

## Monitoraggio del tasso metabolico di cellule iPS indifferenziate e analisi dell'espressione dei marcatori di differenziazione

### Introduzione

La riprogrammazione delle cellule somatiche in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) richiede uno spostamento della via metabolica principale dalla fosforilazione ossidativa (OXPHOS) alla glicolisi.<sup>1)2)</sup> Questo spostamento metabolico avviene in una fase precoce della riprogrammazione, prima dell'auto-rinnovamento e dell'espressione dei geni di pluripotenza, e le iPSC indifferenziate mostrano un metabolismo glicolitico significativamente maggiore rispetto alle cellule somatiche.<sup>3)</sup> Pertanto, si ipotizza una stretta relazione tra pluripotenza e glicolisi.

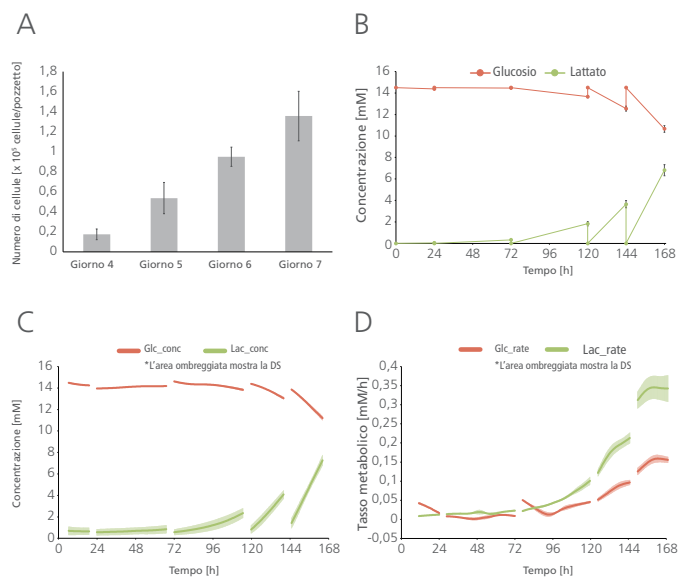
Poiché lo stato delle iPSC indifferenziate è un fattore importante per la qualità e l'efficienza dei processi successivi, come il congelamento dello stock e l'induzione del differenziamento, è necessario comprendere lo stato in costante evoluzione delle cellule per eseguire le operazioni di coltura nel momento migliore. Nella coltura cellulare in generale, i giudizi qualitativi sono spesso basati sull'esperienza dell'operatore, il che rappresenta un problema per garantire una qualità uniforme. Un metodo per valutare quantitativamente lo stato delle cellule è quello di valutare il metabolismo cellulare attraverso l'analisi del mezzo di coltura,<sup>4)</sup> ma non è possibile ottenere una comprensione accurata dello stato delle cellule effettuando campionamenti più volte al giorno. Sebbene esistano metodi di valutazione che utilizzano il campionamento automatico, questo è difficile per le colture in piastre a più pozzetti utilizzate in laboratorio. Per questo motivo, PHCbi ha sviluppato l'analizzatore metabolico per cellule vive, in grado di misurare continuamente le concentrazioni di glucosio e lattato nel mezzo di coltura in comuni piastre a 24 pozzetti disponibili in commercio attraverso un monitoraggio in linea. Ciò consente di quantificare i cambiamenti di stato delle cellule nel tempo.

