Reinstwasser als Bestandteil multi-parametrischer Messverfahren in der Wirkstoffforschung

Sven P. Wichert[1], Elmar Herbig[2], Michael C. Wehr[1]

[1]Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen, jetzt Systasy Bioscience GmbH, München
[2]Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen

Korrespondenz: Michael C. Wehr, Systasy Bioscience GmbH, Adams-Lehmann-Str. 56, 80797 München; e-mail: wehr@systasy.de

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / *For use with permission of the publisher*

ZUSAMMENFASSUNG

Reinstwasser wird für verschiedene molekular- und zellbiologische Anwendungen in der Biotechnologie eingesetzt, wie z. B. in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Weiterhin findet Reinstwasser als Bestandteil multiparametrischer zellbasierter Assays Anwendung. Diese Assays, die EXTassays genannt und in der Wirkstoffforschung eingesetzt werden, basieren auf genetischen Sensoren, die mit molekularen Barcode-Reportern ausgelesen werden und eine umfassende Profilierung von zellulären Signalen ermöglichen. Diese spezifischen Assays werden mit der Hochdurchsatz-Sequenzierungs-Technologie *Next Generation Sequencing* (NGS) kombiniert, sodass in einer Messung große Datensätze erhoben werden können. In einem experimentellen Beispiel wurde die differentielle Signalantwort, die ein spezifischer Stimulus (*EGF-like domain*) gegenüber einem Breitbandstimulus (Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Serum) verursacht, untersucht. Zellen, die mit *EGF-like domain* stimuliert wurden, zeigten eine sog. *Immediate-early-Gene*-Antwort, während PMA und Serum Signalwege der Immunantwort hochregulierten. Zugabe von Lapatinib führte zu einer kompletten Inhibierung von EGF-like-domain-vermittelten Signalen, während PMA/Serum-induzierte Antworten nur teilweise inhibiert wurden. Das Reinstwasser wurde in zahlreichen, sensitiven experimentellen Schritten, z. B. bei der Amplifikation der Barcode-Reporter per PCR und dem NGS-Lauf, erfolgreich eingesetzt. Es kann somit problemlos für molekularbiologische Arbeiten verwendet werden, die eine hohe Wasserqualität erfordern.

KEY WORDS

- Reinstwasser
- EXTassays
- multi-parametrische zellbasierte Assays
- Profilierung zellulärer Signale

Pharm. Ind. 77, Nr. 5, 756–761 (2015)

ABSTRACT

Ultrapure water as a component of multi-parametric assays used in drug discovery

Applications for ultrapure water are wide-spread within biotechnology, as it is used for cell culture, biochemistry, and molecular biology, such as *polymerase chain reactions (PCR)*. Here, the specific use of ultrapure water generated from the arium® pro VF device is described as an integral component of cell-based multi-parametric profiling assays. These assays, termed EXTassays, are used at early stages of drug discovery. Within these assays, cellular signaling events are captured by molecularly barcoded reporters, resulting in the acquisition of large data sets, which are obtained within one measurement using *Next Generation Sequencing* (NGS). In a sample experimental setup, differential signalling properties were addressed, which were either caused by a specific stimulus (EGF-like domain) or a broad stimulus (PMA and serum). EGF-like domain-treated cells displayed an immediate early gene response, whereas the addition of PMA and serum caused an activation of immune response pathways. Addition of lapatinib inhibited virtually all responses induced by EGF-like domain, whereas PMA/serum-mediated responses were only partially reverted. Notably, ultrapure water was effectively used in various processing steps, which, amongst others, included the isolation of molecular barcode reporters, their amplification using various PCR strategies, and the NGS run. Taken together, the ultrapure water applied meets all the criteria to be used in sensitive applications of molecular biology.

© ECV · Editio Cantor Verlag, Aulendorf (Germany)

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / For use with permission of the publisher

1. Einleitung

In der biomedizinischen Grundlagen- und der pharmarelevanten Wirkstoffforschung werden vermehrt zellbasierte Assays mit multiparametrischen Messverfahren kombiniert, um hoch komplexe Krankheitsprozesse bzw. Substanzwirkungen besser untersuchen zu können. Diese Verfahren beinhalten die Implementierung molekular- und zellbiologischer Applikationen, die wiederum als Grundlage Reinstwasser benötigen, so z. B. bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) oder der Kultivierung von Zellen.

