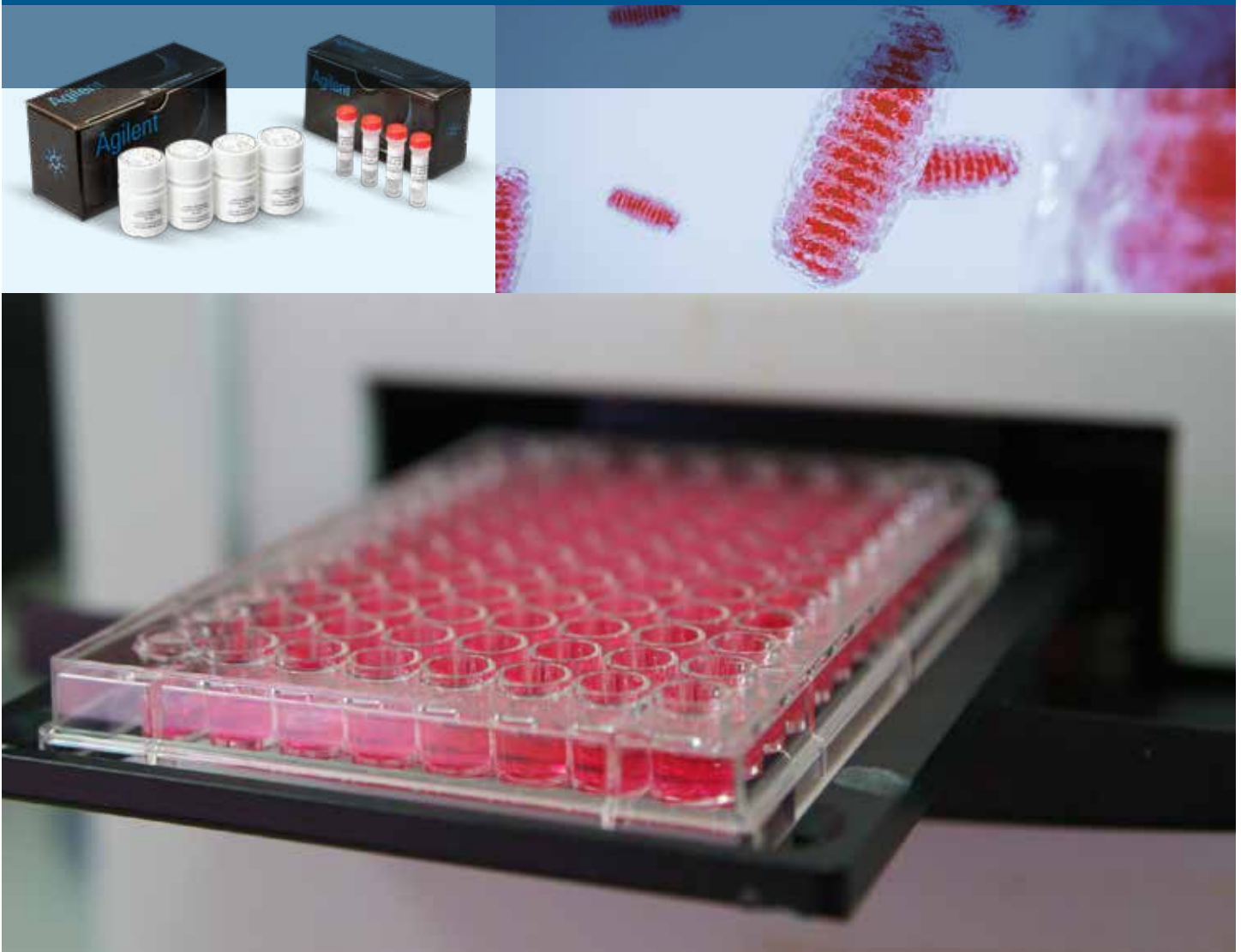


Agilent Lösungen für zellmetabolische Messungen mit Ihrem Plattenlesegerät



Das volle Potenzial von Plattenlesegeräten ausschöpfen



Entdecken Sie die Möglichkeiten der Sauerstoffverbrauchsanalyse, der pH-Analyse und der Intra intrazellulären Sauerstoffanalyse:

- Messen Sie die mitochondriale Aktivität und Glykolyse in Lebendzellen.
- Stellen Sie von indirekten, auf Zellen basierenden Endpunktanalysen auf direkte, informative und schnelle Mix-and-measure-Bewertungen um und messen Sie die Mitochondrienfunktion, glykolytische Aktivität und zelluläre Sauerstoffsättigung.
- Multiplexläufe mit anderen relevanten Analysen.
- Messungen nicht nur bei Monozelllagen, sondern auch bei suspendierten Zellen, Mikroben und bestimmten 3D-Kulturen.
- Erhöhen Sie den Durchsatz mit einfachen Mix-and-measure-Stoffwechselanalysen in Standardmikroplatten.
- Bequeme Messung von isolierten Mitochondrien mit hohem Probendurchsatz.
- Sondieren Sie den Zusammenhang zwischen Sauerstoffverfügbarkeit und Änderungen des Zellmetabolismus.

MitoXpress Xtra Sauerstoffverbrauchsanalyse

Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs



Sauerstoffverbrauchsmessungen liefern wichtige funktionelle Kenndaten des Zellmetabolismus insbesondere mit Blick auf die Mitochondrienfunktion. Im Rahmen von metabolischen Untersuchungen von Lebendzellen ermöglichen solche Messarten wichtige Erkenntnisse über den Mechanismus der Zellfunktion und die Rolle von Stoffwechselstörungen bei der Progression von Erkrankungen.

Die MitoXpress Xtra Sauerstoffverbrauchsanalyse ist ein wertvolles Tool für die Untersuchung des Metabolismus. Sie erlaubt unkomplizierte kinetische Messungen des aeroben Metabolismus und kann auf Standardmikroplatten mit Fluoreszenz-Plattenlesegeräten durchgeführt werden. Bei der Zellatmung nimmt die Konzentration von Sauerstoff in der Probe ab. Gleichzeitig nimmt das MitoXpress Xtra Signal zu und liefert so einen Messwert für den Sauerstoffverbrauch.

