

# Screening isolierter Mitochondrien auf arzneimittelinduzierte mitochondriale Dysfunktion mit MitoXpress Xtra

## Autoren

Ryan McGarrigle  
Conn Carey  
James Hynes  
Agilent Technologies, Inc.

## Zusammenfassung

Mitochondrien regulieren viele Funktionen im Zusammenhang mit dem Leben und Sterben von Zellen. Daher spielen sie eine zentrale Rolle bei der Entstehung vieler Erkrankungen. Eine Störung der Mitochondrienfunktion trägt außerdem wesentlich zu arzneimittelinduzierter Toxizität bei und ist für die Pharmaindustrie daher von erheblicher Relevanz. Bisher sind Messungen des Sauerstoffverbrauchs die bevorzugte Methode zur Beurteilung der Mitochondrienfunktion. Diese Messungen sind zwar informativ, aber komplex und weisen einen niedrigen Durchsatz auf, da sie auf einem herkömmlichen polarographischen Ansatz mit einer Clark-Elektrode basieren. Daher haben sie begrenzte Anwendbarkeit, beispielsweise im Zusammenhang mit dem Wirkstoff-Screening. In diesem Artikel beschreiben wir, wie dieses Problem mit der Agilent MitoXpress Xtra Sauerstoffverbrauchsanalyse gelöst wird. MitoXpress Xtra ermöglicht einen Fluoreszenz-basierten Ansatz mit hohem Durchsatz zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs im 96- oder 384-Wellplate-Format. In diesem Artikel werden wichtige Optimierungsparameter und Probanden beschrieben und es wird gezeigt, wie Verbindungsbibliotheken gescreent und Dosis-Wirkungs-Analysen durchgeführt werden können.

## Einführung

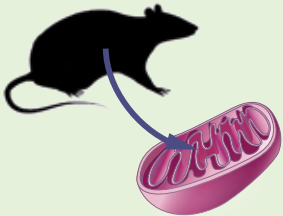
Störungen der Mitochondrienfunktion spielen bei der Entstehung zahlreicher Erkrankungszustände eine Rolle und wurden im Zusammenhang mit arzneimittelinduzierter Toxizität als wichtiger Mechanismus erkannt [1-6]. Bisher stand die Sauerstoffverbrauchsanalyse bei der Beurteilung der mitochondrialen Funktion an erster Stelle, weil dabei die Aktivität der Elektronentransportkette (ETC) direkt gemessen werden kann. Bei gekoppelten Mitochondrien liefert diese Messung außerdem Daten über die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). Der Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien wird herkömmlicherweise mit einer polarographischen Niedrigdurchsatzmethode bestimmt. Dieser Ansatz ist jedoch umständlich und ungeeignet, wenn ein höherer Durchsatz erforderlich ist. Daher ist es damit nicht möglich, mehrere Testbedingungen gleichzeitig zu analysieren, ganz gleich, ob es sich dabei um das Screening von Verbindungsbibliotheken, den Zusammenhang von Dosis und Wirkung oder den Wirkmechanismus geht. In diesem Artikel beschreiben wir, wie die Agilent MitoXpress Xtra Sauerstoffverbrauchsanalyse Informationen über die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs von Mitochondrien liefert und dank eines Fluoreszenz-basierten Ansatzes gleichzeitig eine Hochdurchsatzanalyse mit einem Plattenleser erlaubt. Der Durchsatz und die Tatsache, dass die Messvolumen niedriger sind als bei der herkömmlichen polarographischen Analyse, bedeuten, dass mit einer einzigen Mitochondrienpräparation sehr viel mehr Daten gesammelt werden können.

