HEMA, Kollagen Typ-I

Agenda

Praktikumsplan	3
Belehrung	5
Hinweise auf Gefahren	6
Steriles Arbeiten	7
Pipettieren.....	7
Protokoll: Zellbiologische Techniken	9
Allgemeine Hinweise.....	9
Vorgehensweise im Praktikum	9
Präsentation der Daten	9
Aufgabenstellung	10
Versuchsaufbau	10
Herstellung von Lösungen	11
Gruppe A: Quantitative Mikroskopie	12
Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	12
Zellzyklusanalyse.....	13
Gruppe B: Zellkultur	17
Dokumentation der Morphologie	18
Zellzählung	20
Zellkultur & ALP Aktivität.....	24
Gruppe C: Konfokale Mikroskopie	26
Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren & Organisation des Aktinzytoskeletts ...	26
Live Cell Imaging - Mitochondrien	28
Korrelative Mikroskopie.....	30
Gruppe D: Durchflusszytometrie	32
Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren.....	33
Analyse der Zellzyklusphasen am FACSCalibur	35

Praktikumsplan

4 Gruppen: A, B, C, D (à 4-5 Teilnehmer)

Gruppe A: Quantitative Mikroskopie	→ R 1.001 (Dr. Bergemann)
Gruppe B: Zellkultur – Lichtmikroskopie	→ R 1.003 (Dr. Müller)
Gruppe C: Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	→ R 1.014/1.006 (Dr. Rebl)
Gruppe D: Durchflusszytometrie	→ R 1.014 (Dr. Stähle)

1. Tag, Di 13.11.2018

8:30-10:30	Einweisung ins Praktikum (SR10, EG)
10:30-12:00	Theoretische und praktische Grundlagen Biomaterial-Handling (SR10, EG)

12:45-13:00	Kleidungswechsel (SR10, EG)
13:00-13:15	Belehrung und Laborführung (Labore Zellbiologie (ZB), 1. OG)
13:15-14:45	Herstellen und Verdünnen von Lösungen (Labore Zellbiologie (ZB), 1. OG)
14:45-15:00	Fragen und Antworten (SR10, EG)

2. Tag, Di 20.11.2018

8:30-8:45	Kleidungswechsel, kurze Einführung (SR10, EG)
8:45-12:00	Zellbiologisches Arbeiten in den Gruppen

12:45-13:00	Kleidungswechsel (SR10, EG)
13:00-14:45	Zellbiologisches Arbeiten in den Gruppen
14:45-15:00	Fragen und Antworten (SR10, EG)

3. Tag, Di 27.11.2018

8:30-8:45 Kleidungswechsel, kurze Einführung (SR10, EG)

8:45-12:00 Zellbiologisches Arbeiten

12:45-13:00 Kleidungswechsel (SR10, EG)

13:00-14:45 Zellbiologisches Arbeiten

14:45-15:00 Fragen und Antworten (SR10, EG)

4. Tag, Di 11.12.2018

8:30-09:30 Datenanalyse: ImageJ (Tool zur Auswertung mikroskopischer Bilder) & Statistik (SR10, EG)

9:30-10:30 Fertigstellung der Ergebnispräsentation (SR10, EG)

10:30-12:00 Vorstellung der Ergebnisse und kurze Diskussion (SR10, EG)

12:45-14:30 Vorstellung der Ergebnisse und kurze Diskussion (SR10, EG)

14:30-15:00 Abschlussrunde (SR10, EG)

Belehrung

Diese Belehrung ist von allen sorgfältig zu lesen und wird vor Ort durch eine Unterschrift bestätigt.

- Aus Gründen der Reinheit und Arbeitssicherheit im Labor sind stets Labormäntel und feste Laborschuhe zu tragen! (Bitte eigenen Labormantel und -schuhe mitbringen!)
 - Hände beim Betreten des Labors desinfizieren! (→ S2, Handschuhe)
 - Bei Arbeiten mit Säuren und Laugen sowie mit giftigen Substanzen (z.B. Trypanblau, Lösungsmittel) ist das Tragen von Handschuhen zwingend vorgeschrieben! Des Weiteren erfolgt das Arbeiten mit solchen Substanzen unterm Abzug.
 - Essen & Getränke, Zigaretten, Schals und Kosmetika sind im Labor verboten!
 - Pipettieren mit dem Mund ist strengstens verboten!!
 - Für alle Arbeitsabläufe speziell beschriftete Gefäße verwenden und alle Chemikalien/Gefahrenstoffe in die dafür vorgesehenen Abfallgefäße entsorgen!
 - Arbeitsplatz und Werkbank nach dem Experimentieren aufräumen und säubern!
 - Ausführen von Präparationen im Labor bzw. Benutzung der Geräte erst nach detaillierter Einweisung.
 - Bei eventuellen Kontaminationen der Augen oder der Haut, Augendusche (neben Laborwaschbecken) bzw. Körperdusche (über Labortür) benutzen. Sicherheitshinweise und Regeln für das sterile Arbeiten im Labor.
 - Beim Ausbrechen eines Brandes in unmittelbarer Umgebung, Feuerlöscher auf dem Gang benutzen. Standort des nächsten Feuerlöschers bitte beachten. Sammelpunkt beachten.
- entsprechende Brandschutzbelehrung ist sichtbar in jedem Labor ausgehängt.
- Not-Aus-Schalter befindet sich am Eingangsbereich innerhalb des Labors.
 - Vor Beginn des Praktikums erfolgt noch eine praktische Belehrung vor Ort in den Laboren der Zellbiologie (1. Etage, BMFZ). Erst danach ist ein selbstständiges Arbeiten im Labor erlaubt.

Hinweise auf Gefahren

Bei Handelsprodukten sind Hinweise auf die Eigenschaften des Gefahrstoffes den aufgedruckten Gefahrensymbolen und Gefahrenbezeichnungen zu entnehmen. Die dazugehörigen, ebenfalls auf der Verpackung befindlichen, Gefahrenhinweise (R-Sätze) und Sicherheitsratschläge (S-Sätze) sind zu beachten.

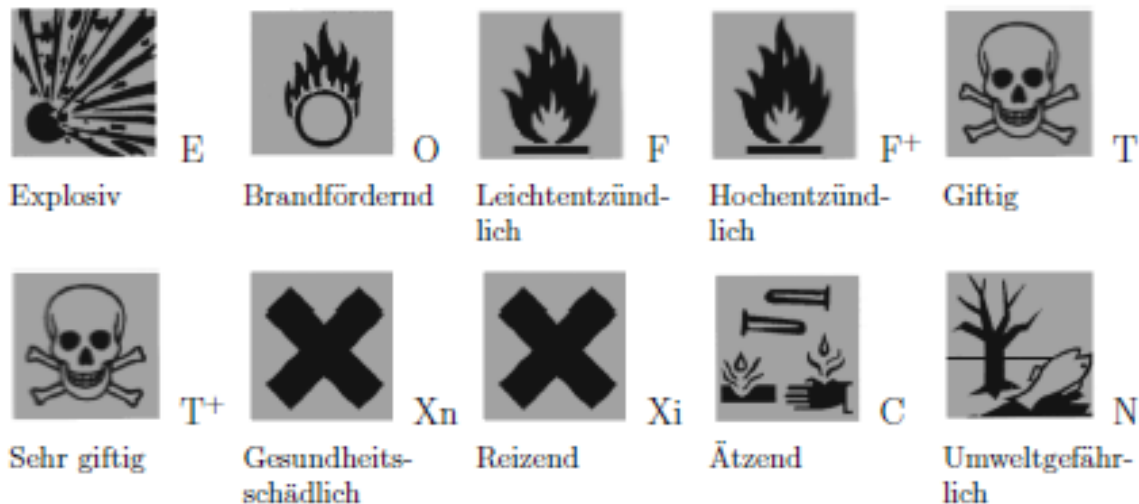


Abb.1: Gefahrensymbole und Gefahrenbezeichnung

Alle chemischen und biologischen Stoffe, deren Ungefährlichkeit nicht zweifelsfrei feststeht, sind als Gefahrstoffe anzusehen und entsprechend zu behandeln. Arbeiten mit Gefahrstoffen, bei denen diese in die Atemluft eintreten können, sind möglichst im geschlossenen Abzug durchzuführen.