In zellbasierten Assays werden zelluläre Prozesse vor bzw. nach Substanzzugabe bestimmt, wobei meist relative Veränderungen definierter Molekülklassen (u. a. Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA), mikro-RNAs, Proteine) bestimmt werden. Eine direkte Wirk- und Funktionsanalyse von biologisch relevanten Molekülen, wie z. B. von medizinisch-chemisch wirksamen Substanzen und Antikörpern, auf bestimmte zelluläre Prozesse lässt sich nur mit sehr hohem Aufwand an Materialeinsatz und Reinheit (z. B. bzgl. des Wassers) der verwendeten Lösungen erzielen. Daher rücken multiparametrische Messverfahren immer stärker in den Fokus.

Beschreibung des Messverfahrens

Diese multiparametrischen Messverfahren erlauben es, zeitgleich die Reaktion einer großen Anzahl von zellulären Zielmolekülen (sog. Targets) auf die Zugabe von Wirksubstanzen zu analysieren und somit zelluläre Wirkprofile erstellen zu können. Diese umfassenden und aufwendigen Analysen sind insbesondere erforderlich, um die gewünschte medizinische Wirkung zu belegen und unerwünschte Nebenwirkungen zu erkennen. Auch für die Erschließung neuer Anwendungsfelder für bereits zugelassene Medikamente sind sie bedeutend. Weiterhin bietet die Erhebung größerer Datenmengen durch multiparametrische Messverfahren enorme Kostenvorteile, die z. B. mit der EXTassay-Technologie [1] realisiert werden können.

Die Technologie basiert auf molekularen Barcode-Reportern und ermöglicht neuartige und hoch parallelisierte Messverfahren (EXT steht für *Expressed Sequence Tag*; EXTs sind kurze synthetische RNA-Moleküle mit spezifisch kodierter Sequenz von 49 bp Länge). So erlaubt die Technologie die Erhebung von mehreren Mio. Datenpunkten innerhalb einer Messung, da einzelne zelluläre Ereignisse durch molekulare Barcodes mittels Sequenzierung analysiert werden können [1] (Abb. 1a). Klassische Reporteranalysen ermöglichen die Messung von nur einem oder zwei Datenpunkten pro Ansatz, sodass zur Erhebung vieler Datenpunkte maschinelle Lösungen eingesetzt werden. Das spezifische Assay-System hingegen basiert auf Reportermolekülen, sog. EXT-Reportern oder auch EXT-Barcodes, die molekulare Adressen tragen und somit Rückschlüsse auf Ort und Zeit ihrer Expression erlauben. Mithilfe dieser Barcodes können viele verschiedene zelluläre Prozesse gleichzeitig identifiziert und funktionell abgebildet werden, z. B. Aktivierungen von Rezeptoren und weitere nachgeschaltete, zelluläre Signale (Abb. 1b).

Bei diesen multiparametrischen Assays wird als Auslesesystem für eine funktionelle und quantitative Analyse der verschiedenen zellulären Vorgänge die Hochdurchsatz-Sequenziertechnologie (*Next Generation Sequencing*, NGS) eingesetzt. NGS wurde zunächst verwendet, um Genome zu sequenzieren [2]. Die rasante Weiterentwicklung des NGS führte dazu, dass NGS nun auch bei medizinischen Aspekten, wie der therapeutischen Diagnostik und der Identifizierung von genetischen Krankheitsrisiken, zum Einsatz kommt. Im Folgenden sollen die Einsatzmöglichkeiten von Reinstwasser in den verschiedenen Stadien der vielschichtigen Methode beschrieben werden.

