

## Nieuwe methode voor het bepalen van de mitochondriële membraanpotentiaal in lymfocyten met flowcytometrie

J. HESSELS<sup>1</sup>, M. van WIJNEN<sup>1</sup>, R. WENSINK<sup>2</sup> en H.H.M. EIDHOF<sup>2</sup>

### Inleiding

Mitochondriën zijn de energiecentrales in elke cel. Hierin vinden vele metabole processen plaats, zoals de  $\beta$ -oxidatie van vetzuren en de citroenzuurcyclus. Bij deze processen komen elektronen vrij die langs de verschillende complexen van de ademhalingsketen worden getransporteerd en waarbij protonen over de mitochondriële binnenmembraan worden getransporteerd. Deze protonengradiënt is de onmiddellijke energiebron voor de mitochondriële ATP-productie. Het transport van deze elektronen en protonen zorgt voor een hoog elektrochemische gradiënt (mitochondriële membraanpotentiaal; MMP) van -190 mV. Naast een centrale rol in de cellulaire ATP-productie vervullen mitochondriën een cruciale rol in de controle van apoptose. Depolarisatie van de MMP zorgt voor een release van cytochroom C in het cytoplasma en activatie van de proteolytische cascade die zal resulteren in apoptose. Bepaling van het MMP geeft derhalve inzicht in zowel het mitochondriële metabolisme als het proces van apoptose.

JC-1 vertoont een MMP-afhankelijke accumulatie in de mitochondriële matrix en is zeer geschikt voor de analyse van de MMP en dus voor de bestudering van de oxidatieve en metabole status van de cel. JC-1 laat een concentratieafhankelijke emissiefluorescentie zien en geeft een verschuiving van de emissiefluorescentie van 525 nm (groen) bij een lage concentratie (monomeren) naar 590 nm (rood) bij een hoge concentratie (J-aggregaten). De rode fluorescentie bij 590 nm wordt gebruikt als maat voor MMP. In gezonde cellen zal JC-1 in de mitochondriën accumuleren en naast een groene ook een rode emissiefluorescentie vertonen. In apoptotische cellen of in cellen waarbij de MMP verstoord is, door bijvoorbeeld een defect in de ademhalingsketen, zal JC-1 in het cytoplasma blijven en alleen een groene emissiefluorescentie geven (1).

In deze studie is de flowcytometrische bepaling van de MMP in lymfocyten met behulp van JC-1 geoptimaliseerd.

### Materiaal en Methoden

EDTA- of heparinebloed (1 ml) wordt gelyseerd in ammoniumchloride, bicarbonaatbuffer. De pellet wordt gewassen met PBS, 0,2% BSA en leukocyten worden geresuspendeerd in Leibowitz-medium met 0,2% BSA

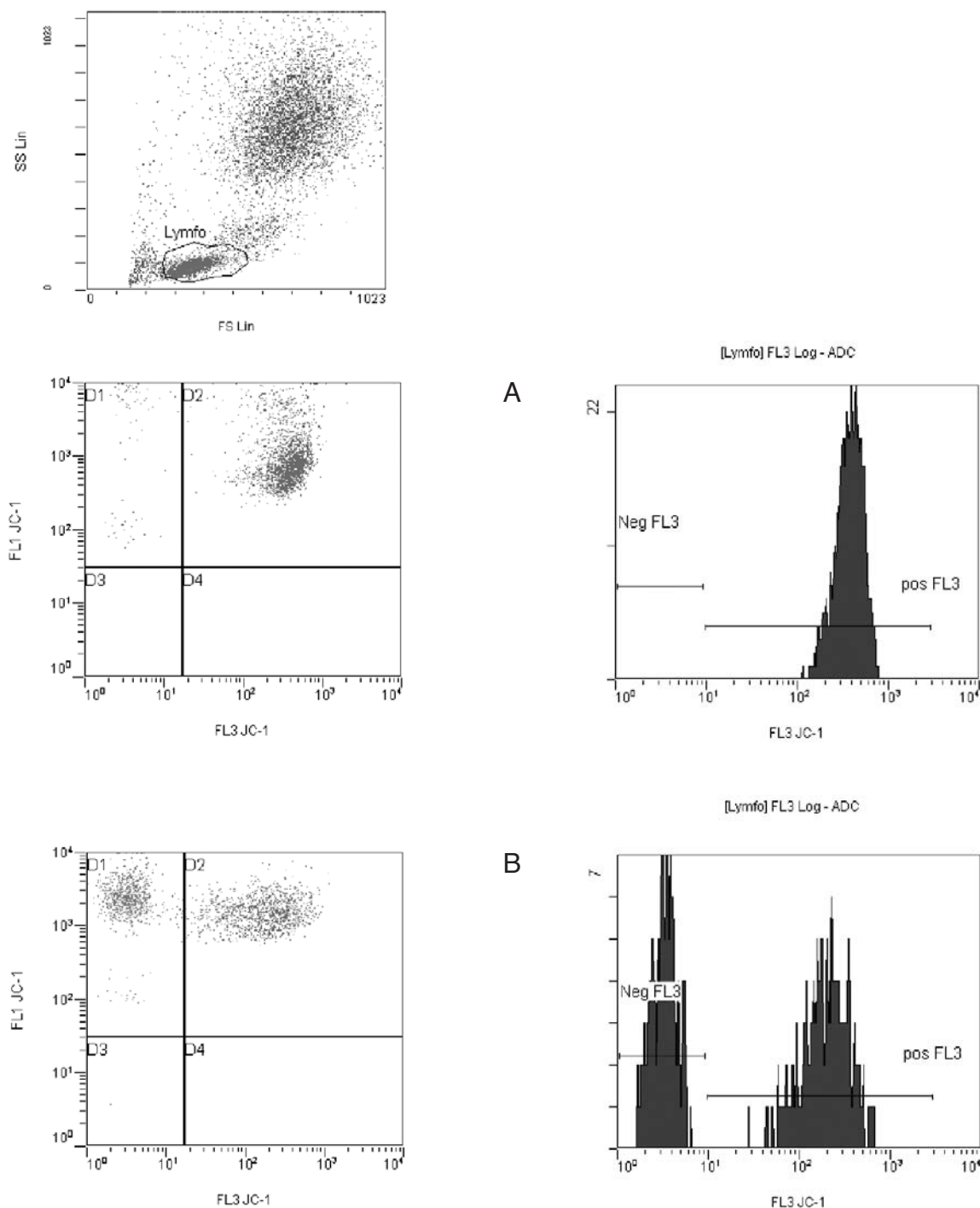
(eindconcentratie leuko's  $3,0 \cdot 10^9/L$ ). Vervolgens wordt 50  $\mu$ l celsuspensie 2 uur bij 37°C geïncubeerd met 0,5 ml Leibowitz, 0,2% BSA en de gewenste remmers. 20  $\mu$ l JC-1 (7,1  $\mu$ M) in 31% alcohol, wordt in combinatie met cyclosporine (0,2 g/l) toegevoegd en na 15 minuten bij 37°C worden de buizen in het donker op ijs gezet. De flowcytometrische analyse wordt uitgevoerd op een FC 500 (Beckman Coulter) met een excitatiegolflengte van 488 nm. Binnen de lymfocytenpopulatie wordt de fluorescentie in FL-3 (620 nm) en FL-1 (525 nm) geanalyseerd. Het resultaat worden uitgedrukt als %FL-3-positieve cellen en is een maat voor het behoud van de MMP.

