

Screening della disfunzione mitocondriale indotta da farmaci usando MitoXpress su mitocondri isolati

Autori

Ryan McGarrigle
Conn Carey
James Hynes
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

I mitocondri sono regolatori funzionali della vita e della morte delle cellule e di conseguenza svolgono un ruolo fondamentale nell'eziologia di molte malattie. La compromissione della funzione mitocondriale è stata inoltre identificata come uno dei meccanismi che contribuiscono significativamente alla tossicità indotta da farmaci ed è pertanto di particolare interesse nell'industria farmaceutica. Le misurazioni del consumo di ossigeno sono tradizionalmente il metodo preferito per valutare la funzione mitocondriale. Ad ogni modo, la complessità di misurazione e la di bassa produttività dei tradizionali approcci con elettrodo polarografico di tipo Clark hanno tuttavia limitato l'applicabilità di queste misurazioni informative, in particolare nel contesto dello screening dei composti. Qui descriviamo in che modo l'analisi del consumo di ossigeno Agilent MitoXpress Xtra è in grado di risolvere questa limitazione, offrendo una tecnica di indagine del consumo di ossigeno mitocondriale ad alta produttività basata sulla fluorescenza, in formati per piastre a 96 o a 384 pozzetti. Sono presi in considerazione i parametri di ottimizzazione fondamentali e sono descritti i dati dei campioni, illustrando in che modo è possibile effettuare uno screening delle librerie di composti ed effettuare analisi dose-risposta.

Introduzione

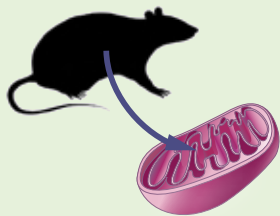
La disfunzione mitocondriale è coinvolta nell'eziologia di diversi stati patologici ed è anche stata identificata come uno dei principali meccanismi della tossicità indotta da farmaci [1-6]. L'analisi del consumo di ossigeno è storicamente il mezzo preferito per valutare la funzione mitocondriale in quanto si tratta di una misurazione diretta dell'attività della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e, nel caso di mitocondri accoppiati, offre informazioni specifiche sulla fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Tradizionalmente, il consumo di ossigeno di mitocondri isolati è stato misurato utilizzando metodi polarografici a bassa produttività. Questo approccio non offre tuttavia la produttività o la praticità necessarie per valutare più condizioni sperimentali in parallelo, indipendentemente che si tratti di effettuare lo screening di librerie di composti, di valutare relazioni dose-risposta o di indagare il meccanismo di azione. Qui descriviamo in che modo l'analisi del consumo di ossigeno Agilent MitoXpress Xtra combina le informazioni sulla rapidità con cui i mitocondri consumano l'ossigeno con la praticità e la produttività delle analisi per lettore di piastre basate sulla fluorescenza. Il livello di produttività offerto e il fatto che i volumi di misurazione siano più piccoli rispetto ai convenzionali mezzi di analisi polarografici consentono di generare un insieme di dati di dimensioni significativamente maggiori da un'unica preparazione mitocondriale.

La grande efficacia di queste misurazioni è resa possibile dal sensore MitoXpress Xtra. L'emissione del sensore è attenuata dall'ossigeno molecolare, pertanto riduzioni della concentrazione dell'ossigeno disciolto provocate dall'attività dell'ETC vengono osservate come aumento del segnale di MitoXpress Xtra. Uno strato sigillante di olio minerale viene applicato a ognuno dei pozzetti di test per limitare la diffusione inversa dell'ossigeno ambientale e la piastra viene misurata cineticamente su un lettore per piastre a fluorescenza per offrire una pratica valutazione ad alta produttività dell'attività dell'ETC. La diminuzione dei tassi di variazione del segnale rispetto a un controllo non trattato suggerisce l'inibizione dell'attività dell'ETC, mentre l'aumento del segnale suggerisce un aumento della respirazione dovuto a un aumento dell'attività dell'ETC o al disaccoppiamento dell'ETC per OXPHOS. Inoltre, come per gli approcci polarografici tradizionali, è possibile offrire un certo livello di comprensione meccanicistica utilizzando substrati ETC specifici per complesso. Tuttavia, l'approccio basato su micropiastre qui usato consente di misurare tutte le condizioni rilevanti in parallelo in modo tale che le configurazioni delle analisi risultino semplificate e l'interpretazione dei dati non sia compromessa dal graduale deterioramento della preparazione mitocondriale.