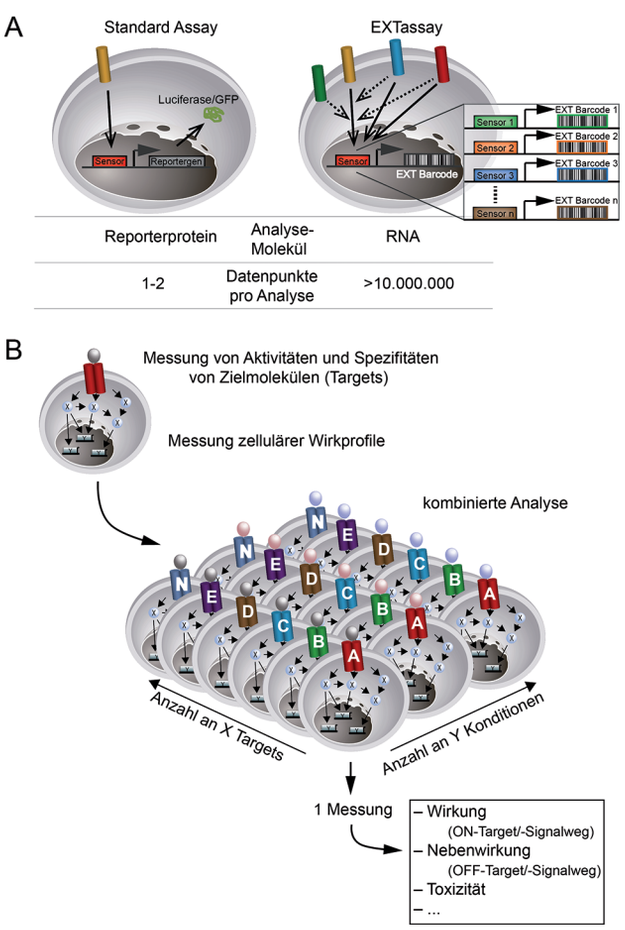


Abb. 1: A) Die spezifischen Assays erlauben die simultane Analyse von mehreren zellulären Aktivitäten innerhalb einer Messung. Im Gegensatz zu klassischen Reportergen-Assays werden mit den spezifischen Assays mehr als 10 Mio. Datenpunkte pro Experiment erhoben. B) Die Assays bilden Spezifitäten und zelluläre Wirkprofile von Substanzen ab. Wirkprofile X-verschiedener Target-Moleküle unter Y-unterschiedlichen Konditionen werden in einer Messung simultan erfasst (Quelle: Sofern nicht anders angegeben, alle Abb. von den Autoren).

Pharm. Ind. 77, Nr. 5, 756–761 (2015)
© ECV · Editio Cantor Verlag, Aulendorf (Germany)

2. Material und Methoden

Anwendungen von Reinstwasser für multiparametrische Messverfahren

Reinstwasser spielt bei den verschiedensten Schritten innerhalb eines Experiments mit den spezifischen Reportern eine entscheidende Rolle: So wurde autoklaviertes Reinstwasser zur Befeuchtung der Zellkultur-Brutschränke eingesetzt, um eine keim- und sporenfreie Inkubation der Zellen zu gewährleisten. Auch für die Bestimmung molekularbiologischer Parameter (z. B. DNA- und RNA-Konzentrationen) wurde Reinstwasser benutzt.

Weiterhin wurde Reinstwasser bei der Aufbereitung der Proben für das NGS verwendet, also der Aufreinigung der EXT-Reporter mittels RNA-Isolierungskit, dem Schreiben der cDNA sowie den nachfolgenden PCR-Schritten, die zur Amplifikation des Reportermaterials für die Hochdurchsatz-Sequenzierungen benötigt werden. Ebenfalls wurde das Reinstwasser auch bei den abschließenden NGS-Läufen eingesetzt, die mit einer *Ion Torrent Personal Genome Machine*® (PGM™ Sequenziergerät) der Firma Life Technologies (siehe unten) durchgeführt wurden.

Das für die jeweiligen Verfahrensschritte mit arium® pro VF (Abb. 2) aufbereitete Reinstwasser wurde wie schon in Nitzki und Herbig [3] beschrieben hergestellt.

Zellkultur

Die Kultivierung von PC12-tet-OFF (PC12-OFF) Zellen (Clontech) erfolgte in DMEM-Medium (Glukose-Konzentration von 1 g/l, Lonza) auf Poly-L-Lysin beschichteten Platten in einem mit Reinstwasser befeuchteten Luft-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2. Das Medium wurde mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 5 % Horse Serum (HS), 1 % Penizillin-Streptomycin und 1 % GlutaMAX (Invitrogen) supplementiert.