Ausschlaggebend für diese aussagekräftigen Messungen ist der MitoXpress Xtra Sensor. Das Fluoreszenzsignal wird von molekularem Sauerstoff gequencht, daher werden Verringerungen der Konzentration des gelösten Sauerstoffs infolge der ETC-Aktivität als Erhöhung des Signals bei der MitoXpress Xtra Analyse erkannt. Jedes Test-Well wird mit einer Schicht Mineralöl versiegelt, um die Diffusion von Sauerstoff aus der Umgebungsluft in die Probe zu limitieren. Die Mikroplatte wird in einem Fluoreszenz-Plattenleser kinetisch gemessen, was eine praktische Hochdurchsatz-Messung der Aktivität der Elektronentransportkette ermöglicht. Nimmt die Geschwindigkeit der Signaländerung relativ zu einer unbehandelten Kontrolle ab, kann auf eine Inhibition der ETC-Aktivität geschlossen werden. Eine Signalerhöhung verweist auf eine verstärkte Atmung, entweder durch eine Zunahme der ETC-Aktivität oder durch die Entkopplung der Elektronentransportkette von der OXPHOS. Genau wie bei herkömmlichen polarographischen Ansätzen ermöglichen Substrate, die für bestimmte ETC-Komplexe spezifisch sind, verschiedene mechanistische Rückschlüsse. Mit dem Mikroplattenansatz können jedoch alle relevanten Bedingungen parallel gemessen werden. Die Konfiguration von Analysen ist sehr viel einfacher, und die Auswertung der Daten wird durch den allmählichen Abbau der Mitochondrienpräparation nicht erschwert.

Im Folgenden fassen wir die Durchführung der Messung zusammen. Im Mittelpunkt stehen dabei wichtige Optimierungsparameter und die Anwendung solcher Messungen im Rahmen des Wirkstoff-Screenings und der Dosis-Wirkungs-Analyse.

### Vor der Analyse

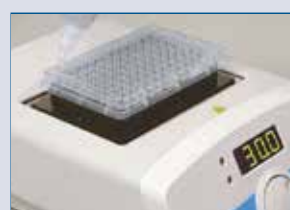
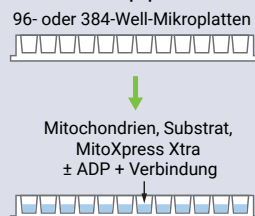
1. Glutamat/Malat, Succinat und ADP-Stammlösungen vorbereiten
2. FCCP, Rotenon und Antimycin A vorbereiten
3. Mitochondrien aus Rattenleber isolieren



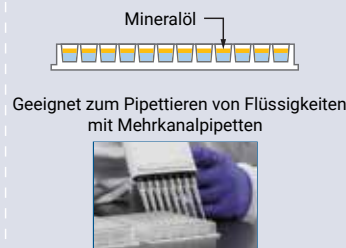
### Arbeitsablauf bei der Analyse



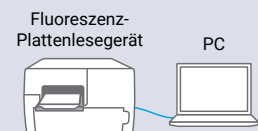
#### Mitochondrien und Substrate in Platte pipettieren