Qui riassumiamo in che modo vengono effettuate queste misure, concentrandoci in particolare sui parametri di ottimizzazione fondamentali e sull'applicazione di tali misurazioni allo screening dei composti e alle analisi dose-risposta.

Configurazione pre-analisi

1. Preparazione glutammato/malato, succinato, e stock ADP
2. Preparazione FCCP, rotenone e antimicina A
3. Isolare mitocondri da fegato di topo



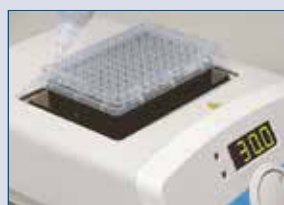
Flusso di lavoro dell'analisi



Caricamento piastra con mitocondri e substrati

Micropiastra a 96 o 384 pozzetti

Mitocondri, substrato, MitoXpress Xtra, $\pm$ ADP, + composto



Aggiunta MitoXpress + olio minerale

Olio minerale

Compatibile con gestione dei liquidi multicanale



Misura + analisi

Letto di piastre a fluorescenza

PC



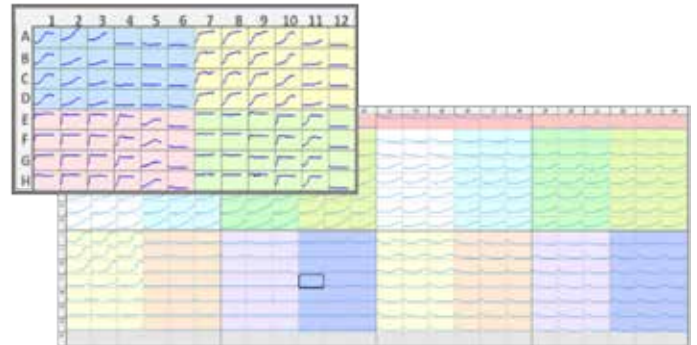
Ottimizzazione dell'analisi

Ottimizzazione della concentrazione delle proteine mitocondriali

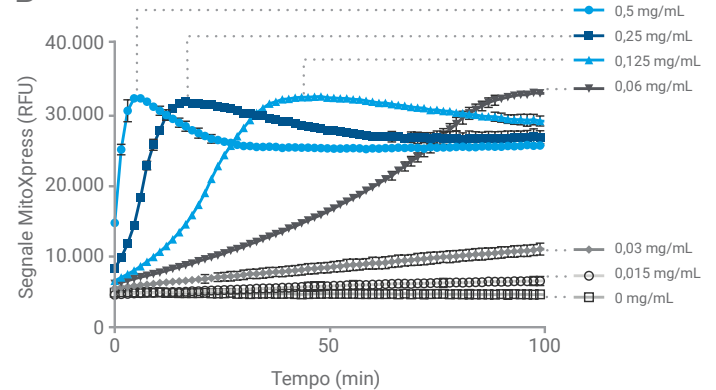
Il consumo di ossigeno per mg di proteine mitocondriali è specifico di ogni tessuto e può essere misurato mediante la procedura di isolamento utilizzata. Il consumo di ossigeno è influenzato anche dai substrati respiratori forniti e dalla disponibilità di ADP. Per garantire analisi affidabili, è necessario effettuare lo screening dei composti a concentrazioni delle proteine che siano state ottimizzate in modo che si osservino forti variazioni di segnale per campioni non trattati, cosicché sia l'aumento che la diminuzione di attività possano essere rilevati in modo affidabile. Contrariamente a quanto avviene per le analisi polarografiche tradizionali, la produttività offerta dal formato in micropiastre (da 96 e da 384) qui utilizzato rende semplice questo tipo di ottimizzazione.

La Figura 1 rappresenta dati di campioni in cui diluizioni delle proteine sono valutate con substrati respiratori rilevanti, in presenza e in assenza di ADP. L'aumento della concentrazione delle proteine mitocondriali dà come risultato una più rapida diminuzione dell'ossigeno, rilevata in tempo reale come un più rapido aumento del segnale della sonda. Come è evidente nella Figura 1A, la produttività resa possibile dall'approccio con micropiastre consente di valutare più condizioni in un'unica piastra.