Der Sauerstoffverbrauch von humanen, von iPS-Zellen abstammenden Kardiomyocyten (Cor.4U, NCardia) wurde einer MitoXpress Xtra Analyse unterzogen (siehe Abb. 1). Werden Zellen mit dem Entkoppler FCCP behandelt, steigt die Rate der Signaländerung mit der Rate der Zellatmung an. Dagegen hatte die Behandlung mit einem Hemmer der mitochondrialen Atmung (Antimycin A) einen entgegengesetzten Effekt: Der Sauerstoffverbrauch war reduziert und die Rate der Signaländerung nahm ab. Diese Messungen können in vielen verschiedenen Medienzusammensetzungen durchgeführt werden, was ein flexibles Analysendesign ermöglicht.

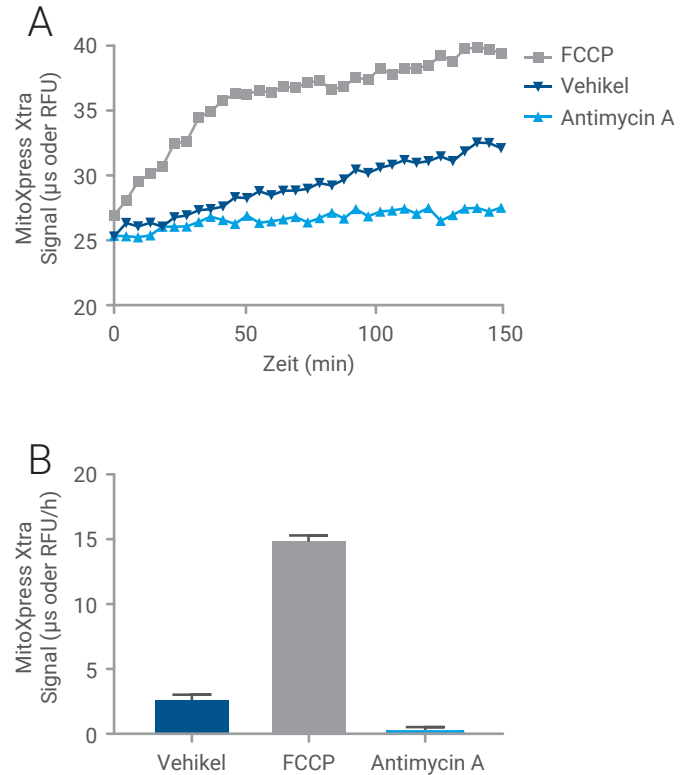


Abbildung 1: (A) Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs von Cor.4U (NCardia) mit der Agilent MitoXpress Xtra Analyse. Während der Zellatmung nimmt die Konzentration des gelösten Sauerstoffs ab und das Signal von MitoXpress Xtra zu. Die Behandlung mit Antimycin A (einem Hemmer der mitochondrialen Atmung) hemmt den Sauerstoffverbrauch und senkt daher die Änderungsrate des Sensorsignals. Die Behandlung mit FCCP (einem Entkoppler) erhöht den Sauerstoffverbrauch und daher auch die Änderungsrate des Sensorsignals. (B) Diese metabolischen Effekte können durch Analyse der Änderungsrate des MitoXpress Xtra Signals untersucht werden. Eine niedrige Änderungsrate verweist auf weniger aerobe Stoffwechselaktivität.

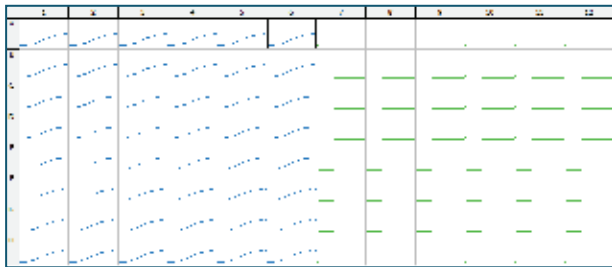
MitoXpress Xtra Lösungen für die Toxikologie

Screening auf arzneimittelinduzierte Toxizität

Bei verschiedenen Arzneimittelklassen liegen Hinweise auf eine arzneimittelinduzierte mitochondriale Funktionsstörung vor. Es ist bekannt, dass diese zur Toxizität in der Leber, im Herz, in der Niere, in Muskeln und im Zentralnervensystem erheblich beiträgt.

Dank des Mikroplattenformats und der Leistungsfähigkeit der Analyse ist die MitoXpress Xtra Analyse eine bequeme Lösung für das frühzeitige Screening auf arzneimittelinduzierte mitochondriale Probleme und die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven (siehe Abb. 2). Für diese Studien eignet sich eine Bandbreite von relevanten *In-vitro*-Modellen, darunter primäre Hepatocyten und von humanen iPS-Zellen abstammende Kardiomyocyten und Hepatocyten.

A



B

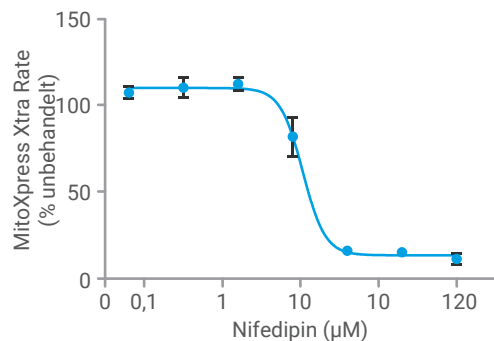
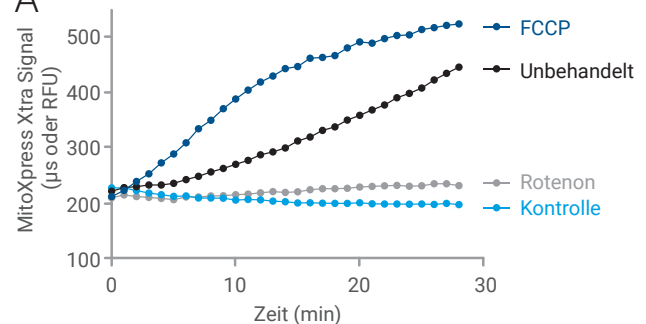