Beim Umgang mit Gefahrstoffen muss ein geeigneter Augenschutz (Schutzbrille) getragen werden. In Bereichen, in denen mit chemischen Stoffen gearbeitet wird, ist ständig eine Schutzbrille zu tragen. Der Kontakt von Gefahrstoffen mit der Haut oder der Kleidung ist grundsätzlich zu vermeiden. Bei Arbeiten mit Gefahrstoffen ist geeignete Arbeitsschutzkleidung (Laborkittel) zu tragen. Gegebenenfalls sind geeignete Schutzhandschuhe aus beständigem Gummi oder Kunststoff zu benutzen.

Wird Kleidung durch unvorhergesehene Zwischenfälle mit Gefahrstoffen stark verschmutzt oder durchtränkt, ist sie sofort auszuziehen.

Vor der Aufnahme von Speisen sind die Hände gründlich mit geeigneten Reinigungsmitteln zu waschen.

Steriles Arbeiten

- Beim Betreten der S2-Labore Hände mit Sterilium gründlich einreiben, Einwirkzeit 30sec
- Im Zellkulturraum befinden sich die Handschuhe, diese dort anziehen und genauso desinfizieren mit Sterilium oder 70% igem Ethanol (EtOH) einreiben
- Gebrauchte Spitzen, kontaminierte Tücher oder alte Zellkulturflaschen werden sofort außerhalb der Sicherheitswerkbank in den schwarzen Tonnen entsorgt
- Arbeitsflächen aufgeräumt und sauber halten (70 % EtOH)
- Arbeitsfläche, Geräte und Flaschen außen mit 70%igem Alkohol mit alkoholfeuchtem Tuch desinfizieren, nicht einsprühen > Aerosolvermeidung!
- Gefäße nur so lange wie nötig öffnen
- Verschüttete Lösungen sofort mit alkoholgetränktem Tuch aufwischen und Betreuer Bescheid geben
- Am Ende des Praktikums die Handschuhe im Zellkulturraum in schwarzen Tonne an der Bank entsorgen und die Hände desinfizieren und waschen

Pipettieren

Eine Mikropipette wird benutzt um Lösungen in Mikrolitermengen aufzuteilen. Sie ist wahrscheinlich das am häufigsten verwendete Arbeitsinstrument in einem Zell- und molekularbiologischem Labor. Mikropipetten sind Hochpräzisionsgeräte und sollten unbedingt sorgfältig behandelt werden. Sie dürfen nicht auf den Boden fallen, es dürfen keine Flüssigkeiten eingesaugt werden und sie dürfen nie mit einem Volumen unterhalb und oberhalb des angegebenen Bereichs benutzt werden (Beschädigung der Pipette). Die Erfolgsergebnisse der Versuche im Labor sind stark von der Genauigkeit und dem Umgang mit einer Pipette abhängig. Folgende Mikropipetten sind im Umlauf:

- 0,5 – 10 µl (grauer Hub)
- 2 – 20 µl sowie 20 – 200 µl (gelber Hub)
- 100 – 1000 µl (blauer Hub)
- 1000 – 5000 µl (lila Hub)

Die erste Zahl zeigt das minimale und die zweite Zahl zeigt das maximal zu pipettierende Volumen der Pipette an. Versuche niemals ein Volumen unterhalb und oberhalb des angegebenen Bereichs einer Mikropipette zu benutzen!

Verwendung einer Pipette:

- Immer eine Spitze verwenden: Weiße Spitzen für Pipetten mit grauem Hub, Gelbe Spitzen für die Pipetten mit gelbem Hub und blaue Spitzen für Pipetten mit blauem Hub.
- Den Pipettenhub sanft bis zum **ersten Stopp** herunterdrücken.
- Die Spitze in die zu pipettierende Lösung eintauchen und den Pipettenhub sanft loslassen bis der Stopp wieder erreicht ist.
- Die Spitze mit der Lösung in das dafür bestimmte Gefäß halten und den Hub herunterdrücken bis er am ersten Stopp angekommen ist.
- Den Pipettenhub über den ersten Stopp hinaus ganz durchdrücken und übriggebliebene Flüssigkeit ausstoßen.
- Die Spitze aus der Lösung ziehen und den Pipettenhub wieder loslassen.
- Den seitlichen Knopf benutzen um die Spitze abzuwerfen.

Achtung: Wenn man einige Lösungen in das gleiche Gefäß pipettieren möchte, ist es das Beste mit dem größten Volumen zu beginnen und dann die kleineren Volumina zuzugeben. Man kann die Lösung dann mischen indem man immer wieder hoch und runter pipettiert. Dabei darf man den Pipettenhub **nicht über den ersten Stopp drücken**. Außerdem darf man den Pipettenhub nicht zu schnell loslassen, sonst erzeugt man Luftblasen oder es bleibt Lösung an der Pipettenspitze hängen. Wenn man die gleiche Lösung in einige verschiedene Gefäße pipettieren möchte, kann man die gleiche Pipettenspitze benutzen. Man muss allerdings sichergehen, dass man keine andere Lösung damit berührt.

The effect of the pipetting position (e.g. using a 2-10 ml pipette)

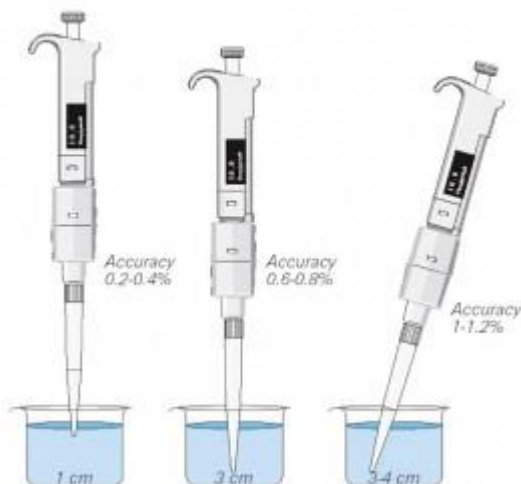


Abb. 2: Pipettenhandling (www.pipette.com)

Protokoll: Zellbiologische Techniken

Allgemeines

In Vorarbeit zum Praktikum ist es notwendig, sich gründlich auf die anstehenden Versuche vorzubereiten und das zugrundeliegende Skript gelesen und verstanden zu haben.

Während des Praktikums empfiehlt es sich, das eigene Vorgehen/ den Versuchsablauf exakt zu protokollieren! Es sollen alle Schritte und Ergebnisse der Versuche festgehalten/dokumentiert werden.

Verwendete Materialien wie Platten und Röhrchen müssen vollständig beschriftet werden (Gruppennummer, Versuch, Datum).

Generierte Daten und Bilder via eigenen Datenträger (z. B. USB) besorgen (unter Aufsicht eines Betreuers).

Am letzten Tag ist pro Gruppe mind. 1 PC mitzubringen (mit Software **ImageJ**).

Vorgehensweise im Praktikum

Zu Anfang eines jeden Praktikumstages bespricht der Praktikumsbetreuer kurz die nötigen theoretischen Grundlagen der Versuche und behandelt die bei der Vorbereitung aufgetretenen Fragen der Praktikanten. Der Betreuer ist gehalten diese Fragen zu beantworten, aber auch den Grad der Vorbereitung der Praktikanten zu beurteilen. Nur wer gut vorbereitet ist, kann qualifizierte Fragen stellen.

In diesem Skript werden am Anfang des entsprechenden Themenblocks die Prinzipien der Methode kurz vorgestellt. Der Praktikant hat damit einen Anhaltspunkt für die Vorbereitung.

Präsentation der Daten

Jede Gruppe fertigt zum Ende des Praktikums (11.12.2018) eine kleine Präsentation an, in der die entsprechende zellbiologische Technik/Arbeit kurz vorgestellt (Prinzip der Methode & Versuchsablauf, sowie die jeweiligen Ergebnisse) wird (20 – 30 min).

Aufgabenstellung:

Zellbiologische Analysen von MG-63 Zellen (Osteosarkoma-Zelllinie) auf unterschiedlich beschichteten Materialien (Bsp.: Deckglas oder Polystyrol) vergleichend zu den unbehandelten, reinen Oberflächen (Kontrolle). Dafür wurden die Materialien im Vorfeld mit **Poly-HEMA** (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)), einer anti-adhäsiven Beschichtung, oder mit **Kollagen Typ-I**, einer pro-adhäsive Matrix, über Nacht steril unter der Sicherheitswerkbank beschichtet. Die MG-63 Zellen werden für **24 h** auf den zu untersuchenden Oberflächen von den Praktikumsbetreuern ausgesät (**5×10^4 Zellen pro Probe**). Im Praktikum soll nun das zelluläre Verhalten der Zelllinie MG-63 auf diesen Materialien vergleichend zur Kontrolle (unbehandeltes Deckglas) untersucht werden.