A



B



C

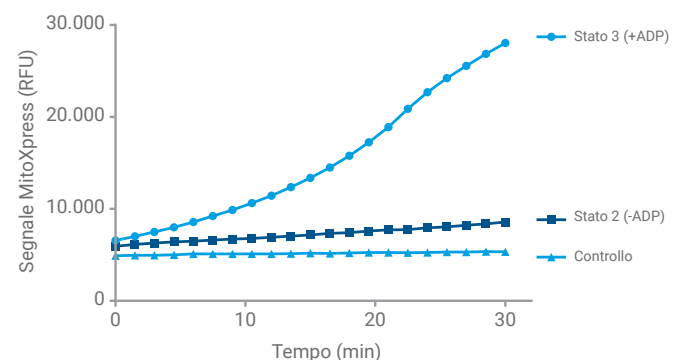


Figura 1. (A) Esempi di disposizione nelle piastre e curve di segnale risultanti per il formato a 96 pozzetti e per quello a 384 pozzetti. Ogni gruppo dell'esempio con 96 pozzetti contiene la titolazione delle proteine con i seguenti substrati: glutammato/malato (blu), succinato (giallo), glutammato/malato + ADP (rosa) e succinato + ADP (verde). (B) Esempio di curve di segnale per la titolazione delle proteine per la respirazione controllata da ADP con succinato (tra 0 e 0,5 mg/mL). (C) Effetto dell'aggiunta di ADP sul consumo di ossigeno mitocondriale.

Tipici valori ottimizzati di concentrazione delle proteine sono riportati di seguito.

- Respirazione basale con glutammato/malato: 1 mg/mL
- Respirazione controllata da ADP con glutammato/malato: 0,125 mg/mL
- Respirazione basale con succinato: 0,5 mg/mL
- Respirazione controllata da ADP con succinato: 0,25 mg/mL

La Figura 1B mostra un esempio di variazioni del segnale dovute all'ottimizzazione delle proteine della respirazione controllata da ADP con succinato (pozzetti E7-H12). Una concentrazione di 0,25 mg/mL mostra una variazione del segnale rapida eppur misurabile, ideale per indagare composti sospettati di inibire il complesso II-IV dell'ETC.

Tale ottimizzazione consente inoltre una valutazione dell'accoppiamento mitocondriale, che dà informazioni sulla qualità della preparazione mitocondriale. La valutazione viene effettuata determinando il rapporto tra i tassi con stimolazione da ADP (Stato 3) e i tassi con solo il substrato (Stato 2). Maggiore è il valore di questo rapporto di controllo respiratorio (RCR, Respiratory Control Ratio), migliore è l'accoppiamento tra l'attività dell'ETC e la produzione di ATP, contrariamente a quanto avviene per valori bassi, che sono un'indicazione di membrane mitocondriali danneggiate. Nella Figura 1C sono forniti dati di campioni che illustrano l'aumento di attività causato dall'aggiunta di ADP.

Misurazione della perturbazione della funzione mitocondriale

Dati che illustrano in modo tipico mitocondri con funzione mitocondriale perturbata sono mostrati nella Figura 2. L'antimicina A blocca il complesso III della catena di trasporto degli elettroni, inibendo in tal modo il consumo di ossigeno, mentre il classico disaccoppiante FCCP dissipa il potenziale della membrana mitocondriale provocando un aumento del consumo di ossigeno.

Per lo screening dei composti, le misurazioni sono tipicamente effettuate nello Stato 2 (senza ADP) quando si effettua lo screening di disaccoppianti e nello Stato 3 (con l'aggiunta di ADP) quando si effettua lo screening di inibitori. Il formato in micropiastra offre una produttività considerevole con misurazioni possibili sia nel formato a 96 pozzetti che in quello a 384 pozzetti. Ciò contrasta fortemente con i tradizionali approcci polarografici a bassa produttività.

La Figura 3 illustra in che modo è possibile effettuare lo screening di 46 composti in duplicato in un'unica piastra a 96 pozzetti: i composti sono aggiunti in pozzetti paralleli su ciascuna metà della piastra. Diminuzioni significative della respirazione sono facilmente identificabili (evidenziate in verde).

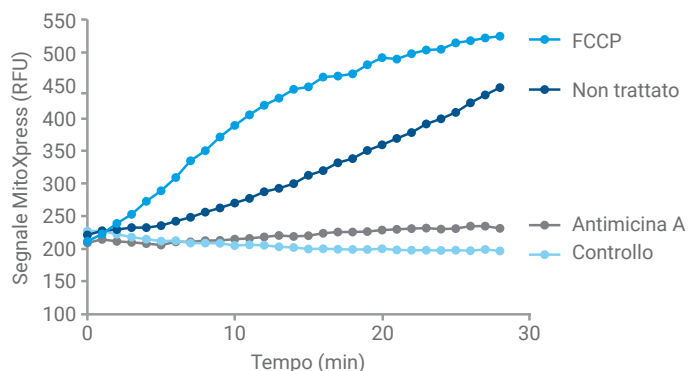


Figura 2. Dati in uscita tipici che illustrano il rilevamento della perturbazione della funzione mitocondriale utilizzando l'analisi del consumo di ossigeno Agilent MitoXpress Xtra.