Transfektion der Assay-Reportervektoren

PC12-OFF Zellen wurden in Suspension mit den Assay-Reportervektoren transfiziert. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert und in DMEM (supplementiert mit nur 1 % FBS) mit einer Dichte von 10^6 Zellen pro ml resuspensiert. DNA-Lipofectamine-Komplexe wurden mit 1 µg DNA und 4 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in jeweils 100 µl OptiMEM Medium pro 1,5 × 10^6 Zellen präpariert. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch mit der Zellsuspension vereinigt und bei 37 °C für 4 h inkubiert. Um die Transfektionsreagenzien zu entfernen, wurden die Zellen mit DMEM-Medium (1 % FCS) einmal gewaschen. Die Zellen wurden vor der Analyse unter identischen Bedingungen kultiviert. Für die Assays wurden 5 ng pro Plasmid DNA und pro EXT Reporterkonstrukt verwendet. Für jedes cis-regulatorische Element wurden 3–5 Reporterkonstrukte mit unterschiedlichen EXTs kloniert.



Abb. 2: Aktuelles Reinstwassersystem arium® pro VF (Quelle: Sartorius Lab Instruments).

Aufbereitung der Sequenzierproben

RNA-Extraktion

Die RNA wurde mithilfe des RNeasy-Kits von Qiagen einschließlich eines *on-column*-DNAse-I-Verdaus laut Protokoll des Herstellers präpariert. Nach der RNA-Aufreinigung wurden die Proben mit einem halben Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (in Reinstwasser angesetzt) und 3 Volumen 100 % Ethanol präzipitiert. Für die cDNA-Synthese wurden 1 µg extrahierte RNA, die Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) und ein 120 pmol Random-Nanomer-Primer verwendet. Die RNA-Reinheit und mögliche DNA-Kontaminationen wurden mit Kontrollen, die keine Reverse-Transkriptase enthielten (-RT), überprüft.

Amplifikation der EXT-cDNA-Produkte mittels einer dekodierenden PCR

Decoding-PCRs wurden mit einer HotStarTaq Plus Polymerase, dNTPs (beide von Qiagen), Reinstwasser und bei 30 Zyklen durchgeführt (Zyklus: 30 s bei 95 °C, 30 s bei 59 °C, 30 s bei 72 °C) (Abb. 3). Als Ausgangsmaterial diente die reverstranskribierte cDNA. Bei der Negativkontrolle (letzte Spur) wurde keine cDNA eingesetzt.

Coding-PCRs wurden ebenfalls mit der HotStar Taq Plus Polymerase und unter Verwendung von Reinstwasser durchgeführt, jedoch bei nur 10 Zyklen (Zyklus: 30 s bei 95 °C, 20 s bei 58 °C, 20 s bei 72 °C) (Abb. 3). Als Ausgangsmaterial wurde jeweils 1 µl einer 1:10-verdünnten Decoding-PCR-Probe verwendet, in der Negativkontrolle wurde kein Ausgangsmaterial eingesetzt. Alle PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel visualisiert und überprüft.

Sequenzierung nach der Semikonduktor-Methode

Die Sequenzierung der EXT-Reportermoleküle wurde per NGS unter Verwendung des Sequenziergerätes (Abb. 4) durchgeführt. Diese Sequenzierungstechnologie basiert auf der sequenziellen Detektion von Protonen, die während des Polymerisationsprozesses der DNA freigesetzt werden. Je nach der zu polymerisierenden Base (Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin) am Komplementärstrang wird das entsprechende dNTP inkorporiert und ein Proton freigesetzt, das mit Hilfe von Ionensensoren detektiert wird [4].

Sequenzanalyse

Zur Analyse der Sequenzierdaten wurden einzelne UNIX-basierte Werkzeuge aus dem FastX-Toolkit [5] verwendet (FASTQ-to-FASTA Konvertierungsprogramm und FASTX Barcode Splitter). Die Präsenz und Iden-

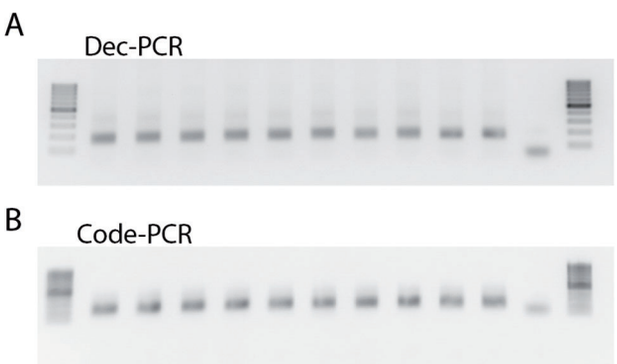


Abb. 3: Qualitätskontrolle der EXT-amplifizierenden PCR-Schritte. Agarose-Gele von A) Decoding-PCR, B) Code-PCR. Die jeweils letzte Spur gibt die Negativkontrolle mit Reinstwasser an; sichtbar sind hier jeweils Primer-Dimere.