Abbildung 2: (A) Messung des Sauerstoffverbrauchs in hiPS-HEP-Zellen (Clontech) mit der Agilent MitoXpress Xtra Analyse. Der Z'-Faktor liegt bei ~0,7. (B) Dosis-Wirkungs-Kurve: Die Wirkung von Nifedipin (Calciumkanalblocker) auf die mitochondriale Atmung bei Cor.4U-Kardiomyocyten. Die Werte stammen von Steigungswerten, die mithilfe der Vehikel-Kontrolle normalisiert wurden.

Messung der Atmung in isolierten Mitochondrien

Die Messung der Atmung in isolierten Mitochondrien war dank MitoXpress Xtra nie einfacher. Mit MitoXpress Xtra kann die Aktivität der Elektronentransportkette direkt, bequem und mit hohem Durchsatz ermittelt werden: Diese Messung erfolgt auf Mikroplatten und mit herkömmlichen Fluoreszenz-Plattenlesegeräten (Abb. 3A). Auf diese Weise werden das Screening auf Verbindungen und Dosis-Wirkungs-Analysen erheblich vereinfacht (Abb. 3B). Darüber hinaus können die Mechanismen von individuellen Elektronentransportkomplexen und assoziierten Mitochondrienproteinen mithilfe spezifischer Substrat- und Hemmerkombinationen in größerem Detail untersucht werden. Im Vergleich zu herkömmlichen polarographischen Untersuchungsansätzen erlauben die für die MitoXpress Xtra Analyse benötigten, vergleichsweise niedrigen Probenvolumen mehr Replikate je isolierter Probe. Dank dieser niedrigen Probenvolumen können je Probe mit isolierten Mitochondrien mehr Daten erhoben werden, insbesondere in Kombination mit 384-Wellplates.

A



B

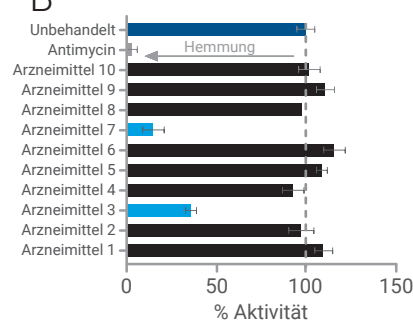


Abbildung 3: Analyse der Atmung in isolierten Mitochondrien (Rattenleber) (A) nach hemmender bzw. entkoppelnder Behandlung mit klassischen mitochondrialen Modulatoren. (B) Screening einer Reihe unbekannter Wirkstoffe an Mitochondrien aus Rattenleber zur Ermittlung von arzneimittelinduzierten mitochondrialen Funktionsstörungen (Arzneimittel 3 und 7).

MitoXpress Xtra Lösungen für Multiplexanalysen

Multiparametrische Multiplexanalyse der mitochondrialen Funktion

MitoXpress Xtra und MitoXpress pH Xtra Analysen können mit der Messung anderer, mit Plattenlesegeräten ablesbarer Parameter kombiniert werden, um weitere Erkenntnisse über die Response von Zellen zu erhalten. Zu diesen Parametern gehören das MMP (mitochondriale Membranpotential), ROS (reactive oxygen species, Sauerstoffradikale) und der zelluläre ATP-Gehalt. Auf diese Weise können Forscher die Auswirkung von Behandlungen oder Bedingungsänderungen auf die Zellfunktion besser charakterisieren. Metabolische Störungen können so auch besser in Kontext gesetzt werden, ohne dass Parallelbehandlungen oder unterschiedliche Technologieplattformen benutzt werden müssen.

Ein Beispiel ist die Multiplexmessung der Lebensfähigkeit von Zellen (Calcein AM) und der mitochondrialen Atmung (MitoXpress Xtra) zur Ermittlung von nicht beabsichtigten Wirkungen einer Arzneimittelbehandlung auf die Zellfunktion (siehe Abb. 4).

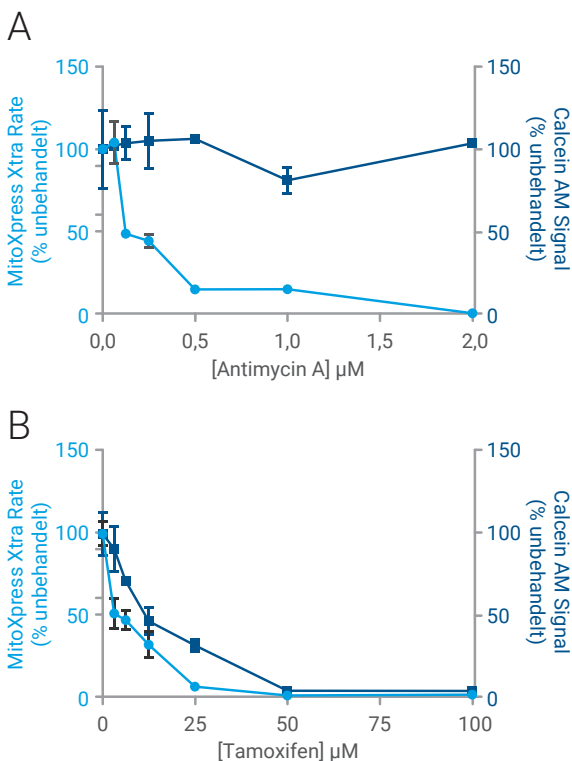


Abbildung 4: Multiplexmessung mit Agilent MitoXpress Xtra und Calcein AM bei HepG2-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit (A) Antimycin A und (B) Tamoxifen. Beide Wirkstoffe reduzieren die mitochondriale Atmung (hellblau). Tamoxifen hatte eine erhebliche Wirkung auf die Lebensfähigkeit, während eine Behandlung mit Antimycin A die Zelllebensfähigkeit nicht signifikant beeinträchtigte (dunkelblau). Daraus kann geschlossen werden, dass die Wirkung von Antimycin A auf die Atmung auf einem direkteren mitochondrialen Mechanismus beruht.