Versuchsaufbau *in vitro*

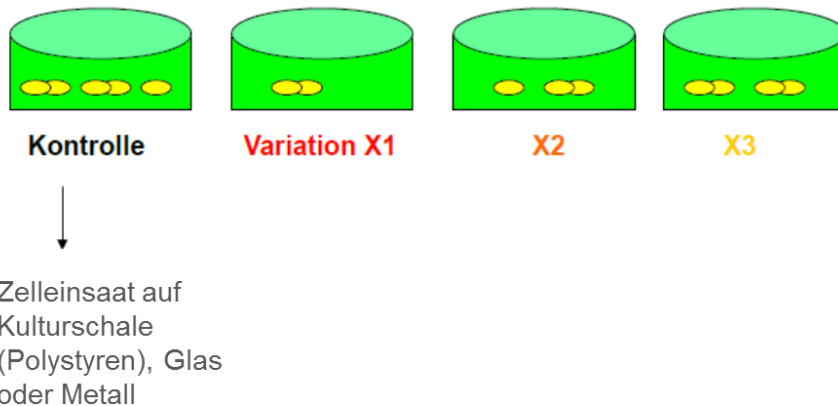


Abb.3: Schema Versuchsaufbau

Bei einem Versuchsaufbau muss auf adäquate Kontrollen geachtet werden, um die zellulären Reaktionen vergleichen und das Zellverhalten *in vitro* richtig einschätzen zu können.

Die Kontrolle muss dem gleichen Ausgangsmaterial bestehen (Bsp. Metall oder Glas).

Es können gegeben falls auch noch Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt werden um eine bekannte zelluläre Reaktion zu bestätigen

Herstellen von Lösungen

Herstellung und Ansetzen der im Praktikum verwendeten Arbeitslösungen für die Beschichtung von Materialien: Kollagen und Poly-HEMA.

2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe der substituierten Carbonsäureester und Alkohole (HEMA: Molare Masse 130,14 g·mol⁻¹). Als Poly-HEMA (Hydrogel) wird es verwendet zur Herstellung von Polymeren (z. B. Kontaktlinsen, Kunstnägel). In der Zellkultur wird das Poly-HEMA verwendet, um die Zelladhäsion an Flächen von Zellkulturgefäßen zu verhindern.

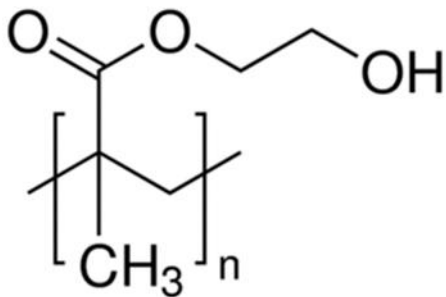


Abb. 4: Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)

Das Poly-HEMA liegt als Pulver vor (SIGMA, 120 mg/ml) und muss in Ethanol (HPLC-Grade, Ethanol absolute, for HPLC, ≥99.8%) gelöst werden.

Kollagen ist ein tierisches Strukturprotein der extrazellulären Matrix. Kollagen ist ein Faserbestandteil von beispielsweise Haut, Knochen und Zähnen, das Zellen und Gewebe zusammenhält. Das **Kollagen Typ-Ia** (aus Rattenschwanz) wurde als nützliche Matrix zur Verbesserung der Zellkultur entdeckt. So können Zellkulturgefäße, beschichtet mit Kollagen Typ-I, einen Einfluss auf Adhäsion, Migration, Wachstum und Differenzierung der Zellen haben.

Die Kollagenlösung (Typ-I, Rattenschwanz; BD Biosciences, 3,32 mg/ml) wird in Essigsäure (0,1 %) zu der Arbeitslösung von 200 µg/ml verdünnt.

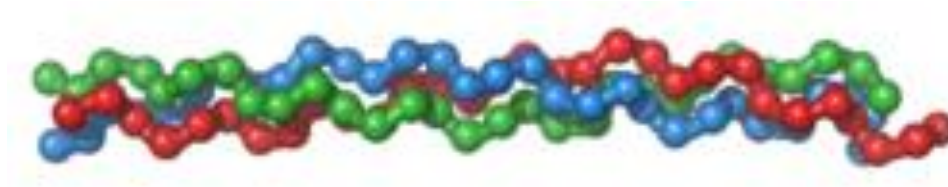


Abb. 5: Kollagen-Tripelhelix

Gruppe A – Quantitative Mikroskopie

Der NucleoCounter® NC-3000 (ChemoMetec AS©, Denmark) ist ein hochpräzises bildgebendes Zytometer und liefert eine All-In-One Lösung zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung. Der NC-3000 detektiert, quantifiziert und analysiert sämtliche Fluoreszenzsignale auf Einzelzell-Ebene. Die Signale werden durch die Analysen-Software automatisch erfasst und verarbeitet.



Abb. 6: NC-3000™, www.chemometec.com

1. Zellzählung und Vitalität

Der NucleoCounter® NC-3000™ verwendet für die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität die Via1-Cassette™. Die Via1-Cassette fungiert direkt als Pipette und die immobilisierten Fluoreszenzfarbstoffe Acridine Orange und DAPI färben automatisiert die lebenden und toten Zellpopulationen. Die Via1-Cassette™ ist Volumen-kalibriert wodurch eine hohe Präzision bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Viabilität ermöglicht wird. Der NucleoCounter zählt nur kernhaltige Zellen. Durch Zugabe eines Lysepuffers werden Zellen und andere von Membranen eingeschlossene Partikel lysiert, so dass die freien Nuclei in Suspension kommen und anschließend zur Färbung und Zählung mit DAPI und dem NucleoCounter® vorliegen. Die Via1-Cassette™ enthält bereits beide Fluorophore für die Färbung – Acridinorange für alle Zellen und DAPI für die toten Zellen. Anschließend wird die Via1-Cassette™ in den NC-3000™ eingebracht und die Messung gestartet.

Aufgabenstellung

Analyse der Zellzahl und -Vitalität von Zellen auf unterschiedlich behandelten Deckgläsern.

Materialien

- Via1-Cassette™
- PBS (unsteril) (ohne Ca, Mg)
- Trypsin
- Komplettmedium (DMEM++)
- Auswertung mit der NucleoView™ Software

Versuchsablauf

2. Analyse der Zellzyklusphasen

Der Zellzyklus besteht im Regelfall aus Interphase und Mitose (Zellteilung). Die Interphase: unterteilt sich in G1-Phase (einfacher Chromosomensatz), Synthesephase (S-Phase) und G2-Phase (doppelter Chromosomensatz).

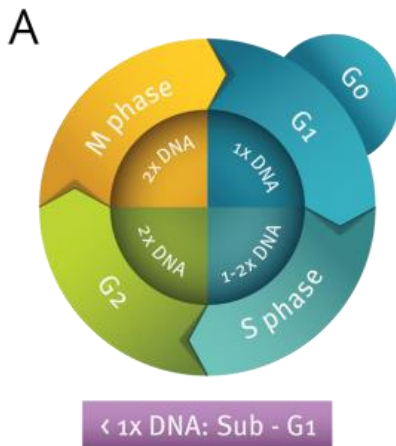


Abb. 7: Cell cycle analysis with the NC-3000™, www.chemometec.com

Der relative DNA-Gehalt der Zellkerne in den Zellzyklusphasen kann über Fluoreszenzfarbstoffe nachgewiesen werden. Die Fluorochrome binden an bestimmte Bestandteile der Zellen. Der Zellzyklus-Assay im NucleoCounter® NC-3000™ verwendet das Fluorophor DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) für den Nachweis des DNA-Gehaltes. DAPI bindet gezielt an doppelsträngige DNA. (Absorptionsmaximum 358 nm, Emissionsmaximum 461 nm). Die Intensität des Lichtsignals von DAPI, erlaubt im Rahmen der Zellzyklusanalyse die Unterscheidung zwischen Zellen mit einfachem Chromosomensatz (G1-Phase) und Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (G2-Phase). Des Weiteren gibt der Sub-G1-Peak einen Hinweis auf apoptotische Zellen. Mit dem NucleoCounter® NC-3000™ wird der DNA-Gehalt quantifiziert und anschließend die einzelnen Stadien des Zellzykluses detektiert.