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / *For use with permission of the publisher*

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / For use with permission of the publisher

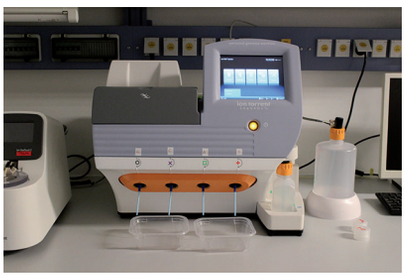


Abb. 4: Ion Torrent Personal Genome Machine®(PGM™ Sequenziergerät) (Quelle: Labor der Systasy Bioscience GmbH, München).

tität eines jeden EXT wurde durch eine BLAST-Analyse [6] auf eine selbsthergestellte EXT-Referenz-Bibliothek bestimmt und differenziell exprimierte EXTs wurden mithilfe von R-Skripten [7] identifiziert und quantifiziert.

3. Ergebnisse

Die multiparametrische Assay-Plattform wurde in Kombination mit NGS und unter Verwendung von Reinstwasser eingesetzt, um eine Vielzahl an nachgeschalteten zellulären Reaktionen zu messen, die nach a) einem spezifischen Stimulus, b) einem Breitband-Stimulus oder c) nach Zugabe eines spezifischen Inhibitors auftreten. In diesem Fall wurden PC12-Zellen mit 33 verschiedenen EXT-Reportern transfiziert, die insgesamt die Aktivitäten von elf unterschiedlichen Signalwegen abbilden können. Für die Applikation eines spezifischen Stimulus (a) wurde der ERBB4-Rezeptor transfiziert. Der ERBB4-Rezeptor spielt eine Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, u. a. in der Entwicklung des Herzens und der funktionellen Differenzierung von Neuronen, aber auch bei der Entstehung von Krebs und psychiatrischen Krankheiten wie der Schizophrenie [8, 9]. Der ERBB4-Rezeptor wurde durch den Liganden Neuregulin1 bzw. durch dessen bioaktiven und löslichen Teil, der *EGF-like domain* (EGFld), aktiviert. Diese Aktivierung konnte mit den multiparametrischen Assays abgebildet werden [1, 10]. Die EGFld vermittelte Aktivität von ERBB4 wurde spezifisch durch den ERBB-Kinase-Inhibitor Lapatinib (c), der auch als Therapeutikum gegen Krebs eingesetzt wird, geblockt. Als Breitband-Stimulus (b) wurde eine Kombination aus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Serum-Stimulation gewählt.

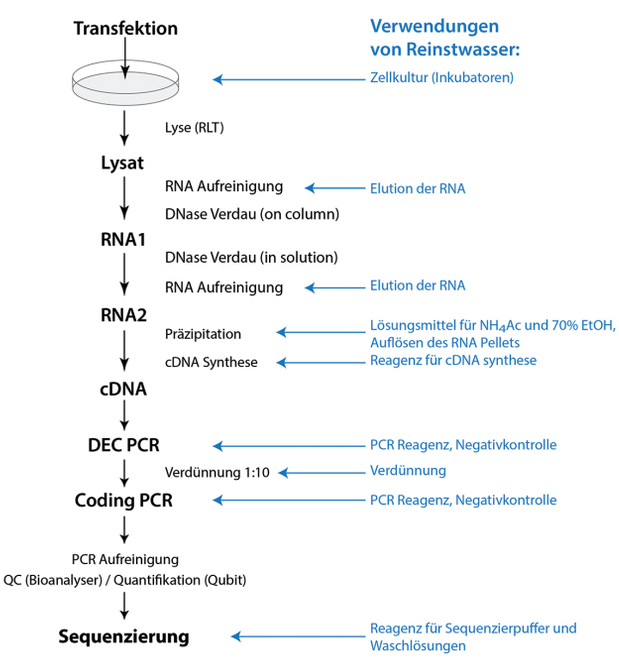


Abb. 5: Arbeitsablauf für die Aufbereitung von Sequenzierproben und die Verwendung von Reinstwasser bei den einzelnen Arbeitsschritten.