#### MitoXpress + Mineralöl zugeben



#### Messen + analysieren



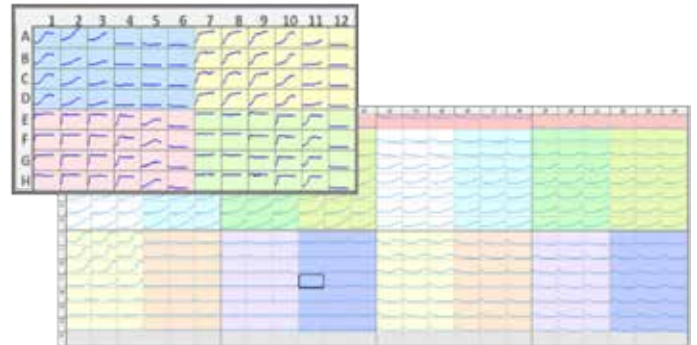
## Optimierung des Assays

### Optimierung der mitochondrialen Proteinkonzentration

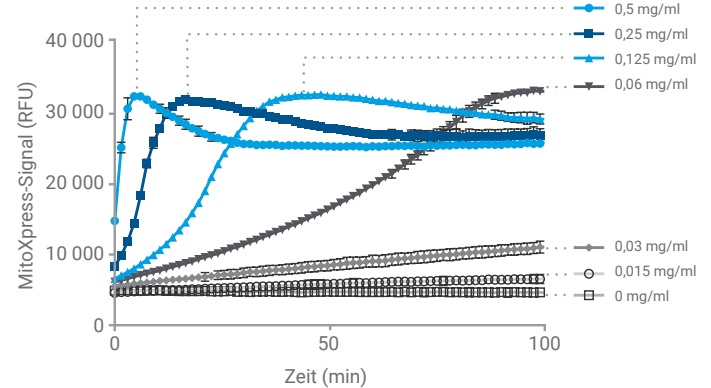
Der Sauerstoffverbrauch pro mg Mitochondriales Protein ist gewebespezifisch und kann von dem gewählten Isolierungsverfahren abhängen. Der Sauerstoffverbrauch wird außerdem von den bereitgestellten Atmungssubstraten und dem ADP-Angebot beeinflusst. Beim Wirkstoff-Screening müssen die Proteinkonzentrationen optimiert werden, um zuverlässige Analyseergebnisse zu erhalten. Das bedeutet, dass gegenüber unbehandelten Proben deutlich unterschiedliche Signale und damit Signaländerungen, d. h. Zu- und Abnahmen, zuverlässig beobachtet werden können. Im Gegensatz zu herkömmlichen polarographischen Analysen vereinfacht der hohe Durchsatz, der durch das Mikroplattenformat (96 und 384 Wells) ermöglicht wird, eine solche Optimierung erheblich.

In Abbildung 1 sind Probendaten dargestellt. Die verschiedenen Proteinverdünnungen werden mit Hilfe relevanter Atmungssubstrate mit und ohne ADP beurteilt. Je höher die Konzentration der mitochondrialen Proteine ist, desto schneller wird der Sauerstoff verbraucht. Dies ist durch den schnelleren Anstieg des Sondensignals in Echtzeit messbar. In Abbildung 1A ist dargestellt, wie der hohe Durchsatz mit der Mikroplatte die Messung verschiedener Bedingungen auf einer einzigen Platte erlaubt.

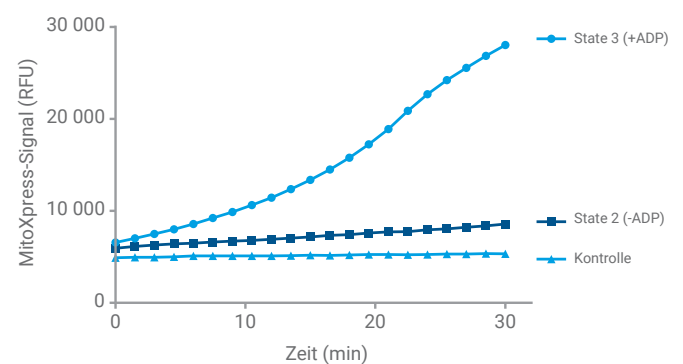
A



B



C



**Abb. 1:** (A) Beispiele für Plattenlayouts und die sich ergebenden Signalkurven für 96- und 384-Well-Formate. Bei dem Beispiel für ein 96-Well-Format wurden in jeder Gruppe Proteintitrationen mit den Substraten Glutamat/Malat (blau), Succinat (gelb), Glutamat/Malat + ADP (rosa) und Succinat + ADP (grün) durchgeführt. (B) Beispiele für Signalkurven bei Proteintitration mit ADP-stimulierter Atmung mit Succinat (von 0 bis 0,5 mg/ml). (C) Wirkung der Zugabe von ADP auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch.