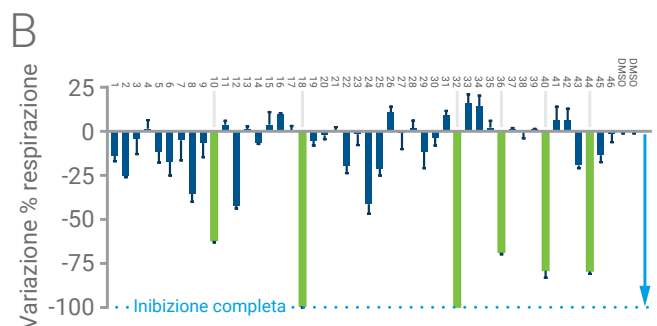
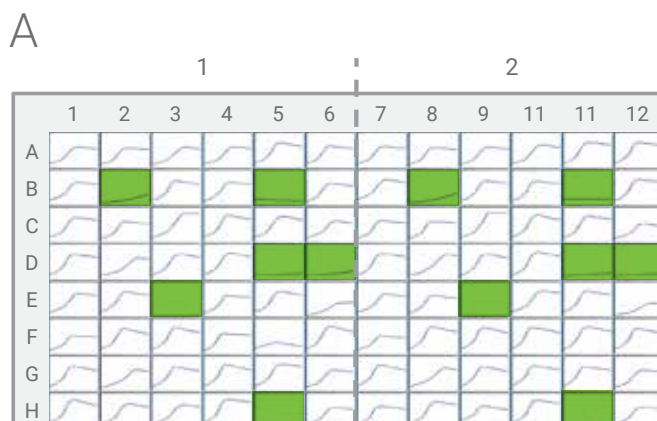


Figura 3. È possibile effettuare lo screening di 46 composti in duplicato su un'unica piastra utilizzando la disposizione della piastra presentata nella figura A. Sulla piastra sono inclusi due controlli del veicolo (DMSO). I dati sono presentati come variazioni della percentuale di inibizione (B). I composti che mostrano un'inibizione significativa sono contrassegnati e i dati sono trasformati per l'analisi dose-risposta (evidenziati in verde).

Possono anche essere effettuate utili valutazioni dose-risposta per più composti su un'unica piastra trasformando facilmente i dati in valori IC_{50} / UC_{50} ; i dati dei tassi ottenuti dalle curve di segnale sono riportati in funzione delle concentrazioni usate nell'analisi dose-risposta (Figura 4B). I risultati possono quindi essere confrontati con riferimenti presenti in letteratura o con dati interni.

Aumento della produttività

Le misure basate su MitoXpress Xtra di mitocondri isolati sono compatibili con i formati di piastra a 384 pozzetti, consentendo di quadruplicare ulteriormente la produttività. La produttività può essere ulteriormente aumentata incorporando approcci di gestione dei liquidi, tra cui pipette a 384 canali in un'unica fase e sistemi base di automazione. L'analisi consente di utilizzare i mitocondri direttamente dopo l'isolamento senza preparazione della piastra e i tempi di analisi sono tipicamente di 30-45 minuti, consentendo di effettuare più esperimenti per giorno/per preparazione.