Reinstwasser als integrativer Bestandteil zur Aufbereitung der Sequenzierproben

Das Reinstwasser wurde innerhalb mehrerer Schritte der Probenpräparation erfolgreich verwendet (Abb. 5). Insbesondere fand es bei molekularbiologischen Arbeiten Verwendung, wie z. B. für die PCRs zur Probenaufbereitung (Decoding-PCR und Code-PCR, Abb. 3) und für die Sequenzierreaktionen, die mit dem PGM™ Sequenziergerät durchgeführt wurden (Abb. 6). Dabei erforderte das Sequenzieren mit dem Sequenziergerät gemäß Anleitung eine hohe Wasserqualität mit einem Leitwert von 18 MΩ × cm (siehe Ion-Torrent-Sequenziergerät-*User-Guide* [11]). Ohne diese Wasserqualität ist eine zuverlässige Sequenzierung nicht gewährleistet. Das hier für die Versuche erfolgreich eingesetzte Reinstwasser war frei von nachweisbaren Mengen an RNasen und DNasen (Konz. RNasen und DNasen unterhalb der Nachweisgrenze von 20 ng/ml bzw. 80 ng/ml) und lieferte mit einer sehr niedrigen TOC Konzentration (≤ 2 ppb) und einem Leitwert von 18,2 MΩ × cm kompensiert auf 25 °C, die für die Versuche geforderte gleichbleibende und stabile Qualität.

Quantitative und kinetische Analyse von zellulären Signalaktivitäten

Die quantitative und kinetische Analyse der nachgeschalteten Signalaktivitäten zeigt ein differentielles Aktivierungsmuster, das jeweils spezifisch für den jeweiligen Stimulus ist (Abb. 7). So wurden in mit EGFld behandelten Zellen verstärkt die *Immediate-early*-Gene (das sind Gene, die unmittelbar nach einer Stimulation und über MAP-Kinase-Kaskaden aktiviert werden, z. B. EGR1, EGR2, FOS, FOSB und JUN [12]) aktiviert, wogegen Signalwege, die den Stressantworten zugeteilt werden (IL6, IL8, und NFkB), nicht aktiviert wurden (Abb. 7, Spalten 1–4). Zellen, die mit EGFld und dem Inhibitor Lapatinib behandelt wurden, weisen bei allen hier gemessenen Signalwegen eine nahezu komplette Inaktivierung auf (Abb. 7, Spalten 5–8). In mit PMA/Serum stimulierten Zellen wurden verstärkt Stressantworten induziert (Abb. 7, Spalten 9–12), die dagegen nach Behandlung mit Lapatinib nur teilweise inhibiert wurden (Abb. 7, Spalten 13–16) (vgl. z. B. Datenpunkte bei 2 h nach Zugabe).

Reinstwasser wurde innerhalb der multiparametrischen Assays und anschließenden NGS-Analysen erfolg-

Pharm. Ind. 77, Nr. 5, 756–761 (2015)
© ECV · Editio Cantor Verlag, Aulendorf (Germany)