Typische optimierte Proteinkonzentrationen sind:

- Basalatmung Glutamat/Malat: 1 mg/ml
- ADP-stimulierte Atmung mit Glutamat/Malat: 0,125 mg/ml
- Basalatmung mit Succinat: 0,5 mg/ml
- ADP-stimulierte Atmung mit Succinat: 0,25 mg/ml

In Abbildung 1B ist ein Beispiel für Signaländerungen im Rahmen der Proteinoptimierung für die ADP-stimulierte Atmung mit Succinat (Wells E7-H12) dargestellt. Bei einer Konzentration von 0,25 mg/ml wird eine schnelle, jedoch trotzdem messbare Signaländerung beobachtet. Diese Konzentration eignet sich daher ideal für die Untersuchung von Verbindungen, bei denen vermutet wird, dass sie die Komplexe II bis IV der Atmungskette hemmen.

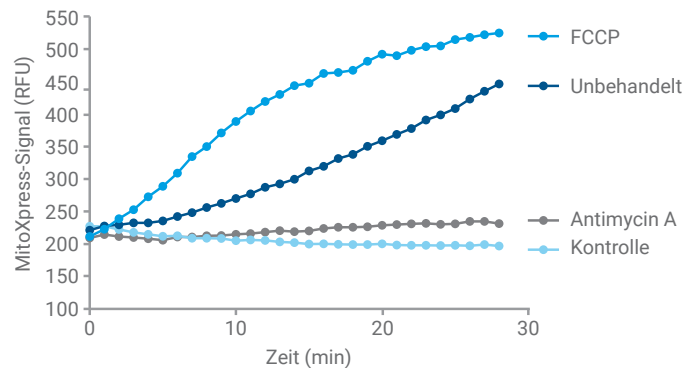
Eine solche Optimierung vereinfacht auch die Beurteilung der mitochondrialen Kopplung, die wiederum Rückschlüsse auf die Qualität des Mitochondrienpräparats zulässt. Zur Ermittlung des Kopplungsgrades wird das Verhältnis der ADP-stimulierten Raten (Zustand 3) zu den Raten nur mit Substrat (Zustand 2) bestimmt. Je höher dieser RCR-Wert (Respiratory Control Ratio) ist, desto besser ist auch die Kopplung der Elektronentransportkette an die ATP-Synthase. Niedrige Werte verweisen dagegen auf eine Beschädigung der Mitochondrienmembran. Die Probanden in Abbildung 1C veranschaulichen die Erhöhung der Aktivität durch Zugabe von ADP.

### Messung von Störungen der Mitochondrienfunktion

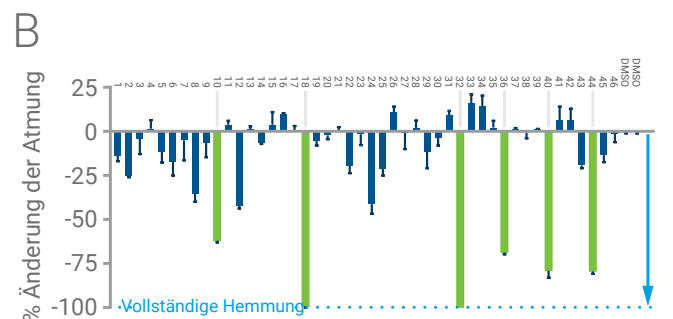
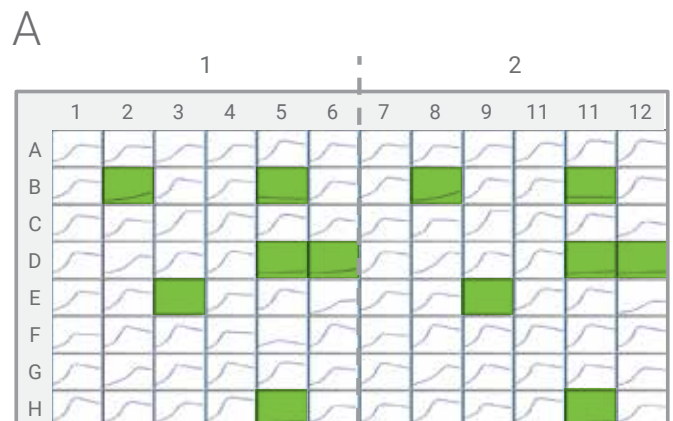
In Abbildung 2 sind typische Daten bei Mitochondrien mit Funktionsstörung dargestellt. Antimycin A blockiert den Komplex III der Elektronentransportkette und hemmt so den Sauerstoffverbrauch. Der klassische Entkoppler FCCP baut dagegen das mitochondriale Membranpotential ab, was den Sauerstoffverbrauch erhöht.

