



Promega

www.promega.com

Multiplexing von homogenen zellbasierten Assays

Abigail Farfan, M.A., Thomas Yeager, Ph.D., Rich Moravec, B.S., and Andrew Niles, M.S., Promega Corporation

Wissenschaftler möchten in vielen Fällen mehr als eine Art Daten aus einer Zellprobe erhalten, um so ein vollständigeres Verständnis der von ihnen untersuchten biologischen Prozesse zu bekommen. Hier beschreiben wir, wie Zellviabilitäts-, Zytotoxizitäts-, Apoptose- und Reporterassays in einer einzigen Probe sinnvoll kombiniert werden können.

Einleitung

Der Bedarf für hohen Probenumsatz in der modernen biomedizinischen Forschung hat Einzug in alle Bereiche – von der Nukleinsäureaufreinigung bis zu zellbasierten Assays – gehalten. Die neueste Generation zellbasierter Assays von Promega beinhaltet lumineszente und fluoreszente Methoden zur Messung von Zellviabilität, Zytotoxizität, und Apoptose sowie für Reporteranalysen. Damit können Forscher untersuchen, wie Zellen auf Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Mitogene, Strahlung, Effektoren und andere Signalmoleküle reagieren. Bei der Entwicklung neuer Medikamente sind diese Assays unverzichtbar, um Wirkstoffmoleküle auf ihre Toxizität und Wirksamkeit *in vitro* voraus zu sagen, bevor in Tierversuche oder klinische Studien investiert wird.

Dabei ist es oftmals sehr hilfreich, mehr als eine Art von Daten aus einer Probe zu gewinnen. Daher ist die Eignung eines Assays für das Multiplexing vorteilhaft. Zellbasierte Assays von Promega sind homogen, d.h. sie können direkt in den Zellkulturgefäßen durchgeführt werden, ohne das Medium zu entfernen oder die Zellen zu waschen. Dieses homogene Format erlaubt es, mehrere Assays durch Multiplexing zu kombinieren. So kann man zum Beispiel zunächst einen Fluoreszenz Assay verwenden, um Zytotoxizität oder Viabilität zu messen. Anschließend kann man einen lumineszenten Caspaseassay oder Reporterassay mit derselben Probe durchführen^(a). Multiplexing spart Zeit, Probenmaterial, Zellkulturreagenzien und seltene oder teure Testsubstanzen.

Im Bereich der Apoptosemessung bietet Promega ein breites Spektrum von fluoreszenten und lumineszenten Methoden an, um Caspase-3/7, Caspase-8 und Caspase-9 Aktivitäten zu bestimmen. Diese können sowohl parallel als auch

zusammen mit lumineszenten und fluoreszenten Zellviabilitäts-, Zytotoxizitäts-, und Reporterassays eingesetzt werden. Diese Methode liefert ein umfassenderes Verständnis darüber, wie die Behandlung mit einer Substanz Zellviabilität und/oder die Mechanismen des Zelltods beeinflusst.

Wie bei jedem homogenen Assay ist es auch beim Multiplexing erforderlich, dass die Assays für ihre speziellen experimentellen Systeme optimiert werden. Wir empfehlen daher die Durchführung angemessener Kontrollen, einschließlich separater Tests jedes einzelnen Assays. Die begleitende technische Literatur, die am Ende dieses Artikels aufgeführt ist, gibt weitere Informationen zu Hintergrund, Optimierung und Kontrolle jedes einzelnen Assays. Einen vollständigen Überblick darüber bieten Ihnen die Quellen 1, 2 und 4.

Multiplexing von Zellviabilitäts-, Zytotoxizitäts-, und Apoptoseassays

Der CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay bestimmt die Anzahl lebender Zellen in einer Kultur mittels Erfassung des Reduktionspotentials. Die Reduktion des im Assay enthaltenen fluorogenen Farbstoffes Resazurin zu Resorufin ist proportional zu der Zahl der vorhandenen metabolisch aktiven Zellen. Der CellTiter-Blue[®] Assay kann durch Multiplexing sowohl mit dem Caspase-Glo[®]3/7 Assay^(b, c), als auch mit dem Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay kombiniert werden.