Parallel zum Sauerstoffverbrauch können andere Indikatoren der mitochondrialen Funktion (wie MMP und die Erzeugung von ROS) beobachtet werden. Diese Parameter sind von besonderer Bedeutung, wenn die zellphysiologische Rolle von Mitochondrien im Mittelpunkt steht.

In Abbildung 5 wird die Multiplexmessung von MitoXpress Xtra und MMP (mit JC-1) bei HepG2-Zellen dargestellt, die mit metabolischen Modulatoren (FCCP und Antimycin A) behandelt wurden. Beide Verbindungen senken das Membranpotential, die Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch ist jedoch deutlich unterschiedlich. Dies belegt anschaulich, wie eine Messung mehrerer relevanter Parameter zusätzliche Erkenntnisse bringt.

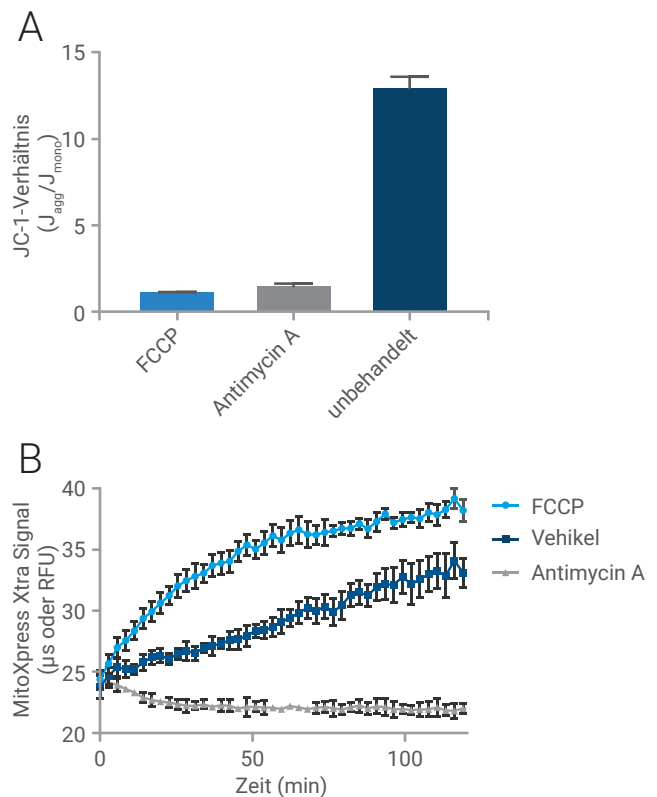


Abbildung 5: Messung von Agilent MitoXpress Xtra und JC-1 im gleichen Well. Die HepG2-Zellen wurden mit Antimycin A oder FCCP behandelt. Beide Verbindungen führten zu einer Reduktion des MMP (A). FCCP verursachte einen charakteristischen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, während Antimycin A die Atmung hemmt (B).

MitoXpress Xtra Lösungen zur Messung des mikrobiellen Metabolismus

Messung der Proliferation, des Metabolismus und der Response auf Antibiotika bei Mikroben

Die MitoXpress Xtra Analyse ist eine unkomplizierte und empfindliche Methode für die Messung des prokaryotischen Zellwachstums oder das Screening auf antimikrobielle Verbindungen mit einem Plattenlesegerät. Mehrfache Probenverdünnungen oder langwierige Untersuchungen auf Agarplatten entfallen. Die Analyse bietet außerdem wertvolle Optionen zur Untersuchung des mikrobiellen Metabolismus.

Das Plattenlesegerätformat ermöglicht hohe Durchsätze, eine gute Auflösung für das Screening und die bequeme Erfassung von IC_{50} - und MHK-Daten. In Abbildung 6 ist dargestellt, wie diese Methode eingesetzt werden kann, um die mikrobielle Proliferation zu beurteilen, Dosis-Wirkungs-Daten zu erfassen und die spezifischen metabolischen Wirkungen von zwei Verbindungen auf Hefe zu messen.