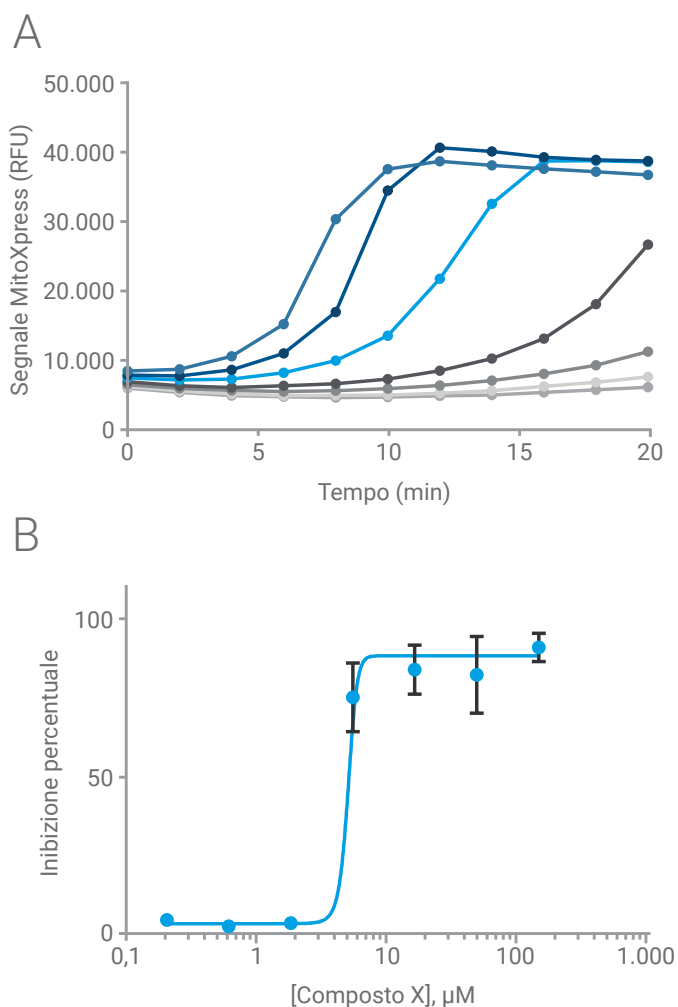


Figura 4. (A) Curve di segnale rappresentative ottenute da un'analisi dose-risposta di un composto di interesse (B) Curva IC_{50} rappresentativa di un inibitore mitocondriale basata sulla misurazione delle pendenze. I dati sono normalizzati rispetto ai tassi del controllo non trattato.

Materiali e metodi (protocollo)

Preparazione per piastre a 96 pozzetti

- Preparare le piastre in un riscaldatore per piastre stabilizzato a 30 °C.
- Ricostituire la sonda MitoXpress Xtra in 1 mL di H₂O. Diluire con concentrazione 1:10 nel tampone di misurazione (saccarosio 250 mM, KCl 15 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, K₂HPO₄ 30 mM, pH 7,4) e aggiungere 100 µL a ogni pozzetto.
- Per il test dei composti, aggiungere 1 µL di composto in solvente adeguato ai pozzetti di test.
- Diluire i mitocondri in tampone di misurazione alla concentrazione desiderata e aggiungere 50 µL al pozzetto di test. Dissolvere il substrato (succinato o glutammato/malato) e l'ADP (se richiesto) nel tampone di misurazione e aggiungere 50 µL di questa soluzione ai pozzetti di test ottenendo una concentrazione finale del substrato di 25 mM (succinato) o 12,5/12,5 mM (glutammato/malato) e una concentrazione finale di ADP di 1,65 mM.
- Aggiungere 100 µL di olio minerale (preriscaldato a 30 °C) a ogni pozzetto. Ciò aumenta la sensibilità dell'analisi minimizzando le interferenze dovute all'ossigeno ambientale.

Nota: Il tempo di preparazione della piastra deve essere il più possibile ridotto. Se si utilizza una piastra a 384 pozzetti, modificare opportunamente i volumi (vedi la sezione Risorse tecniche supplementari).

Misurazione

- Inserire la piastra preparata in un lettore di piastre a fluorescenza preimpostato a 30 °C.
- Misurare il segnale del sensore a intervalli di 1,5 min per 10-30 min utilizzando lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente di 380 nm e 650 nm come indicato nel manuale per l'utilizzatore.
- L'intensità della fluorescenza della sonda MitoXpress Xtra è stata misurata cineticamente utilizzando un lettore di piastre a fluorescenza (le impostazioni per una selezione di lettori possono essere richieste a cellanalysis.support@agilent.com) o sono disponibili nel documento Instrument Guide [11].
- L'intensità del segnale (RFU) è stata quindi riportata in funzione del tempo come descritto in [10], in questo caso utilizzando il modello di analisi dei dati BMG preconfigurato (che può essere richiesto a cellanalysis.support@agilent.com).

Se disponibile, è opportuno utilizzare la fluorescenza a risoluzione temporale (TRF) per massimizzare le prestazioni della misurazione. Le impostazioni per la misurazione della TRF consigliate sono fornite nel manuale per l'utilizzatore di MitoXpress Xtra. I protocolli strumentali sono disponibili su agilent.com (vedi le risorse supplementari).