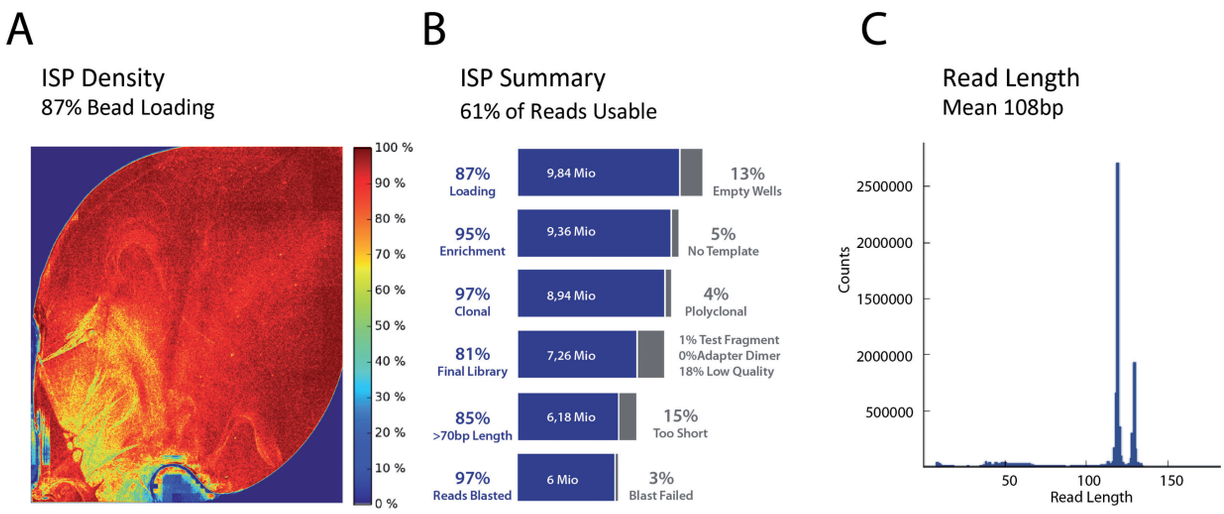


Abb. 6: Qualitätskontrolle der Sequenzierung mittels Ion PGM™ Sequenziergerät. A) Ion-Sphere-Particle(ISP)-Dichte, zeigt die Ladungsdichte der Proben-beladenen ISPs gemäß Farbskala an. B) ISP Zusammenfassung (Summary) enthält Informationen zur Ladungsdichte (Loading 87 %, 9,84 Mio. Wells), der vor Sequenzierung erfolgten Anreicherung an Sequenz-beladenen ISPs (Enrichment 95 %), Anzahl an klonalen ISPs (Clonal 97 %), Summe der insgesamt erhaltenen Sequenzen (7,26 Mio. Reads) und Anzahl der zur Analyse verwendbaren Sequenzen (6 Mio. Reads Blasted). C) Information zur durchschnittlichen Länge der einzelnen erhaltenen Sequenzen (Read Length).

reich eingesetzt. Exemplarisch wurde gezeigt, dass zelluläre Effekte von Wirkstoffen anhand der multiparametrischen Profilierungsplattform EXTassay adressiert werden können. Dadurch wird es möglich sein, mehr über die gewünschten als auch unerwünschten zellulären Wirkmechanismen von Wirkstoffen bereits in frühen Phasen der Medikamentenentwicklung zu erfahren, und somit das Ausfallrisiko und Kosten in der medizinischen Wirkstoffforschung zu senken.

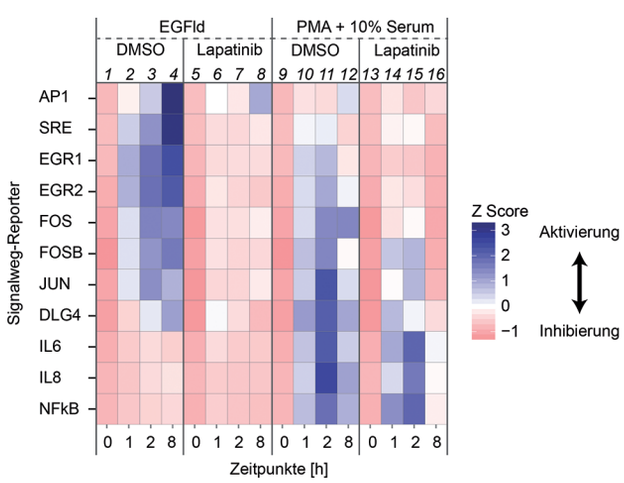


Abb. 7: Quantitative und kinetische Analyse von zellulären Signalaktivitäten (Mit AP1, SRE, DLG4 werden die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Erklärungen der anderen Signalweg-Reporter vgl. Text.) mit Hilfe der spezifischen Assay-Technologie. Signalaktivitäten, die vom spezifischen Stimulus EGF-like domain (EGFld) bzw. vom Breitbandstimulus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)/10 % Serum hervorgerufen wurden, werden unterschiedlich stark vom Inhibitor Lapatinib inhibiert. Die Spaltennummern sind in kursiver Schrift angegeben.

4. Diskussion

Das hier verwendete Reinstwasser kann problemlos für die oben beschriebenen biochemischen, molekular- und zellbiologischen Applikationen verwendet werden und führt zu aussagekräftigen Ergebnissen. Das Reinstwasser wurde u. a. für die kritischen Schritte der NGS-Probenaufbereitung per PCR-Anwendung und des anschließenden Hochdurchsatz-Sequenzierlaufs eingesetzt (Abb. 3 + 6). Anhand der multiparametrischen Assays konnte eine robuste und differentielle Signalantwort zwischen einem spezifischen Stimulus und einem Breitbandstimulus identifiziert werden (Abb. 7).