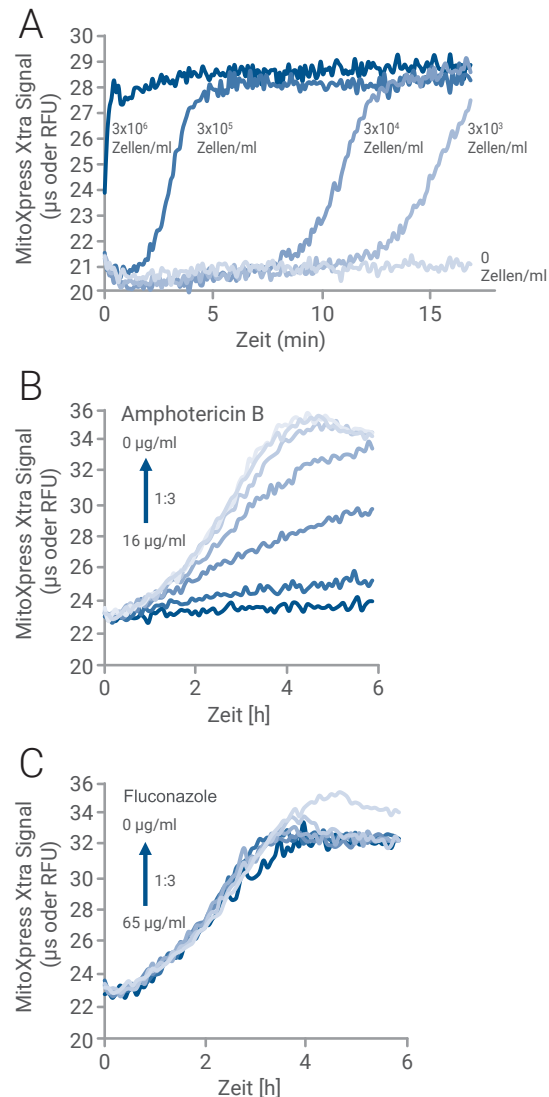


Abbildung 6: Sauerstoffverbrauchsprofile von *C. albicans*, gemessen bei abnehmenden Impfkonzentrationen (A). *C. albicans* wurde mit zunehmenden Konzentrationen von Amphotericin B (B) bzw. Fluconazol (C) behandelt. Anders als Fluconazol hatte Amphotericin B eine dosisabhängige Abnahme des Sauerstoffverbrauchs zur Folge. Diese Beobachtungen korrelieren mit dem Wirkmechanismus.

pH Xtra Glykolyse-Analyse

Messung der glykolytischen Aktivität



Messungen der extrazellulären Ansäuerung lassen äußerst informative Rückschlüsse auf die glykolytische Aktivität zu. Sie können mit der pH Xtra Glykolyseanalyse auf Plattenlesegeräten mit TRF (time-resolved fluorescence, zeitaufgelöster Fluoreszenz) bequem durchgeführt werden. Die extrazelluläre Ansäuerung erfolgt größtenteils durch die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat, die eine Senkung des pH-Werts des Analysepuffers zur Folge hat. Mit dem pH Xtra Sensor kann diese pH-Senkung als Anstieg des Sensorsignals empfindlich gemessen werden.

Diese pH-Messungen liefern wichtige Erkenntnisse zur zentralen Rolle der glykolytischen Aktivitätsänderungen bei einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Dazu gehören Krebs und die zelluläre Adaption an Hypoxie.

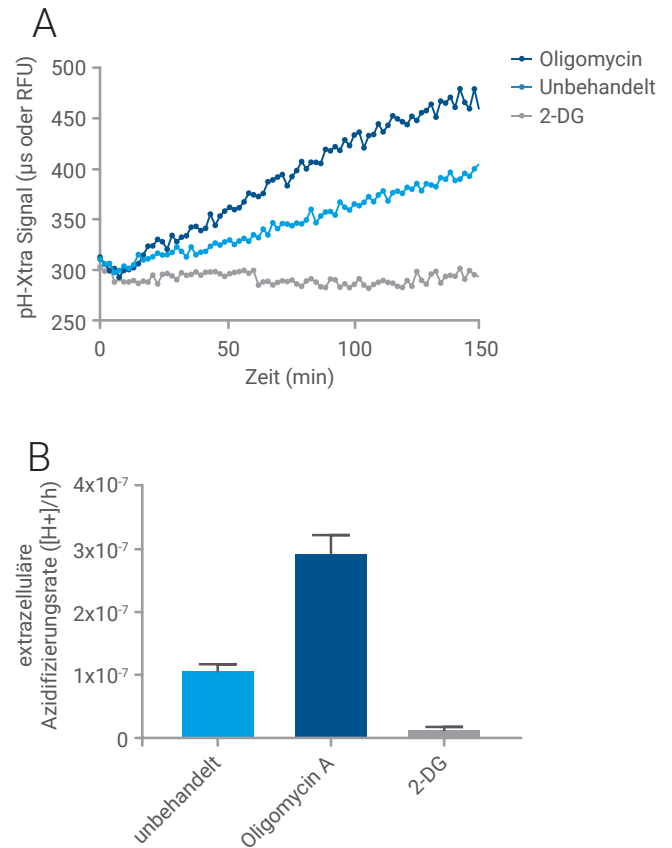


Abbildung 7: (A) Untersuchung der glykolytischen Aktivität von A549 mit der Agilent pH Xtra Glykolyse-Analyse. Eine Behandlung mit dem Hexokinase-Hemmer 2-Deoxyglucose (2-DG) hemmt die extrazelluläre Ansäuerung, die als weniger starke Änderung des Sensorsignals gemessen wird. Die Behandlung mit Oligomycin A, einem Hemmer der mitochondrialen ATP-Synthese, führt zu einem Anstieg der ATP-Synthese durch Glykolyse, um die zelluläre Energiehomöostase aufrechtzuerhalten. (B) Änderungen der extrazellulären Ansäuerung können bequem in Form des pH-Werts oder als $[\text{H}^+]$ -Ionenkonzentration im Zeitverlauf ermittelt werden.

MitoXpress Xtra und pH Xtra Lösungen

Messung des Zellmetabolismus in 3D-Kulturen

Auch bei suspendierten Kulturen und speziellen 3D-Kultursystemen (z. B. RAFT, Mimetix und Alvetex) können Plattenlesegeräte für die Messung des Zellmetabolismus benutzt werden. Die Aufzucht von Zellen in 3D unterstützt die Entwicklung von komplexen intrazellulären Interaktionen. So kann der Unterschied zwischen biologischen Systemen *in vitro* und *in vivo* weiter verringert werden. In Abbildung 8 ist dargestellt, wie MitoXpress Xtra und pH Xtra Analysen zur Messung des Zellmetabolismus in 3D-Matrices (RAFT, Lonza) durchgeführt werden, ohne die Integrität der 3D-Struktur zu stören.