Im Rahmen des Wirkstoff-Screenings werden Messungen gewöhnlich im Zustand 2 (kein ADP) durchgeführt, um Entkoppler zu identifizieren. Messungen im Zustand 3 (mit ADP) dienen dagegen dem Screening auf Inhibitoren. Das Mikroplattenformat, ob im mit 96 Wells oder mit 384 Wells, ermöglicht sehr hohe Durchsätze. Dadurch lassen sich erhebliche Verbesserungen gegenüber herkömmlichen polarographischen Methoden mit niedrigem Durchsatz erzielen.

In Abbildung 3 ist dargestellt, wie 46 Verbindungen auf einer 96-Wellplate in Doppelbestimmungen gescreent werden können. Die Verbindungen werden dabei in parallele Wells jeweils in beide Plattenhälften gegeben. Eine signifikante Abnahme der Atmung ist leicht erkennbar (grün hervorgehoben).



**Abb. 2:** Beispiele für typische Daten der Agilent MitoXpress Xtra Sauerstoffverbrauchsanalyse, die Hinweise auf eine Störung der Mitochondrienfunktion liefern.

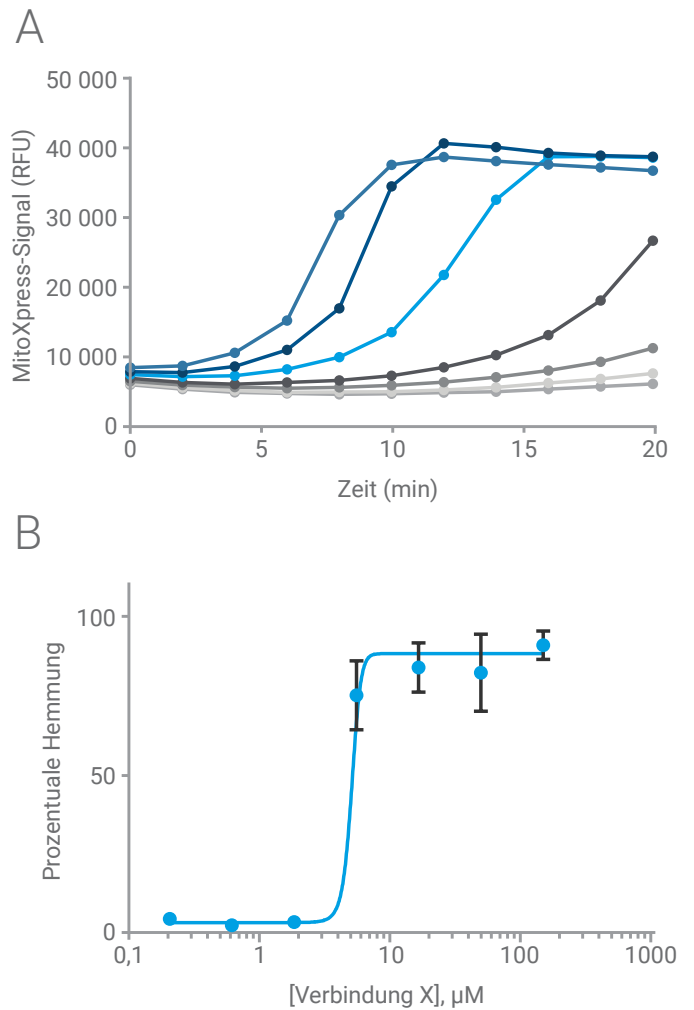


**Abb. 3:** Das Plattenlayout unter A erlaubt das Screening von 46 Verbindungen in Duplikaten. Auf der Platte sind auch zwei Vehikel-Kontrollen(DMSO) enthalten. Die Daten sind als Änderung der prozentualen Hemmung dargestellt (B). Verbindungen, die mit einer signifikanten Hemmung verbunden sind, sind hervorgehoben und die Daten wurden für die Dosis-Wirkungs-Analyse umgerechnet (grün hervorgehoben).

Unkomplizierte Dosis-Wirkungs-Analysen sind auch mit mehreren Verbindungen auf einer einzigen Platte möglich und die Daten können einfach in  $IC_{50}/UC_{50}$ -Werte umgerechnet werden. In Abbildung 4B sind die Geschwindigkeitsdaten aus den Signalkurven gegen die bei der Dosis-Wirkungs-Analyse verwendeten Konzentrationen aufgetragen. Die Ergebnisse können anschließend mit der Referenzliteratur oder internen Daten verglichen werden.