### Resultaten

De JC-1-emissiefluorescentie wordt gemeten in FL-3 (620 nm). Aangezien dit aan het einde zit van het JC-1-spectrum zullen kleine verschuivingen gemeten worden, waardoor de gevoeligheid van de methode toeneemt. Voor het verkrijgen van reproduceerbare resultaten blijkt de stabiliteit van de JC-1-oplossing essentieel. Alcohol vergroot de oplosbaarheid van JC-1, met als gevolg een betere reproduceerbaarheid van de experimenten. Daarnaast blijkt cyclosporine toevoeging van groot belang. Cyclosporine houdt de cytosolaire JC-1-concentratie constant, middels remming van P-glycoproteïnepompen in de plasmamembraan (2). De pH van het medium is kritisch en pyruvaat blijkt een essentiële component in het medium te zijn voor behoud van de MMP (3).

Na optimalisatie van de methode met betrekking tot de JC-1-oplosbaarheid, de JC-1-concentratie, het gebruik van cyclosporine en het medium is de methode gevalideerd met specifieke ademhalingsketenremmers. Na incubatie met verschillende concentraties antimycine A (complex-III-remmer) is een concentratieafhankelijke afname van het % FL-3-positieve cellen te zien (figuur 1). Dit betekent dat er, zoals verwacht, na remming van de ademhalingsketen een verlies van de MMP is opgetreden. De test blijkt zeer gevoelig, aangezien er al bij zeer lage concentraties (0,5  $\mu$ g/l) al een verlies van de MMP wordt gemeten. Dezelfde resultaten zijn verkregen met rotenon (complex-I-remmer) en azide (complex-IV-remmer) en met dinitrofenol (complex-V-remmer). De reproduceerbaarheid van de methode is bepaald door 46 verschillende monsters (van gezonde labmedewerkers) in duplo te meten. De within-run-variatiecoëfficiënt bij een gemiddelde van 95 %FL3-positieve cellen was 0,6%. Het 2,5-97,5-percentielinterval voor deze normale populatie was 91,4-97,8%.

*Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Deventer Ziekenhuis, Deventer; Klinisch Laboratorium<sup>2</sup>, Twenteborg Ziekenhuis, Almelo.*



**Figuur 1.** Het effect van antimycine A op de MMP in lymfocyten. Leukocyten zijn geïncubeerd zonder (A) en met (B) 0,5 µg/L complex-III-remmer antimycine A. De MMP-afhankelijke JC-1-accumulatie in de mitochondriën wordt gemeten in FL-3.

### Conclusie

Het gebruik van JC-1 voor de flowcytometrische analyse van de MMP in cellen is niet nieuw. Hier beschrijven wij echter een geoptimaliseerde flowcytometrische bepaling, die door de keuze van het meetkanaal, vergroten van de JC-1-oplosbaarheid en de toevoeging van cyclosporine een zeer gevoelige en reproduceerbare methode is om veranderingen in de MMP te meten. Concluderend presenteren wij hier een methode die geoptimaliseerd is voor het monitoren van de MMP en dus zeer geschikt is om de oxidatieve en metabole status van lymfocytenpopulaties te bestuderen.

### Literatuur

1. Cossarizza A, Bacarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 197: 40-45.
2. Kuhnle JM, Perrot JY, Faussat AM, Marie JP, Schwaller MA. Functional assay of multidrug resistant cells using JC-1, a carbocyanide fluorescent probe. *Leukemia* 1997; 11: 1147-1153.
3. Hessels J, Wensink R, Wijnen M van, Eidhof HHM. Flowcytometrisch onderzoek naar de biochemische modulatie van de mitochondriële membraanpotential in lymfocyten. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2004; 29: 59.