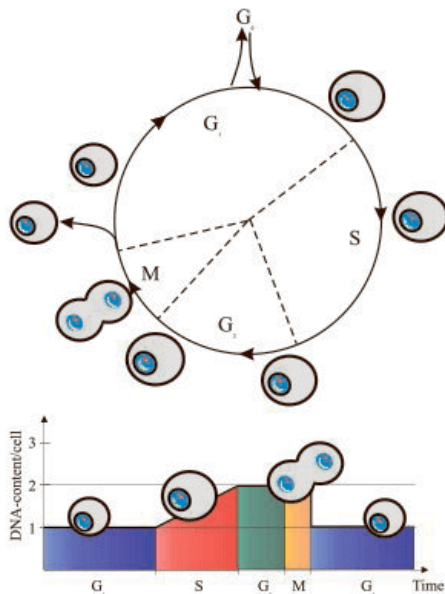


Abb. 8: Cell cycle using DAPI with NC-3000™ Cell Cycle Assays, www.chemometec.com

a. Analyse der Zellzyklusphasen mit dem 2-Step Cell Cycle Protokoll

Die Zellen werden mit Lysepuffer, DAPI und Stabilisierungspuffer gemischt. Für diesen Assay sind weder Trypsin-Vorbehandlung noch Waschschrte oder Zentrifugation nötig. Die Zell-Lysate werden in die NC-Slides für die Messung im NucleoCounter® NC-3000™ geladen. Der NucleoCounter® NC-3000™ analysiert automatisch die Fluoreszenzbilder und stellt die Verteilung des DNA-Gehaltes in einem Zellzyklus-Histogramm dar. Die NucleoView™ Software zeigt über den Plotmanager ein Zellzyklus-Histogramm an, in welchem die Gates für die einzelnen Zellzyklus-Phasen Sub-G₁, G₁/G₀, S und G₂/M definiert werden können.

Aufgabenstellung

Analyse der Zellzyklusphasen und Apoptose von MG-63 Osteoblasten auf unterschiedlich behandelten Deckgläsern.

Materialien

- NC-Slides
- PBS (unsteril) (+ Ca, Mg)
- Lösung 12 (DAPI, 500 µg/ml, ChemoMetec AS©, Denmark)
- Lösung 10 (Lyse-Puffer, ChemoMetec AS©, Denmark)
- Lösung 11 (Stabilisierungs-Puffer, ChemoMetec AS©, Denmark)
- Auswertung der Zellzyklusphasen mit der NucleoView™ Software

Versuchsablauf

b. Analyse der Zellzyklusphasen mit einem optimierten 2-Step Cell Cycle Protokoll

Welche Fehler sind möglicher Weise unter 2.1. aufgetreten? Wie können diese durch Adaption des Protokolls umgangen werden?

Aufgabenstellung

Eigene Optimierung der Analyse der Zellzyklusphasen und Apoptose von MG-63 Osteoblasten auf unterschiedlich behandelten Deckgläsern.

Materialien

- NC-Slides
- PBS (unsteril) (+ Ca, Mg)
- Lösung 12 (DAPI, 500 µg/ml, ChemoMetec AS©, Denmark)
- Lösung 10 (Lyse-Puffer, ChemoMetec AS©, Denmark)
- Lösung 11 (Stabilisierungs-Puffer, ChemoMetec AS©, Denmark)
-

Weitere ... je nach Optimierungsschritten

- Auswertung der Zellzyklusphasen mit der NucleoView™ Software

Versuchsablauf

Gruppe B – Zellkultur

Bei der Zellkultivierung werden aus dem Gewebeverband isolierte Zellen, über bestimmte Zeiträume in Kultur gehalten. Primärzellen, wie die im Praktikum vorgestellten mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (**ASC** - adipose-derived stem cells), sind Zellen, die zuvor direkt aus einem Gewebeverband oder Organ isoliert wurden und unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen.

Immortalisierte (unsterbliche) Zelllinien sind Zellen einer Gewebeart, wie die im Praktikum verwendeten **Knochenzellen MG-63 oder SaOS** (Osteosarkom-Zelllinien), die sich im Laufe der Kultivierung unbegrenzt vermehren können.

Bei der Zellkultivierung ist es wichtig, eine Umgebung bereitzustellen, die den *in vivo* Bedingungen möglichst nahekommt. Vor allem die Temperatur, der CO₂-Gehalt und die Verwendung geeigneter Medien spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Die Kultivierung der MG-63 in speziellen Zellkulturflaschen erfolgt bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in Inkubationsschränken.

Ist die zur Verfügung stehende Fläche der Zellkulturflaschen von den Zellen bedeckt (geschlossener, konfluent Monolayer), so wachsen in der Regel strikt adhärente Zelllinien nicht mehr weiter (Kontaktinhibition). Tumorzellen bzw. transformierte Zellen können sich darüber hinaus noch vermehren, allerdings übersteigt die Zellzahl dann meist eine Grenze, bei der das Medium zu oft gewechselt werden müsste. Ferner sinkt bei zu hoher Zelldichte die Proliferationsrate stark ab, was zum Absterben der Kultur führen kann. Deshalb ist es notwendig, die Zellen nach erreichter Maximaldichte wieder zu vereinzeln und damit die Zellzahl zu verringern.

Dies geschieht durch das „Passagieren“ der Zellen, d. h. die Zellen werden (z.B. durch einen enzymatischen Verdau mit Trypsin) vom Adhäsionssubstrat abgelöst, in Suspension gebracht und nach entsprechender Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt. Um möglichst reproduzierbare Versuchsergebnisse zu erlangen, empfiehlt es sich einen regelmäßigen Zyklus mit gleicher Zellzahl bei Aussaat einzuhalten. Zur Beurteilung des Wachstums, der Proliferationsrate und der Morphologie der Zellen wird ein Phasenkontrastmikroskop verwendet. Die Dokumentation der Morphologie erfolgt mit einer Kamera und entsprechender Software (Bsp. AxioVision).

1. Dokumentation der Morphologie



Abb. 9: Phasenkontrast-/Helllichtmikroskop

Aufgabenstellung

- (i) Dokumentation der morphologischen Unterschiede zwischen ASC als Primärzellen und den Zelllinien MG-63 & SaOS.
- (ii) Dokumentation des morphologischen Verhaltens der kultivierten MG-63 auf den zu untersuchenden behandelten und unbehandelten Oberflächen.

Materialien

- Medium für MG-63/SaOS:
 - DMEM (1x) + Gluta-MAX™-I, 4,5 g/L D-Glucose, Pyruvate (Gibco®)
 - 10% fötales Kälberserum (FKS; Biochrom)
 - 1% Gentamycin (Ratiopharm)
- PBS (Phosphate-buffered saline, ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Sigma GmbH)
- 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung (GE Health Care)

Versuchsablauf

➔ Mikroskopie

- Am PC die Software „AxioVision“ öffnen
- Am Mikroskop das Objektiv (10x oder 32x) einstellen
- Die Lampe am Mikroskop anstellen

- Die Zellkulturflasche/Probe unter das Mikroskop stellen
- Mithilfe des Grob- und des Feintriebs die Zellen scharf stellen
- Kippschalter umstellen, um mit der Software entsprechende Live-Aufnahmen zu generieren.
- Bar/Maßstab setzen und Bild abspeichern
- Kippschalter wieder umstellen und das nächste Objektiv einstellen
- Zellen im nächsten Ausschnitt mit Feintrieb scharf stellen
- Kippschalter umlegen und Live-Bild/Aufnahme des Ausschnitts erstellen und speichern

2. Zellzählung

Methoden der Zellzählung

Die Analyse der Vitalität & Zytotoxizität kann u.a. über die Bestimmung der Zellzahl geklärt werden.

Neubauer-Zählkammer

Die Zellen können manuell mit Hilfe eines Hämocytometer ausgezählt werden, einer flachen Glaskammer (Objektträger) von definierter Tiefe und mit einer graduierten Unterteilung der Bodenfläche, dem Zählfeld. Dieses wird zur mikroskopischen Auszählung partikulärer Bestandteile in einer flüssigen Probe benötigt. Die ermittelte Zahl erlaubt, unter Bezug auf das bekannte Kammervolumen und den Verdünnungsfaktor der Probe, die Bestimmung der Zellzahl pro Volumeneinheit (ml). Es gibt verschiedenste Modelle von Zählkammern, die bekanntesten sind Thoma-Zeiss-, Bürker- und Neubauerkammer.