### Erhöhung des Durchsatzes

Auf MitoXpress Xtra basierende Messungen an isolierten Mitochondrien sind mit 384-Wellplate-Formaten kompatibel, was eine weitere Steigerung des Durchsatzes ermöglicht. Weitere Durchsatzsteigerungen lassen sich durch entsprechende Maßnahmen im Rahmen des Flüssigkeitshandlings erzielen, beispielsweise durch Verwendung von 384-Kanal-Pipetten bei einzelnen Schritten und Basissystemen zur Automation. Der Test erlaubt die Verwendung der Mitochondrien unmittelbar nach ihrer Isolierung, eine Vorbereitung der Platte entfällt. Die Analysedauer liegt typischerweise bei ~30-45 Minuten. Daher können pro Tag und pro Präparation mehrere Experimente durchgeführt werden.



**Abb. 4:** (A) Repräsentative Signalkurven im Rahmen einer Dosis-Wirkungs-Analyse einer Zielverbindung (B) Repräsentative  $IC_{50}$ -Kurve eines Mitochondrieninhibitors auf Grundlage der gemessenen Steigungen. Die Daten wurden mit Bezug auf die Raten der unbehandelten Kontrollen normalisiert.

## Material und Methoden (Protokoll)

### Vorbereitung von 96-Wellplates

- Die Vorbereitung der Mikroplatten erfolgt auf einem auf 30 °C eingestellten Plattenheizgerät.
- Rekonstitution der MitoXpress Xtra Sonde in 1 ml H<sub>2</sub>O. Verdünnung der Sondenlösung 1:10 in Messpuffer (250 mM Saccharose, 15 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) und Zugabe von 100 µl in jedes Well.
- Zum Wirkstoff-Screening: Zugabe von jeweils 1 µl Verbindung (gelöst in einem geeigneten Lösemittel) in die Test-Wells.
- Verdünnung der Mitochondrien bis zur gewünschten Konzentration in Messpuffer und Zugabe von jeweils 50 µl in die Test-Wells. Lösen von Substrat (Succinat oder Glutamat/Malat) und ADP (falls erforderlich) in Messpuffer und Zugabe von jeweils 50 µl dieser Lösung in die Test-Wells. Die Endkonzentration des Substrats sollte 25 mM (Succinat) bzw. 12,5/12,5 mM (Glutamat/Malat) betragen, die Endkonzentration von ADP 1,65 mM.
- Zugabe von 100 µl Mineralöl (auf 30 °C vorgewärmt) in jedes Well. Auf diese Weise wird die Empfindlichkeit des Assays erhöht, da die Interferenz durch den Sauerstoff in der Umgebungsluft minimiert wird.