Der CytoTox-ONE[™] Homogeneous Membrane Integrity Assay^(a) misst die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) in das umgebende Medium aus Zellen, deren Membran ihre Integrität verloren hat. Der Assay erfasst in einer Mischung von lebenden und toten Zellen die Zahl der toten Zellen. Das CytoTox-ONE[™] Reagenz ist für lebende Zellen nicht toxisch und kann daher direkt für die Zellen in Kultur eingesetzt werden.

Der CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay bestimmt die Zahl lebender Zellen in einer Kultur anhand der Quantifizierung des vorhandenen ATP, welches ein Indikator für metabolisch aktive Zellen ist. Er kann mit dem EnduRen[™] Live Cell Substrate (Abbildung 2) sowie dem CytoTox-ONE[™] Homogeneous Membrane Integrity Assay kombiniert werden.

Multiplexing von Apoptoseassays

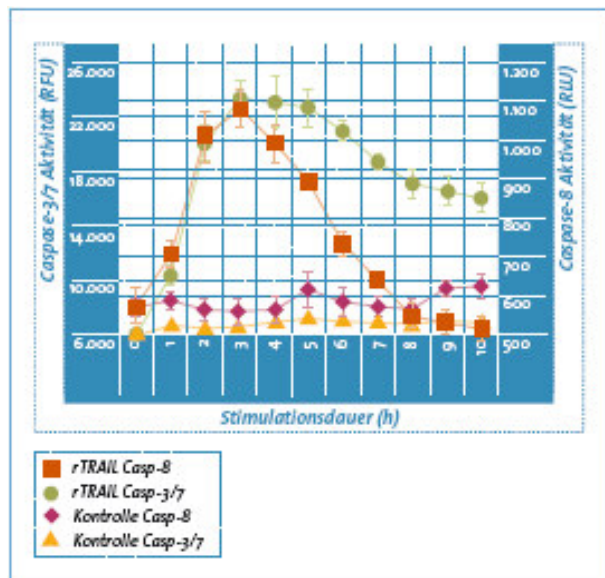
Der Caspase-Glo[®] Assay misst Caspaseaktivitäten unter Verwendung eines luminogenen Substrats und einer stabilisierten Luciferase. Zusätzlich ist das Reagenz für die Zelllyse optimiert. Zugabe des Caspase-Glo[®] Reagenz in einem „add-mix-measure“ Format führt zur Zelllyse, gefolgt von der Spaltung des Substrats durch die Caspase. Diese Spaltung setzt Aminoluciferin frei, das durch die Luciferase unter Erzeugung eines „glow-type“ lumineszenten Signals verbraucht wird. Das Signal ist proportional zu der vorhandenen Caspaseaktivität. Derzeit stehen Caspase-Glo[®] Assays zur Verfügung, die die Aktivität von Caspase-3/7, Caspase-8, und Caspase-9 messen. Diese Assays können durch Multiplexing mit Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätsassays angewendet werden. Die Caspase-Glo[®] 8 oder 9 Assays können zusätzlich durch Multiplexing mit dem Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay kombiniert werden, um so ein vollständiges Bild der Signalübertragung bei der Apoptose zu erhalten (Abbildung 1).

Der Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay misst active Caspase-3 und -7. Er enthält ein fluorogenes Caspase-3/7 Peptidsubstrat ((Z-DEVD)₂-Rhodamin-110) und einen optimierten, bifunktionalen Puffer zur Zelllyse und Aktivitätsmessung. Der Puffer lysiert Zellen und unterstützt die optimale enzymatische Aktivität von Caspase-3/7. Substrat und Puffer sind im Apo-ONE[®] Caspase-3/7 Reagenz kombiniert und können direkt zu den Proben gegeben werden. Aktivierte Caspase-3/7 spaltet die DEVD Peptidsequenz und setzt Rhodamin-110 frei, das bei der Anregungswellenlänge von 498nm detektiert wird. Die Menge des entstandenen Rhodamin-110 entspricht der in der Probe vorhandenen Menge aktiver Caspasen-3/7.