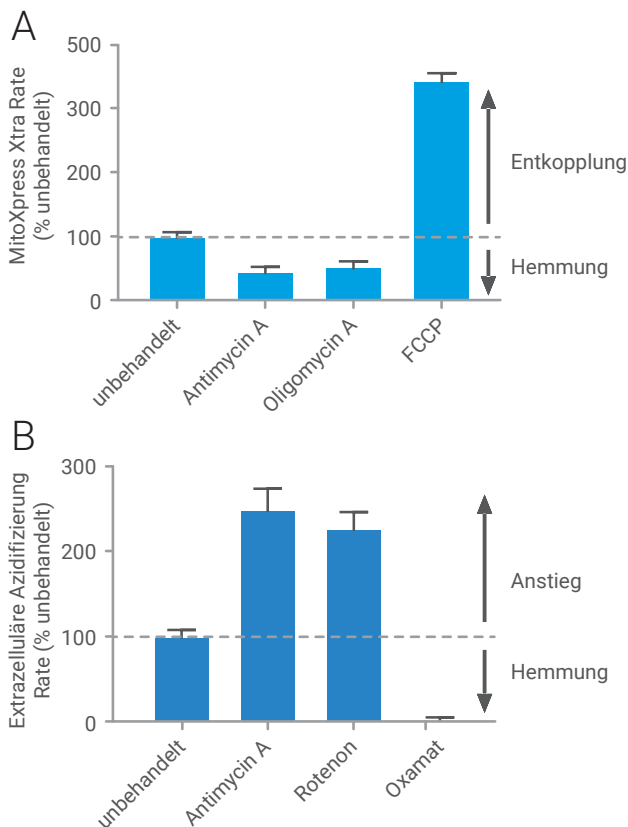


Abbildung 8: (A) Relative Wirkung einer Wirkstoffbehandlung auf den Sauerstoffverbrauch bei A549 3D RAFT-Kulturen, gemessen im Rahmen einer Agilent MitoXpress Xtra Analyse. (B) Relative Wirkung einer Wirkstoffbehandlung auf die extrazelluläre Azidifizierungsrate bei HepG2 RAFT-Kulturen, gemessen im Rahmen einer Agilent pH Xtra Glykolyse-Analyse.

Kombination der Messungen von Glykolyse und Sauerstoffverbrauch

MitoXpress Xtra und pH Xtra ermöglichen die Ermittlung des Stoffwechselzustands der Zellen als Basislinie für weitergehende metabolische Untersuchungen. In Abbildung 9 ist dargestellt, wie diese Analysenkombination benutzt wird, um das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffverbrauch und Glykolyse bei verschiedenen Zelltypen zu studieren. Hier wird außerdem deutlich, wie die unterschiedliche Substratverfügbarkeit dieses Stoffwechselgleichgewicht moduliert.

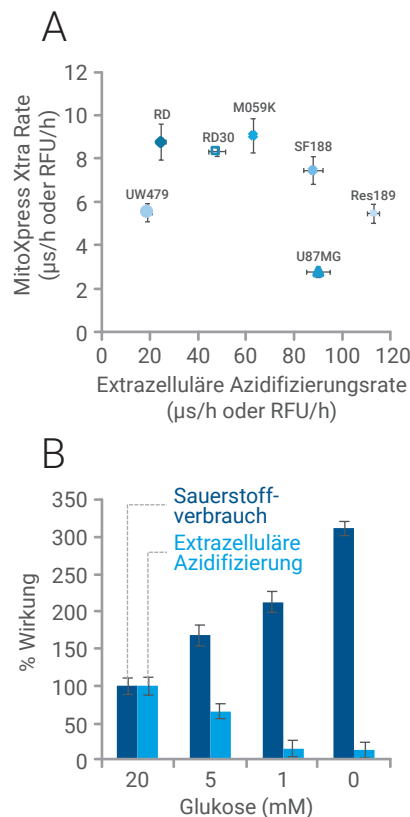


Abbildung 9: (A) Kombinierte Analyse der Glykolyse und der mitochondrialen Atmung in Krebszelllinien mit Agilent MitoXpress Xtra und Agilent pH Xtra. (B) Auswirkung der Glucoseverfügbarkeit auf den Metabolismus von U87MG-Zellen. Wenn mehr Glucose zur Verfügung steht, ist die Atmung reduziert und die Glykolyse nimmt zu (Daten mit freundlicher Genehmigung von Dr. Karl Morten, Universität Oxford, Großbritannien).

MitoXpress Intra – intrazelluläre Sauerstoffverbrauchsanalyse

Intrazelluläre Sauerstoffsättigung und Hypoxie



Der auf Zellebene verfügbare Sauerstoff hat einen signifikanten Einfluss auf die Zellphysiologie, die Signaltransduktion und den Metabolismus. Daher werden in *In-vitro*-Studien niedrigere, physiologisch relevantere Sauerstoffkonzentrationen verwendet, insbesondere in den Bereichen Krebsmetabolismus, Wirkstoffforschung, Neurologie und Herz-Kreislauf-Forschung. Ein wichtiges Element solcher *In-vitro*-Modelle ist jedoch die Überwachung der zellulären Sauerstoffsättigung, da Fluktuationen dieses dynamischen Parameters die Datenauswertung erheblich stören können. Es ist daher wichtig zu verstehen, welchen Sauerstoffbedingungen das Zellmodell ausgesetzt ist, einschließlich des Ausmaßes und der Länge verschiedener Phasen.

Die MitoXpress Intra Analyse bietet eine Lösung für dieses Problem: Sie erlaubt die Bestimmung der intrazellulären O_2 -Konzentrationen in Lebendzellen. Die Aufnahme des Reagens in die Zelle kann mit einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät verfolgt werden. Dazu muss das Gerät über die Option von zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen (TRF, time-resolved fluorescence) bei zwei Wellenlängen verfügen. Der Sensor reagiert so in Echtzeit auf Änderungen der intrazellulären Sauerstoffkonzentration, die durch Änderungen der Umgebungsbedingungen oder durch die Zellatmung entstehen.