Nota: i mitocondri devono essere stati recentemente preparati secondo il protocollo dell'utilizzatore e non devono essere lasciati su ghiaccio per un tempo superiore a quello consigliato in letteratura [9] (tipicamente <4-6 ore per mitocondri di fegato di topo). I tamponi di misurazione devono essere preparati il giorno della misurazione.

Analisi dei dati

I dati sono tipicamente analizzati in modo semiquantitativo determinando il tasso di aumento del segnale di MitoXpress Xtra. Questo tasso è quindi utilizzato per confrontare i campioni trattati con quelli non trattati e per generare relazioni di dose-risposta.

I tassi possono essere generati dalle pendenze delle porzioni lineari delle curve cinetiche. L'attività percentuale può essere calcolata normalizzando rispetto ai controlli non trattati:

$$\text{Attività percentuale} = (\text{Tasso del campione trattato} / \text{Tasso del campione non trattato}) \times 100.$$

Le curve IC₅₀ / UC₅₀ rappresentano l'attività percentuale in funzione della concentrazione del composto (l'asse X è mostrato in scala logaritmica in base 10).

Sebbene non sia tipicamente richiesta, una valutazione più quantitativa può essere effettuata trasformando i dati di fluorescenza in concentrazioni di ossigeno [9].

Conclusione

L'analisi del consumo di ossigeno MitoXpress Xtra consente di analizzare la funzione mitocondriale in modo pratico, sensibile e diretto. Questa analisi basata sulla fluorescenza, essendo compatibile con piastre a 96 e a 384 pozzetti, offre la produttività necessaria sia per lo screening dei composti che per le valutazioni dose-risposta. La preparazione per tutte le condizioni è effettuata in parallelo, per cui non sono necessari ulteriori interventi durante la misurazione, offrendo un flusso di lavoro di analisi semplice e scalabile. Inoltre, i ridotti tempi di misurazione (<30 min), l'alta produttività e i ridotti volumi di misurazione (<150 µL) massimizzano la quantità di dati che è possibile generare da un'unica preparazione mitocondriale. Lo sviluppo di queste soluzioni coincide con l'aumento dell'impiego di questi reagenti sia in ambito accademico che nello sviluppo di farmaci, consentendo in definitiva di effettuare lo screening di possibili fattori di predisposizione mitocondriale, favorendo la progettazione delle analisi ed evitando la tossicità.

Risorse tecniche supplementari

- Pubblicazioni rilevanti: [6-9]
- MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay User Manual (Manuale per l'utilizzatore dell'analisi del consumo di ossigeno MitoXpress Xtra) [10]
- Protocollo per l'isolamento e la misurazione dei mitocondri con l'analisi del consumo di ossigeno MitoXpress
- Instrument Set-up Guide (Guida alla configurazione dello strumento): Data Sheets (Schede dati) [11]
- Webinar: Challenges in Assessing Mitochondrial Toxicities and Liabilities in Drug Discovery (Difficoltà nella valutazione delle tossicità e dei fattori di predisposizione mitocondriale nello sviluppo di farmaci) [12]

Bibliografia

1. Wallace, K.B., *Mitochondrial off targets of drug therapy*. Trends in Pharmacological Sciences, 2008. **29**(7): pagg. 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): pagg. 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): pagg. 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): pagg. 515-7.
5. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**: pag. 787.
6. Hynes, J., et al., *Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes*. Toxicol Sci, 2006. **92**(1): pagg. 186-200.
7. Will, Y., et al., *Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes*. Nature Protocols, 2007. **1**: pag. 2563.
8. Hynes, J., R.L. Swiss, and Y. Will, *High-Throughput Analysis of Mitochondrial Oxygen Consumption*. (1940-6029 (versione elettronica)).
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**: pagg. 2.16 1-2 16 30.
10. *MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay User Manual*. Disponibile alla pagina: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/MitoXpress_Xtra_Oxygen_Consumption_Assay.pdf.
11. *Instrument Set-up Guide*. Disponibile alla pagina: <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables/mitoexpress-xtra-oxygen-consumption-assay#literature>.
12. *Challenges in Assessing Mitochondrial Toxicities and Liabilities in Drug Discovery*. Disponibile alla pagina: 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

**Solo per scopi di ricerca.
Non utilizzabili per procedure diagnostiche.**

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Stampato negli Stati Uniti, 8 marzo 2019
5994-07841TE