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die 4 Eckquadrate der Neubauer-Zählkammer (siehe Abb. 5) mäanderförmig ausgezählt und daraus das arithmetische Mittel (MW) gebildet. Wichtig beim Zählen ist, dass man auf Grenzlinien liegende Zellen nicht doppelt zählt. Hierzu ist es üblich, bei der Auszählung eines Quadrates nur die Zellen auf zwei Grenzlinien (z. B. oben und links, siehe Auszählchema) mitzuzählen und die auf den anderen beiden Linien liegenden nicht. Vor der Auszählung ist es ratsam, das gesamte Linienraster mit einer geringen Vergrößerung (< 10x-Objektiv) zu betrachten und zu prüfen, ob die Zellen einigermaßen gleichmäßig über die Quadrate verteilt sind. Andernfalls sollte die Zellsuspension nochmal aufgeschüttelt und neu aufgebracht werden. Eine ungleichmäßige Verteilung erkennt man auch daran, dass sich bei der Auszählung der Eckquadrate stark schwankende Zellzahlen pro Quadrat ergeben.

Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wird die zu untersuchende Zellsuspension mit Trypanblau (Trypanblau-Lösung) versetzt. Während vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt.

Die Zellzahl wird mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$MW \times VF \times V \times 10^4 = \text{Gesamtzahl der Zellen im Gesamtvolumen}$$

- MW arithmetisches Mittel der gezählten Zellen der vier Eckquadrate
VF Verdünnungsfaktor (falls relevant),
Bsp. 1:10-Verdünnung der Zellsuspension für die Zellzählung entspricht VF = 10
V Gesamtvolumen der Zellsuspension
 10^4 Kammerfaktor für die Neubauer-Zählkammer.
Durch die Fläche eines Eckquadrates von 1 mm² und einer Kammertiefe von 0,1 mm mit einem Volumen von 0,1 µl kann dadurch die ermittelte Zellzahl auf einen Milliliter bezogen werden

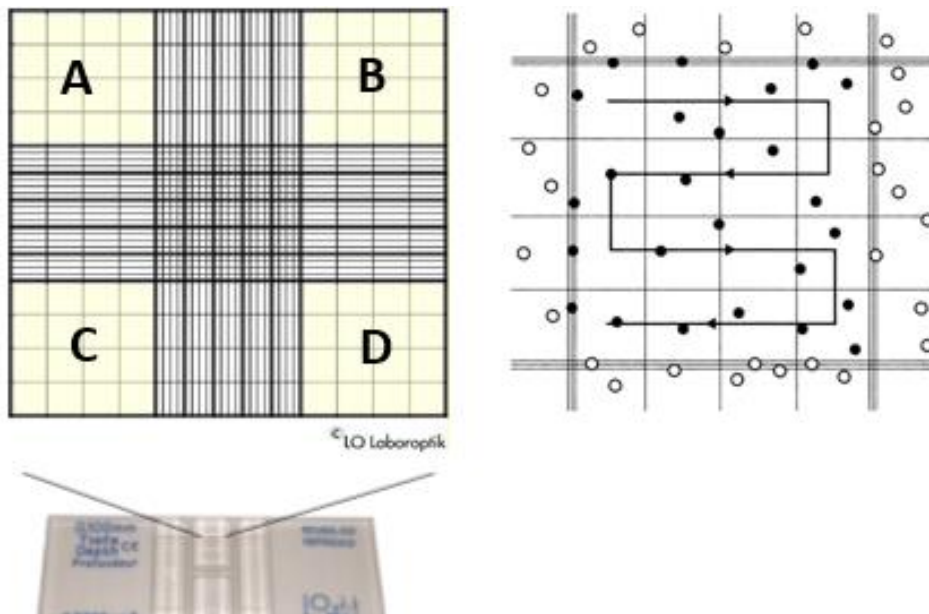


Abb. 10: Aufbau der Neubauer-Zählkammer (links) und das Auszählschema (rechts).

CASY® Cell Counter

Der CASY® Cell Counter (Schärfer System GmbH, Reutlingen, D, Abb. 6) ist ein semiautomatischer Zellzähler, welcher nach dem Widerstandsmessprinzip arbeitet. Bei jeder Messung werden aus dem Casy®cup (verschließbarer Probenbecher) mit isotoner



Abb. 11: Casy Cell Counter

Elektrolytlösungs-Suspension (Zellsuspension in CASY®ton) 400 µl in eine Kapillare eingesaugt. Über zwei Platinelektroden ist eine elektrische Spannung angelegt und sobald eine Zelle in die Messkapillare eindringt, entsteht durch eine Änderung des elektrischen Widerstands ein elektrischer Puls. Diese Widerstandsänderung kann entstehen, da eine Zelle wie ein Isolator in einer Säule mit Elektrolytlösung wirkt. Diese Säule

wird durch die Messkapillare begrenzt und stellt einen definierten Widerstand dar. Werden mehrere Zellen in die Messkapillare eingesaugt, so entstehen entsprechend mehrere Pulse. Die Anzahl der Pulse stellt dann die Zellzahl in der Probe dar. Der CASY® Cell Counter kann auch die Größe der Pulse unterscheiden und somit eine Größenverteilung darstellen. Die größeren Pulse stellen die vitalen Zellen dar, die kleineren Pulse Zelldebris oder tote Zellen. Avitale Zellen verursachen einen kleineren Puls, da ihre Zellmembran durchgängig ist. Nach 3 Messungen wird ein Mittelwert berechnet, wobei die Zellzahl pro ml in der eigentlichen Zellsuspension zurück zu rechnen ist.

NucleoCounter®

Der NucleoCounter® (ChemoMetec AS©, Denmark, Abb. 12) ist ein hochpräzises bildgebendes Zytometer und liefert eine All-In-One Lösung zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.

Beim manuellen Zählen resultiert die subjektive Definition einer Zelle in einem verzerrten Ergebnis. Der NucleoCounter® wurde entwickelt um die menschlichen Einflüsse beim Zählen zu minimieren. Mit der Via1-Cassette™ werden alle Fehler die beim Pipettieren und Färben entstehen können umgangen. Die Via1-Cassette fungiert direkt als Pipette und die immobilisierten Fluoreszenzfarbstoffe Acridine Orange und DAPI färben automatisiert die lebenden und toten Zellpopulationen. Die Via1-Cassette™ ist Volumen-kalibriert wodurch eine hohe Präzision bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Viabilität ermöglicht wird. Die gesamte Methode dauert weniger als 50 Sekunden. Der NucleoCounter zählt nur kernhaltige Zellen. Durch Zugabe eines Lysepuffers werden Zellen und andere von Membranen eingeschlossene Partikel lysiert, so dass die freien Nuclei in Suspension kommen und anschließend zur Färbung und Zählung mit DAPI und dem NucleoCounter® vorliegen.

Der NucleoCounter® erfordert eine einfache 3-stufige Prozedur: Laden Sie die Kassette mit Zellsuspension, legen Sie die Kassette in den NucleoCounter® und drücken Sie „RUN“ (Abb. 6). Die Ergebnisse werden automatisch in der NucleoView Software gespeichert und sind dort jederzeit zugänglich.