Multiplexing von lumineszentem Caspase-8 mit fluoreszentem Caspase-3/7 Assay (Abbildung 1)

Jurkat Zellen wurden ausgesät und alle 60 Minuten (über einen Zeitraum von 10 Stunden) mit 100 ng/ml rTRAIL stimuliert. Kontrollzellen wurden mit 10% FCS in RPMI 1640 behandelt. Zur Bestimmung der Caspaseaktivitäten wurde anschließend pro Well 1 Volumen Caspase-Glo[®] 8 Reagenz zugegeben, in dem auch Apo-ONE[®] Caspase-3/7 Substrat gelöst war. Nach 1 Stunde Inkubation erfolgte die Lumineszenz-Messung der Caspase-8 Aktivität und die Fluoreszenz-Bestimmung (485nm_{Ex}/530nm_{Em}) von Caspase-3/7 Aktivität.

Der Versuch zeigt die Wirkung von rTRAIL auf Initiator- (Caspase-8) und Effektor-Caspasen (Caspase-3/7). Die simultane Detektion beider Caspasen ermöglicht in einem Schritt, das Aktivierungsprofil zu analysieren und abzubilden.



Multiplexing von Reporterassays mit Zellviabilitäts- und Apoptoseassays

Das EnduRen™ Live Cell Substrate ^(c,d,e) ist ein nicht-lytischer Assay, der die wiederholte Messung von *Renilla* Reporteraktivität über einen bestimmten Zeitraum erlaubt. Er kann sowohl durch Multiplexing mit Zellviabilitäts- oder Apoptoseassays als auch mit anderen lytischen Assays kombiniert werden. Das Multiplexing eines Reporterassays mit einem Zellviabilitätsassay erlaubt es, die Ergebnisse in Bezug auf die Zellviabilität zu normalisieren und relative Messfehler bei den Ergebnissen zu reduzieren (Abbildung 2). Das EnduRen™ Live Cell Substrate bietet außerdem auch die Möglichkeit, Caspaseaktivität und Reporteraktivität in derselben Probe zu bestimmen.

Zusammenfassung

Multiplexing ist ein effizienter Weg, um Daten aus zellbasierten Assays zu normalisieren und dadurch komplexe zelluläre Prozesse besser zu verstehen. Das breite Spektrum homogener zellbasierter Assays von Promega bietet die Flexibilität und die Möglichkeit, komplexe zelluläre Vorgänge zu untersuchen.

Ausführliche Multiplexing Protokolle zu den Anwendungsbeispielen sind im Internet unter <http://www.promega.com/de/multiplexing/> dargestellt.

Literatur

1. Riss, T. *et al* (2003) *Cell Notes* **6**, 6-12.
2. Niles, A. *et al*. (2004) *Cell Notes* **9**, 11-14.
3. Riss, T. and Moravec, R. (2003) *Promega Notes* **83**, 10-13.
4. Riss, T. and Moravec, R. (2004) *Assay Drug Dev. Technol.* **2**, 51-62.

^(a) Patent Pending.

^(b) U.S. Pat. No. 6,602,677, Australian Pat. No. 754312 and other patents pending.

^(c) The method of recombinant expression of Coleoptera luciferase is covered by U.S. Pat. Nos. 5,583,024, 5,674,713 and 5,700,673.

^(d) Certain applications of this product may require licenses from others.

^(e) This product does not convey a license to use recombinant *Renilla* luciferase under U.S. Pat. Nos. 5,292,658, 5,418,155 and related patents. Promega sells licensed *Renilla* luciferase vectors, which may be used in conjunction with this product.

Apo-ONE, Caspase-Glo, CellTiter-Blue und CellTiter-Glo are registered trademarks of Promega Corporation. CytoTox-ONE und EnduRen are trademarks of Promega Corporation.

Multiplexing von *Renilla* Reporterassays mit einem lumineszenten Zellviabilitätsassay

(Abbildung 2)

Mit *Renilla* Luciferase stabil transfizierte HeLa Zellen wurden mit 10.000 Zellen/Well in einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät. EnduRen™ Live Cell Substrate wurde 1:1.000 in Kulturmedium verdünnt und zu den Wells pipettiert. rTRAIL wurde mit den entsprechenden Konzentrationen zu den Wells zugegeben. *Renilla* Luciferase Aktivität wurde nach einer Inkubationsdauer von 16 Stunden gemessen. Anschließend wurde CellTiter-Glo® Reagenz im Verhältnis 1:1 zu jedem Well gegeben und die Zellviabilität ermittelt.