Es handelt sich aber nicht nur um ein informatives Überwachungs-Tool. Die Analyse ermöglicht Forschern außerdem, die metabolische Response mit den erhältlichen Sauerstoffkonzentrationen in Beziehung zu setzen. Diese Parameter sind insbesondere mit Blick auf Ischämie, Krebsmetabolismus und Hypoxie extrem wichtig. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse einer MitoXpress Intra Analyse dargestellt. Es wird ein deutlicher Unterschied zwischen der einwirkenden äußeren und der intrazellulären Sauerstoffkonzentration beobachtet. Da dieser Unterschied von der Anzahl, der Proliferation, des Typs und des metabolischen Zustands der Zellen abhängt, kann das Ausmaß der Hypoxie, dem die Zellen ausgesetzt sind, nicht von der Sauerstoffkonzentration der Umgebung abgeleitet werden.

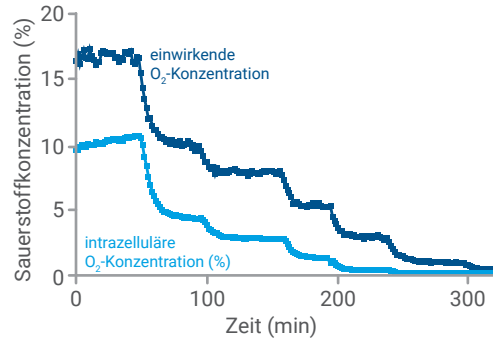


Abbildung 10: Überwachung der O_2 -Konzentrationen in Proben mit HepG2-Zellen in 3D-Kultur (RAFT, Lonza) bei abnehmenden O_2 -Konzentrationen in der Umgebungsluft. Bei der normalen O_2 -Konzentration in der Luft liegt die Sauerstoffsättigung der Zelle bei ~10 %. Bei 5 % O_2 in der Umgebung fällt die Sauerstoffsättigung auf fast 0 % O_2 .

Diese niedrigere Sauerstoffsättigung kann erhebliche physiologische Folgen haben. Wird sie nicht gemessen, werden Daten unter Umständen falsch interpretiert, da die auf das Zellmodell in der Studie einwirkenden Sauerstoffkonzentrationen nicht sichtbar sind. Dies wird in Abbildung 11 beispielhaft dargestellt. Bei einer Sauerstoffkonzentration von ~1,5 % O_2 ist der hypoxieinduzierte Faktor (HIF) zu 40 % stabilisiert. Ohne Sauerstoffsättigungswerte sähe es jedoch so aus, als wäre HIF erst bei ~5 % O_2 zu 40 % stabilisiert.

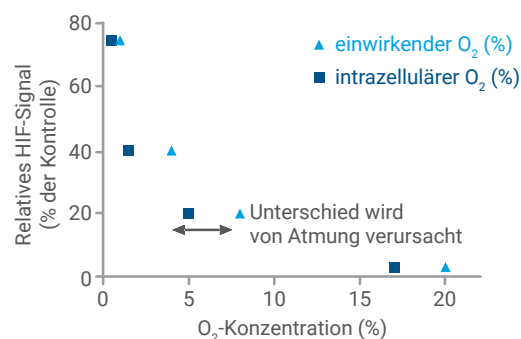


Abbildung 11: Stabilisierung von HIF gemessen mit einem Lumineszenz-HIF-Reporter in HT-1080-Zellen bei abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen. Die HIF-Stabilisierung hängt sowohl von der einwirkenden Sauerstoffkonzentration (hellblau) als auch vom Sauerstoffsättigungsgrad der Zellen ab (dunkelblau), gemessen mit Agilent MitoXpress Intra. Diese Daten belegen, dass falsche Schlussfolgerungen über den Zusammenhang zwischen Sauerstoffverfügbarkeit und HIF-Stabilisierung gezogen werden, wenn die Sauerstoffsättigung der Zellen nicht gemessen wird. (Daten mit freundlicher Genehmigung von Dr. Karl Morten, Universität Oxford, Großbritannien).

MitoXpress Intra Lösungen

Untersuchung des Krebsmetabolismus in hypoxischen Bedingungen

Dank Echtzeitüberwachung der zellulären Sauerstoffsättigung mit MitoXpress Intra können Forscher das Ausmaß der Hypoxie, die auf ein Zellmodell wirkt, genau bestimmen. Die MitoXpress Intra Analyse kann genau wie MitoXpress Xtra Analyse mit anderen Plattenlesegerät-Analysen kombiniert werden. Dazu gehören die Ermittlung von Lebensfähigkeit, MMP und ROS. Für die Krebsmetabolismus-Forschung sind diese Parameter besonders relevant, da der Zusammenhang zwischen der hypoxischen Tumorentwicklung, der metabolischen Flexibilität und dem Krebsphänotyp besonders signifikant ist.

Dies ist in Abbildung 12 beispielhaft dargestellt. In Multiplexmessungen wurde die zelluläre Sauerstoffsättigung (mit MitoXpress Intra) und die glykolytische Aktivität (mit der pH Xtra Glykolyse-Analyse) bestimmt. Die Messungen wurden bei hypoxischen und bei normalen Sauerstoffbedingungen durchgeführt und belegen die Auswirkung der Sauerstoffsättigung auf die glykolytische Aktivität.