Abb. 12: 3-stufige Prozedur des NucleoCounters

Aufgabenstellung

Vergleichende Analyse von Vitalität und Apoptose der Zelllinie MG-63 bezüglich (i) unterschiedliche Behandlung der Oberflächen und (ii) verschiedene Zellzählmethoden

Materialien

- Phasenkontrast-Mikroskop (Carl Zeiss), Cell Counter Casy® Model DT, NucleoCounter®
- Trypanblau-Lösung: 0,5 % (w/v) Trypanblau in PBS
- Neubauerkammer
- Casy®ton
- Via1-Kassette

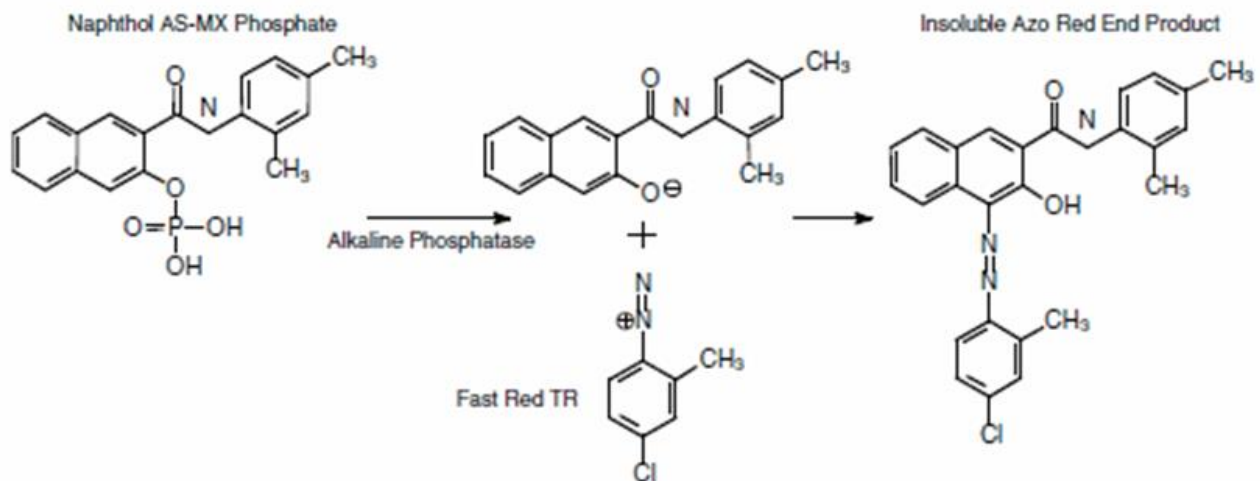
Versuchsablauf

3. Alkalische Phosphatase (ALP)– Aktivität

Das Enzym alkalische Phosphatase ist in vielen Körpergeweben anzutreffen. Die höchsten Werte sind unter anderem in den Osteoblasten zu finden. Bei der Knochenphosphatase (auch Ostase oder Knochen-ALP genannt) handelt es sich um das Isoenzym, welches die höchste Knochenspezifität aufweist und Marker für den Knochenaufbau (Osteoblasten-Aktivität) ist.

Die Funktion der ALP bis heute noch nicht vollständig erforscht, aber man geht davon aus, dass die Abspaltung von Phosphatresten eine Rolle bei der Abscheidung von Hydroxylapatit spielt. Innerhalb des osteoblastären Differenzierungszyklus wird dieses Enzym in der frühen Phase hoch exprimiert und fällt zu späteren Phasen hin ab. Aufgrund dieser Beobachtungen kann die ALP als früher Differenzierungsparameter angesehen werden.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird der alkalischen Phosphatase organische Phosphatverbindungen (Naphthol-AS-MX-Phosphat (4-Chlor-2-Methylbenzenediazonium / 3-Hydroxy-2-Naphthoic Acid 2,4-Dimethylanilide Phosphat)) als Substrat angeboten. Die ALP spaltet Phosphat ab und die freigesetzte Verbindung reagiert mit dem FastRed-Farbstoff zu einem farbigen Endprodukt. Das Endprodukt ist ein unlöslicher intensiver roter Farbstoff (Azofarbstoff).



Aufgabenstellung

Dokumentation (Mikroskop) der alkalischen Phosphatase Aktivität:

- (i) In MG-63 Osteoblasten auf den unterschiedlich behandelten Oberflächen

- (ii) Vergleichend zu SaOS-Zellen und den ASC
- (iii) Einfluss der osteogenen Stimulation (osteogenes Differenzierungsmedium) auf ASC

Materialien

- PBS (Phosphate-buffered saline, ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Sigma GmbH)
- Paraformaldehyd (PFA)
- AMPED (ätzend!) (60 mM)
- 0,1 % FastRed
- 0,1 % Naphtol – AS-MX-phosphat
- o Osteogenes Differenzierungsmedium (DMEM mit 10 % FCS und 1 % Gentamycin, sowie osteogene Zusätze β -Glycerophosphat (1M), Ascorbinsäure (10 μM), Vitamin D3 (60 μM), Dexamethason (100 μM))

Versuchsablauf

Gruppe C – Konfokale Mikroskopie

Zur Darstellung und Analyse der Expression sowie der räumlichen Organisation von zellulären Strukturen stellt das konfokale Laser-Scanning Mikroskop (LSM) ein geeignetes Instrument dar. Bei der Immunfluoreszenz können mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper gezielt zelluläre Strukturen durch Licht bestimmter Wellenlänge (Laser) angeregt und damit identifiziert werden. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper binden spezifisch an entsprechende Zielstrukturen, sog. Epitope, die als charakteristische Regionen auf der Oberfläche eines Antigens definiert sind. Für die Lokalisation von zellulären Proteinen macht man sich die Antikörper-Antigen-Reaktion zu Nutze und setzt mono- oder polyklonale Antikörper ein. Hierbei kann das Fluorochrom direkt an den Primärantikörper (direkte Immunfluoreszenz) oder aber an einen Sekundärantikörper (indirekte Immunfluoreszenz) gekoppelt sein, welcher wiederum seinerseits über eine Antikörper-Antigen-Reaktion den unmarkierten Primärantikörper erkennt. Um einen Zustand zu einem bestimmten Zeitpunkt darstellen zu können, werden die Zellen fixiert, wobei die Antigenität der Proteine bestmöglich erhalten bleiben muss. Sollen Fixationsartefakte ausgeschlossen bzw. Strukturen im zeitlichen Verlauf untersucht werden, müssen Zellen im lebenden Zustand beobachtet werden.

Mit dem Laser Scanning System 780 (Carl Zeiss) wird die Expression und Verteilung von zellulären Strukturen untersucht. Bei diesem System wird über das Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 die inverse Mikroskopie integriert. Ausgestattet ist das Gerät mit einem hochempfindlichen 32 Kanal-GaAsP Detektor, zwei PMT's und 7 Laserlinien (UV-VIS). Zusätzlich ist noch ein externer Argon Laser (488 nm) angeschlossen. Mit der innovativen ZEN2011 (black edition) Software von Carl Zeiss werden Bilder mit erhöhter Scangeschwindigkeit (bis zu 8 Bilder/s) und verbesserter Bildqualität (bis 6144 x 6144 Pixel) abgebildet. Das verwendete Objektiv ist ein 63x Plan Aplanachromat (1,40 oil/DIC M27/AA 0,19 mm/0,17 mm Deckglas-Dicke).

1. Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren und Organisation des Aktinzytoskeletts

Die initiale Reaktion einer Zelle ist die Zelladhäsion. Zellen können ihre Umgebung sensitiv erfassen und interagieren über Adhäsionsrezeptoren in der Plasmamembran, wie Integrine, mit der extrazellulären Matrix. Integrine als transmembrane Rezeptoren sind intrazellulär über lokalisierte Adapterproteine, die den Fokalkontakt bilden, mit dem Aktinzytoskelett verbunden.

Aktin ist die Hauptkomponente des Zytoskeletts. Die Aktinfilamente haben entscheidende Funktionen in vielen zellulären Prozessen: Aufrechterhaltung von Zell-Zellverbindungen und der Zellform – Stabilität, Zellausbreitung, Zellmotilität, Zellteilung und der Signaltransduktion.

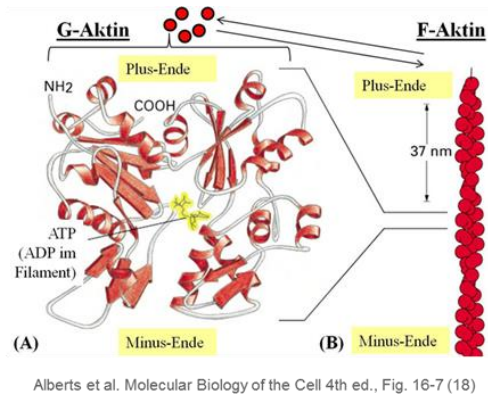


Abb. 13: Aktin. Quelle: Alberts et al. Molecular Biology of the cell 4th ed., Fig. 16-7(18)

Aufgabenstellung

Konfokal mikroskopische Studie des Einflusses von Oberflächenbehandlungen auf die Expression von Adhäsionsrezeptoren und die Organisation des Aktinzytoskeletts der MG-63 Zellen im Vergleich zum unbehandelten Deckglas.