Hinweis: Die Plattenvorbereitung sollte so zügig wie möglich durchgeführt werden. Bei Verwendung einer 384-Wellplate müssen die Volumen entsprechend angepasst werden (siehe zusätzliche technische Ressourcen).

### Messung

- Einsetzen der vorbereiteten Platte in den auf 30 °C vorgewärmten Fluoreszenz-Plattenleser.
- Messung des Sensorsignals über 10 bis 30 Minuten im Abstand von 1,5 Minuten. Die Anregungswellenlänge sollte 380 nm und die Emissionswellenlänge 650 nm betragen (siehe Benutzerhandbuch).
- Die Fluoreszenzintensität der MitoXpress Xtra Sonde wurde in einem Fluoreszenz-Plattenleser kinetisch gemessen (Einstellungen für bestimmte Plattenleser können bei [cellanalysis.support@agilent.com](mailto:cellanalysis.support@agilent.com)) angefordert werden bzw. sind im Gerätehandbuch [11] erhältlich.
- Das Intensitätssignal (RFU) wird gegen die Zeit aufgetragen, wie in [10] beschrieben. In diesem Fall wird eine vorkonfigurierte BMG-Datenanalyse-Vorlage benutzt (kann bei [cellanalysis.support@agilent.com](mailto:cellanalysis.support@agilent.com) angefordert werden).

Soweit möglich, sollte die Fluoreszenz zeitaufgelöst gemessen werden (TRF, Time-Resolved Fluorescence), um beste Messleistungen zu erzielen. Die empfohlenen Einstellungen für TRF-Messungen sind dem MitoXpress Xtra Benutzerhandbuch zu entnehmen. Geräteprotokolle sind bei [agilent.com](http://agilent.com) erhältlich (siehe zusätzliche Ressourcen).

Hinweis: Die Mitochondrien müssen gemäß Benutzerprotokoll frisch präpariert werden und dürfen nicht länger auf Eis aufbewahrt werden als in der Literatur [9] beschrieben (Mitochondrien aus Rattenleber gewöhnlich <4-6 h). Die Messpuffer sollten am Tag der Messung frisch hergestellt werden.

### Datenanalyse

Es werden gewöhnlich semiquantitative Daten gemessen, die auf der Geschwindigkeit des Anstiegs des MitoXpress Xtra Sensorsignals beruhen. Diese Geschwindigkeit wird dann mit unbehandelten Proben verglichen und zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen verwendet.

Die Geschwindigkeit lässt sich aus der Steigung des linearen Teils der kinetischen Kurven ermitteln. Die prozentuale Aktivität wird durch Normalisierung auf unbehandelte Kontrollen berechnet:

$$\text{Prozentuale Aktivität} = (\text{Geschwindigkeit der behandelten Probe} / \text{Geschwindigkeit der unbehandelten Kontrolle}) \times 100.$$

Bei IC<sub>50</sub>/UC<sub>50</sub>-Kurven wird die prozentuale Aktivität gegen die Konzentration der Verbindung aufgetragen (bei der abgebildeten X-Achse handelt es sich um eine Log10-Skala).

Eine quantitativere Bestimmung ist gewöhnlich nicht erforderlich, aber möglich. Dazu werden die Fluoreszenzdaten in Sauerstoffkonzentrationen umgerechnet [9].

## Abschließende Bemerkungen

Die MitoXpress Xtra Sauerstoffverbrauchsanalyse ermöglicht eine praktische, empfindliche und direkte Messung der Mitochondrienfunktion. Diese Fluoreszenz-basierte Analyse ist mit 96- und 384-Wellplates kompatibel und sorgt so für den hohen Durchsatz, der für das Wirkstoff-Screening und für Dosis-Wirkungs-Analysen benötigt wird. Alle Bedingungen werden parallel vorbereitet, und während der Messung sind keine zusätzlichen Arbeitsschritte notwendig. Es handelt sich daher um einen einfachen, skalierbaren Assay-Arbeitsablauf. Darüber hinaus sind die Messzeiten kurz (<30 min), der Durchsatz hoch und die Messvolumen niedrig (<150 µl). Dies sorgt für maximale Datenmengen mit einer einzigen Mitochondrienpräparation. Die Bereitstellung dieser Analyse fällt mit einer wachsenden Nutzung dieser Reagenzien im akademischen Umfeld und im Rahmen der Wirkstoffforschung zusammen. Letztendlich wird so ein Wirkstoff-Screening auf mögliche negative Wirkungen auf Mitochondrien ermöglicht, was das Analysendesign unterstützt und Toxizitäten vermeidet.