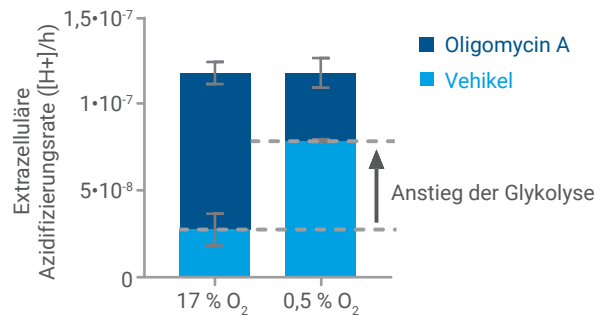
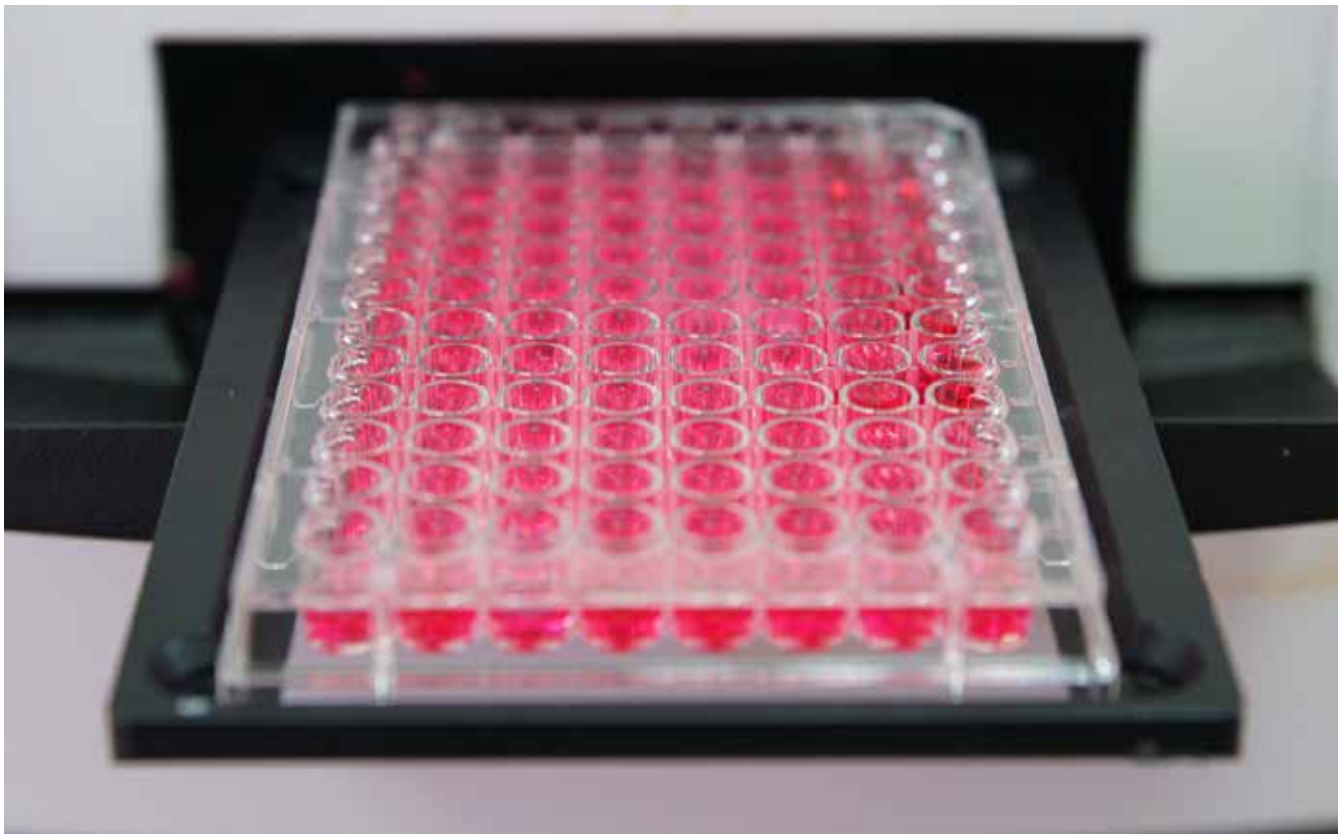


Abbildung 12: Multiplexmessungen – extrazelluläre Azidifizierung von A549-Zellen (gemessen mit der Agilent pH Xtra Glykolyse-Analyse) und intrazelluläre Sauerstoffkonzentrationen (gemessen mit der Agilent MitoXpress Intra Analyse) bei normalen und bei hypoxischen Bedingungen, die mit der Atmospheric Control Unit des Plattenlesegeräts hergestellt wurden. Die basale extrazelluläre Azidifizierungsrate der mit Trägerflüssigkeit behandelten Zellen verdreifachte sich bei Hypoxie (hellblau). Dagegen blieb die glykolytische Kapazität gleich, die durch Behandlung mit Oligomycin (dunkelblau, Hemmer der mitochondrialen ATP-Synthese) gemessen wird.

Die Vorteile von Agilent

Die Zell-Response ist vom Metabolismus abhängig. Daher gehören metabolische Messung zu den Grundfunktionsmessungen der Zellbiologie. Da eine Vielzahl von Fluoreszenz-Plattenlesegeräten mit den Agilent Metabolismussensoren kompatibel ist, entsteht ein umfassendes Lösungsangebot für *In-vitro*- Untersuchungen des Zellmetabolismus. Die hier dargestellten Applikationen zeigen beispielhaft, wie diese Assays zur Analyse des Metabolismus und der Funktion von Zellen eingesetzt werden können. Weitere Ressourcen, detaillierte Protokolle und Infos über lösliche metabolische Sensoren – und wie diese zur Beantwortung Ihrer Forschungsfragen eingesetzt werden können – finden Sie unter www.agilent.com oder wenden Sie sich direkt an cellanalysis.support@agilent.com.



Agilent Portfolio für die Zellanalyse

Unsere marktführenden Technologien für die Echtzeitanalyse von Lebendzellen haben Forschern in verschiedenen Forschungsbereichen geholfen, Grenzen zu überwinden.

Unter **www.agilent.com/chem/discoverxf** erfahren Sie mehr über das komplette Lösungs-Portfolio.

Mehr Infos

www.agilent.com/en/products/cell-analysis/mitoexpress-ph-xtra-consumables

Publikationsdatenbank

www.agilent.com/publications-database/

Zellreferenzdatenbank

www.agilent.com/cell-reference-database/

Webinare

www.agilent.com/en/training-events/eseminars/cell-analysis-webinar-series

Weltweiter technischer Support

cellanalysis.support@agilent.com

USA und Kanada

1-800-227-9770; Option 3 dann 8

Europa

Großbritannien: 0500 096 7632

Deutschland: 0800 180 66 78

Andere EU-Länder: +45 3236 9878

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

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Veröffentlicht in den USA, 16. April 2019
5994-0683DEE