Materialien

- PBS (unsteril)
- Paraformaldehyd (PFA)
- Triton X100
- pAK (b1-Integrin), sAK fluoreszenzmarkiert (Alexa Fluor 488)
- Aktin-Zytoskelett-Färbung: Alexa Fluor® 546 Phalloidin (#A22283, Molecular Probes™)
- Kernfärbung: Hoechst H33342 (1 mg/ml, AppliChem)
- Einbettmedium
- konfokales Mikroskop LSM780 (Carl Zeiss), Dioden-Laser: (i) Wellenlänge 405 nm für Hoechst, (ii) Wellenlänge 561 für Alexa Fluor® 546 Phalloidin) (iii) Ar-Laser: Wellenlänge 488 für Alexa Fluor® 488)

Versuchsablauf

2. Live Cell Imaging - Mitochondrien

Um Zellen auf opaken Biomaterialien im Zeitverlauf beobachten zu können, ist es nötig die lebenden Zellen mit einem Farbstoff zu markieren. Für die Visualisierung einzelner Proteine ist oft die Transfektion mit Plasmiden (transiente Transfektion) die Methode der Wahl. Dabei wird Fremd-DNA (kodierte Protein gekoppelt mit Farbstoff, z.B. gfp) in die Wirtszelle eingebracht. Der Nachteil besteht oftmals in der geringen Transfektionseffizienz, sodass nur ein Bruchteil der Zellen transfiziert sind. Diese müssen dann selektiert werden um eine „reine“ Population zu erhalten.

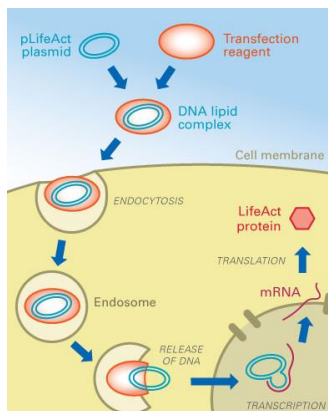


Abb. 14: Transfektion mit dem LifeAct-Plasmid. Photo courtesy of of ibidi GmbH, ibidi.com Quelle: <http://www.socmucimm.org/introduction-transfection/>

Soll die gesamte Zellpopulation sichtbar gemacht werden, empfiehlt es sich lipophile Membranfarbstoffe oder Farbstoffgemische zu verwenden, die in bestimmten Kompartimenten der Zelle akkumulieren. Letzteres soll in diesem Praktikum angewandt werden. So sollen die Mitochondrien der MG-63 Osteoblasten gefärbt und im Zeitverlauf beobachtet werden

Aufgabenstellung

Der Einfluss von Oberflächenbehandlungen auf die Mitochondrien über die Zeit in den MG-63 Zellen

Materialien

- PBS (steril)
- Lebendzellfarbstoff Mito RedCMXRos, Thermo Fischer
- konfokales Mikroskop LSM780 (Carl Zeiss), incl. Wärmehaube und CO₂-Zufuhr, Dioden-Laser: (i) Wellenlänge 561 für Mito RedCMXRos, Thermo Fischer)

Versuchsablauf

3. Korrelative Mikroskopie

Die Untersuchung von Zellen mit verschiedenen mikroskopischen Verfahren ist im Bereich der Biomaterialien besonders interessant. So können die Strukturen und Profile der Materialien besonders gut im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Die zelluläre Lokalisation von Proteinen kann mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Allerdings erfordert es ausgefeilte Techniken, um beide Methoden kombinieren zu können. Die Mikroskopie der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgt i.d.R. eingebettet unter einem Deckglas oder in flüssigem Medium. Für die Elektronenmikroskopie müssen die Präparate entwässert und leitfähig vorliegen. Um die observierten Regionen in beiden Mikroskopen wiederzufinden müssen die Proben anhand von Referenzpunkten erkannt und eine Kalibrierung durchgeführt werden. Abschließend werden die am Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop erstellten Aufnahmen korreliert und überlagert. Dies ist besonders nützlich für die Bereiche der Zellbiologie, um die Interaktion zwischen Zellen und Material zu studieren.

Aufgabenstellung

Vergleichende Analyse des Einflusses von Oberflächenbehandlungen auf die Organisation des Aktinzytoskelett der MG-63 Zellen

Materialien

- PBS (unsteril)
- Paraformaldehyd (PFA)
- Triton X100
- Aktin-Zytoskelett-Färbung: Alexa Fluor® 546 Phalloidin (#A22283, Molecular Probes™)
- Kernfärbung: Hoechst H33342 (1 mg/ml, AppliChem)
- aufrechtes Mikroskop AxioScopeA1 (Carl Zeiss), (i) Wellenlänge 405 nm für Hoechst, (ii) Wellenlänge 561 für Alexa Fluor® 546 Phalloidin)

Versuchsablauf

Gruppe D - Durchflusszytometrie

Im Gegensatz zum Fluoreszenzmikroskop erlaubt ein Durchflusszytometer die gleichzeitige Messung von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen an einzelnen Zellen.

Mit der Durchflusszytometrie werden in kurzer Zeit simultan mehrere zellbiologische Parameter einer Zellpopulation qualitativ und quantitativ erfasst. Unter Verwendung optischer und elektronischer Sensormethoden des Durchflusszytometers (Fluorescence-Activated Cell Sorter or Scanner, FACS) werden verschiedene zytologische und funktionelle Eigenschaften aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension erkannt. Ein Durchflusszytometer erlaubt damit die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie zwei bis drei verschiedener Fluoreszenzfarben für mehrere tausend Zellen in wenigen Sekunden. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass eine Zellsuspension durch eine Kapillare in einen Messkopf gesaugt wird. Dabei werden die Zellen durch die umgebende Trägerflüssigkeit (isotone Salzlösung) stark beschleunigt, es kommt zur Trennung von kleineren Zellaggregaten und zur Aufreihung der Zellen (hydrodynamische Fokussierung). Anschließend passieren die einzelnen Zellen für den Bruchteil einer Sekunde einen fokussierten Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Spiegel- und Filtersysteme auf die verschiedenen Fotoverstärker geleitet wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle (Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter (FSC)) und mit ihrer Granularität (Seitwärtsstreulicht, Sideward Scatter (SSC)). Gleichzeitig können vorhandene Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden.

Über eine angeschlossene Datenanalyse werden erhobene Daten in einfachen & klaren Form ausgegeben.

Das FACSCalibur (BD Biosciences) ist mit einem Argon Ionen Laser (Exzitation: $\lambda=488$ nm) und einem Diodenlaser (Exzitation: $\lambda=635$ nm) ausgestattet. Für die Akquise und Analyse wird die Software CellQuest Pro Version 4.0.1. verwendet. Die Anzahl der gemessenen Zellen pro Kanal können linear oder logarithmisch verstärkt in einem Dot Plot oder Histogramm dargestellt werden.

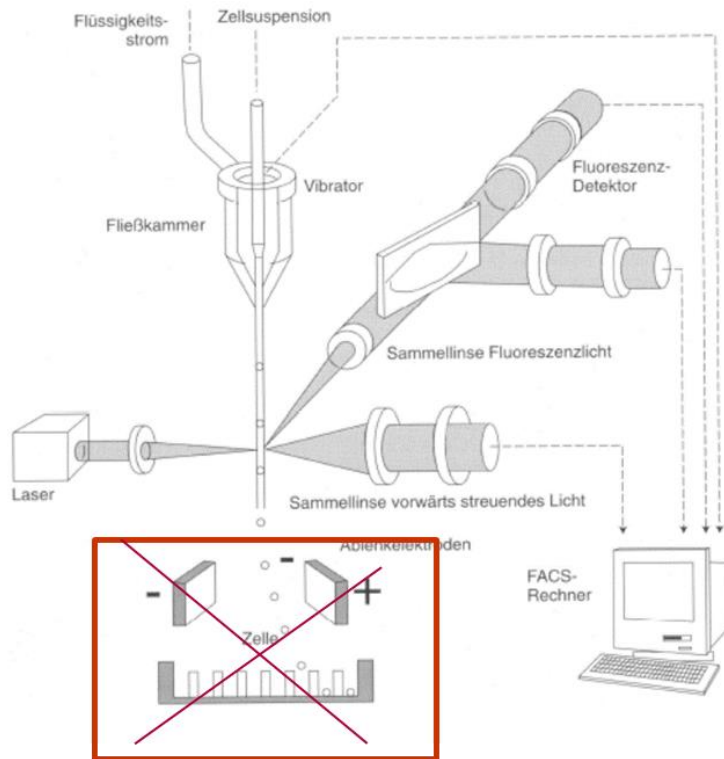


Abb. 15: FACS -Fluorescence Activated Cell Scanning – reine Analyse von Molekülen in Suspension