## Zusätzliche technische Ressourcen

- Relevante Veröffentlichungen: [6-9]
- MitoXpress Xtra Sauerstoffverbrauchsanalyse Benutzerhandbuch [10]
- Protokoll für die Isolierung von Mitochondrien und Messung mit der MitoXpress Sauerstoffverbrauchsanalyse
- Gerätehandbuch: Datenblätter [11]
- Webinar: Challenges in Assessing Mitochondrial Toxicities and Liabilities in Drug Discovery [12]

## Literatur

1. Wallace, K.B., *Mitochondrial off targets of drug therapy*. Trends in Pharmacological Sciences, 2008. **29**(7): S. 361-366.
2. Mattson, M.P. and G. Kroemer, *Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection*. Trends in Molecular Medicine, 2003. **9**(5): S. 196-205.
3. Sullivan, P.G. and M.R. Brown, *Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(3): S. 407-10.
4. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. Nat Genet, 2006. **38**(5): S. 515-7.
5. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**: S. 787.
6. Hynes, J., et al., *Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes*. Toxicol Sci, 2006. **92**(1): S. 186-200.
7. Will, Y., et al., *Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes*. Nature Protocols, 2007. **1**: S. 2563.
8. Hynes, J., R.L. Swiss, and Y. Will, *High-Throughput Analysis of Mitochondrial Oxygen Consumption*. (1940-6029 (Electronic)).
9. Hynes, J., C. Carey, and Y. Will, *Fluorescence-Based Microplate Assays for In Vitro Assessment of Mitochondrial Toxicity, Metabolic Perturbation, and Cellular Oxygenation*. Curr Protoc Toxicol, 2016. **70**: S. 2 16 1-2 16 30.
10. MitoXpress Xtra Sauerstoffverbrauchsanalyse Benutzerhandbuch. Erhältlich unter: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/MitoXpress\\_Xtra\\_Oxygen\\_Consumption\\_Assay.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/MitoXpress_Xtra_Oxygen_Consumption_Assay.pdf).
11. Gerätehandbuch. Erhältlich unter: <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoxpress-ph-xtra-consumables/mitoxpress-xtra-oxygen-consumption-assay#literature>.
12. *Challenges in Assessing Mitochondrial Toxicities and Liabilities in Drug Discovery* (Herausforderungen bei der Beurteilung von mitochondrialen Toxizitäten und Problembereichen in der Wirkstoffforschung). Erhältlich unter: [https://seahorseinfo.agilent.com/acton/fs/blocks/showLandingPage/a/10967/p/p-0182/t/page/fm/0?utm\\_term=Register%20Now&&utm\\_content=landing+page&utm\\_source=Act-On+Software&utm\\_medium=landing+page&sid=TV2:1Z6zBff8C#register](https://seahorseinfo.agilent.com/acton/fs/blocks/showLandingPage/a/10967/p/p-0182/t/page/fm/0?utm_term=Register%20Now&&utm_content=landing+page&utm_source=Act-On+Software&utm_medium=landing+page&sid=TV2:1Z6zBff8C#register).

**[www.agilent.com/chem/cell-analysis](http://www.agilent.com/chem/cell-analysis)**

**Ausschließlich zu Forschungszwecken.  
Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.**

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Gedruckt in den USA, 8. März 2019  
5994-0784DEE