Besonders Sequenzierreaktionen erfordern hohe Reinstwasser-Standards, die das verwendete Reinstwasser mit seinen sehr niedrigen TOC-Konzentrationen und gleichbleibender Qualität erfüllt.

Weiterhin ist das Reinstwasser frei von nachweisbarer Nukleaseaktivität (bereits eine geringe Nukleaseaktivität kann z. B. sensitive molekularbiologische Applikationen stören, wie z. B. PCRs) und liefert konstant einen Leitwert von 18,2 MΩ × cm.

Sequenzierungen mit dem PGM™ Sequenziergerät, die eine konstante Qualität mit einem Leitwert von 18,2 MΩ × cm erfordern (nicht publizierte Daten zeigen, dass Wasser, das mit weniger als 18,2 MΩ × cm behandelt wurde, sich nicht für biochemische und molekularbiologische Arbeiten, z. B. für Western-Blot-Analysen und PCRs, eignet), sind daher mit dem verwendeten Reinstwassersystem problemlos durchführbar. Alle aufgeführten Qualitäts-Parameter des Reinstwassers müssen erfüllt werden, um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können.

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / *For use with permission of the publisher*

Hingegen wird die Verwendung von aufbereitetem Wasser mit schlechteren Qualitätsparametern bzw. leichten Verunreinigungen nicht zu zufriedenstellenden Resultaten führen. Leitungswasser sollte von vornherein komplett ausgeschlossen werden, da es viele Inhaltsstoffe (Salze, organische Verbindungen, Nukleasen, Mikroorganismen sowie freie DNA) enthält, die zudem noch stark regional variieren können.

Fazit

Multiparametrische Assays ermöglichen eine umfassende Profilierung zellulärer Antworten und werden vermehrt in den frühen Phasen der Wirkstoffforschung eingesetzt, um gewünschte Effekte von Wirkstoffen gegenüber unerwünschten Nebeneffekten schnell und kostengünstig unterscheiden zu können. Die hier beschriebenen Assays, die auf genetischen Sensoren mit molekularen Barcode-Reportern basieren, erfordern höchste qualitative Standards bei den eingesetzten Materialien. Dies wurde exemplarisch für Reinstwasser, das für verschiedene experimentelle Schritte bei den multiparametrischen Assays verwendet wurde, erfolgreich dargestellt.

Danksagung
Die Autoren danken Ben Brankatschk, Sabrina Galinski, Alexandra Rupp und Elena Ciirdaeva für die Mitarbeit und anregende Diskussionen.

LITERATUR

[1] Botvinnik A, Wichert SP, Fischer TM, Rossner MJ. Integrated analysis of receptor activation and downstream signaling with EX-Tassays. Nat Methods. 2010 Jan;7(1):74–80.
[2] Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. Cell. 2013 Sep 26;155(1):27–38.
[3] Nitzki F, Herbig E. In situ Hybridisierung – Die Bedeutung von Reinstwasser für RNA Technologien. GIT Labor-Fachzeitschrift. 2013 März;(57. Jahrgang, 3):157–9.
[4] Rusk N. Torrents of sequence. Nat Meth. 2011 Jan;8(1):44–44.
[5] Patel RK, Jain M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. PLoS ONE. 2012;7(2):e30619.
[6] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403–10.
[7] R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012.
[8] Mei L, Nave K-A. Neuregulin-ERBB Signaling in the Nervous System and Neuropsychiatric Diseases. Neuron. 2014 Jul 2;83(1):27–49.
[9] Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Jul;7(7):505–16.
[10] Wehr MC, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grünewald S, Scheek S, et al. Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. Nat Methods. 2006 Dec;3(12):985–93.
[11] Life Technologies. Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 [Internet]. 2013. Available from: *https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4482006* Zuletzt abgerufen am 15.04.2015.
[12] Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 Feb;12(2):104–17.

Zur Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Verlages / *For use with permission of the publisher*

Chefredaktion: Claudius Arndt. Sekretariat: Gudrun Geppert. Verlag: ECV · Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Baendelstockweg 20, 88326 Aulendorf (Germany). Tel.: +49 (0) 75 25 94 00, Fax: +49 (0) 75 25 94 01 80. e-mail: redaktion@ecv.de. http://www.ecv.de. Herstellung: Reemers Publishing Services GmbH / Holzmann Druck GmbH & Co. KG. Alle Rechte vorbehalten.