Bei der Immunfluoreszenz können mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper gezielt zelluläre Strukturen durch Licht bestimmter Wellenlänge (Laser) angeregt und damit identifiziert werden. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper binden spezifisch an entsprechende Zielstrukturen, sog. Epitope, die als charakteristische Regionen auf der Oberfläche eines Antigens definiert sind. Für die Lokalisation von zellulären Proteinen macht man sich die Antikörper-Antigen-Reaktion zu Nutze und setzt mono- oder polyklonale Antikörper ein. Hierbei kann das Fluorochrom direkt an den Primärantikörper (direkte Immunfluoreszenz) oder aber an einen Sekundärantikörper (indirekte Immunfluoreszenz) gekoppelt sein, welcher wiederum seinerseits über eine Antikörper-Antigen-Reaktion den unmarkierten Primärantikörper erkennt.

1. Analyse der Expression von Adhäsionsrezeptoren

Die initiale Reaktion einer Zelle ist die Zelladhäsion. Zellen können ihre Umgebung sensitiv erfassen und interagieren über Adhäsionsrezeptoren in der Plasmamembran, wie Integrine, mit der extrazellulären Matrix. Integrine als transmembrane Rezeptoren besitzen eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion der Zelle.

Integrine sind sogenannte Heterodimere, d. h. sie bestehen aus zwei unterschiedlichen Glykoproteinketten, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Diese beiden Ketten werden als α - bzw. β -Untereinheit bezeichnet (18 α -Untereinheiten & 8 β -Untereinheiten). Durch unterschiedliche Kombinationen sind so insgesamt 24 Integrinformen möglich. Der Teil des Integrins, der extrazellulär liegt, trägt Bindungsstellen für Adhäsionsmoleküle (z. B. $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin ist Fibronektin-Rezeptor, $\alpha 2 \beta 1$ -Integrin ist Kollagen-Rezeptor). Der intrazelluläre Teil der Integrinrezeptoren ist über den fokalen Adhäsionskomplex (FAK (fokale Adhäsionskinase), Vinkulin) mit dem Aktinzytoskelett verbunden.

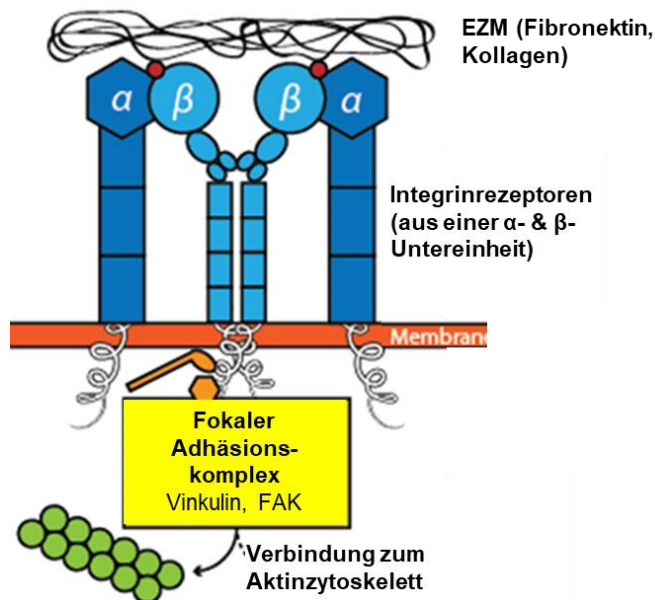


Abb. 16: Integrine: Verbindung extrazellulär zur extrazellulären Matrix (EZM) und intrazellulär über den fokalen Adhäsionskomplex zum Aktin. Abbildung nach www.cytoskeleton.com/pdf-storage/news/integrin-mediated-redox-control-of-beta-actin.pdf.

Aufgabenstellung

Durchflusszytometrische Studie des Einflusses von Oberflächenbehandlungen auf die Expression von Adhäsionsrezeptoren der MG-63 Zellen im Vergleich zum unbehandelten TCPS.

Materialien

- PBS (unsteril), FACS-PBS
- pAK ($\beta 1$ -Integrin), sAK fluoreszenzmarkiert (FITC)
- Cellfix
- FACSCalibur (BD), Argon Ionen Laser (Exzitation: $\lambda=488$ nm)

Versuchsablauf

2. Analyse der Zellzyklusphasen mit dem FACSCalibur

Der Zellzyklus besteht im Regelfall aus Interphase und Mitose (Zellteilung). Die Interphase: unterteilt sich in G1-Phase (G-gap, einfacher Chromosomensatz), Synthesephase (S-Phase) und G2-Phase (G-gap, doppelter Chromosomensatz).

A

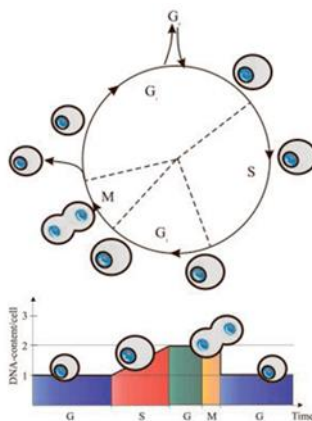


Abb. 17: Zellzyklus, www.chemometec.com

Der relative DNA-Gehalt der Zellkerne in den Zellzyklusphasen kann über Fluoreszenzfarbstoffe nachgewiesen werden. Die Fluorochrome binden an bestimmte Bestandteile der Zellen (Bsp. Propidiumjodid, PI, interkaliert in Doppelhelix der DNA, rot-fluoreszierend). Die Intensität des Lichtsignals von PI, das durch den Laser induziert wird, erlaubt bspw. im Rahmen der Zellzyklusanalyse die Unterscheidung zwischen Zellen mit einfachem Chromosomensatz (G1-Phase) und Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (G2-Phase). Des Weiteren gibt der Sub-G1-Peak Aufschluss auf apoptotische Zellen.

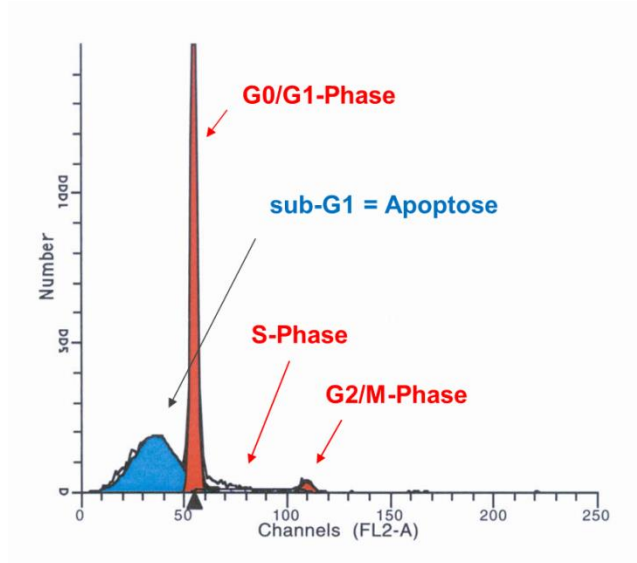


Abb.18: Relativer DNA-Gehalt; Histogramm Zellzyklusanalyse: durchflusszytometrische Bestimmung proliferativer und apoptotischer Zellen.

Aufgabenstellung

Untersuchung der Zellzyklusphasen (proliferative Phase (M/G2) und der Apoptose (Sub-G1)) der Zelllinie MG-63 auf den unterschiedlich beschichteten Proben im Vergleich zur Kontrolle (reines Deckglas).

Materialien

- Trypsin
- PBS (unsteril) (+Ca/Mg), (ohne)
- Komplettmedium (DMEM++)
- Ethanol (70%)

- RNase
- Propidiumjodid-Lösung (PI, 50 µg/ml)
- FACS-PBS
- FACSCalibur (BD), Argon Ionen Laser (Exzitation: $\lambda=488$ nm)
- Auswertung der Zellzyklusphasen mit der Software FlowJo

Versuchsablauf