### Metodo

Le iPSC 1231A3 (HPS0381 è stato fornito dal RIKEN BRC attraverso il National BioResource Project del MEXT, Giappone) sono state coltivate per 7 giorni (168 h) in piastre a 24 pozzetti secondo il protocollo standard,<sup>5)</sup> e le concentrazioni di glucosio e lattato sono state misurate continuamente utilizzando l'analizzatore metabolico per cellule vive. Il terreno di coltura era StemFit® AK02N (Ajinomoto Healthy Supply). Y-27632 è stato aggiunto a 24 ore dalla coltura di passaggio e il terreno di coltura è stato sostituito a 24, 72, 120 e 144 ore. Il terreno è stato raccolto ogni volta che è stato sostituito e le concentrazioni di glucosio e lattato sono state misurate mediante colorimetria. Lo stato cellulare è stato valutato mediante qRT-PCR per misurare i livelli di espressione di marcatori indifferenziati (NANOG, OCT3/4) e differenziati (PAX6 nell'ectoderma, Brachyury nel mesoderma, GATA4 nell'endoderma).

### Risultato 1

Le cellule hanno continuato ad aumentare per tutti i 7 giorni di coltura (Fig. A). Le misurazioni colorimetriche del terreno raccolto al momento della sostituzione hanno mostrato che, nel tempo, la concentrazione di glucosio è diminuita e quella di lattato è aumentata (Fig. B). Le misurazioni continue effettuate con l'analizzatore metabolico per cellule vive hanno permesso di visualizzare i continui cambiamenti nelle concentrazioni di glucosio e lattato in un modo che non sarebbe stato possibile con le misurazioni effettuate quando il terreno di coltura veniva sostituito (Fig. C). Inoltre, il confronto tra le misure di concentrazione ottenute dal sensore elettrochimico dell'analizzatore metabolico per cellule vive e le misure di concentrazione colorimetrica del mezzo raccolto al momento della sostituzione ha mostrato che le misure di concentrazione di glucosio nell'intervallo 1-27 mM divergevano dal -2% al +4% e le misure di concentrazione di lattato nell'intervallo 1-15 mM divergevano dal +11% al +18%, il che ha permesso di concludere che la precisione era sufficiente. Il tasso di consumo di glucosio e il tasso di produzione di lattato sono stati calcolati dai dati di misurazione continua della concentrazione e i risultati hanno indicato che c'era un punto in cui l'aumento si trasformava in una diminuzione a 130 h, dopo la sostituzione del terreno a 120 h, e a 155 h, dopo la sostituzione del terreno a 144 h (Fig. D).



## Risultato 2

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata a 96 h, 120 h, 144 h e 168 h per valutare le cellule durante la seconda metà della coltura, quando il tasso di consumo di glucosio e di produzione di lattato si riduce (Fig. E). Non è stata osservata alcuna variazione nell'espressione di NANOG o OCT3/4, che sono marcatori di iPSC indifferenziate, mentre sono aumentate le espressioni di PAX6 e Brachyury, che sono marcatori di differenziazione precoce. L'espressione di GATA4 è diminuita.

## Discussione

In questo esperimento, le iPSC sono state coltivate utilizzando il protocollo di coltura standard per 7 giorni. Poiché le cellule hanno continuato a proliferare nel corso dei 7 giorni, il calo del tasso di consumo di glucosio e produzione di lattato può essere riformulato come una diminuzione del tasso per cellula di consumo di glucosio e produzione di lattato. Questo risultato suggerisce che la glicolisi è soppressa a 130 h e 155 h dall'inizio della coltura. La glicolisi è più attiva nelle iPSC rispetto alle cellule somatiche, ma è stato riportato che la glicolisi è soppressa nelle iPSC in cui la differenziazione è indotta dall'acido retinoico.<sup>6)</sup> Inoltre, è stato riportato che le iPSC coltivate in terreno privo di bFGF e indotte a differenziarsi spontaneamente non mostrano una diminuzione dell'espressione dei marcatori indifferenziati e un aumento dell'espressione dei marcatori di differenziazione precoce.<sup>7)</sup> Pertanto, poiché esiste una stretta relazione tra la pluripotenza delle iPSC e la glicolisi, è possibile che vi sia una correlazione tra la tendenza alla soppressione della glicolisi e l'aumento dell'espressione dei marcatori di differenziazione precoce nell'ultima fase della coltura.

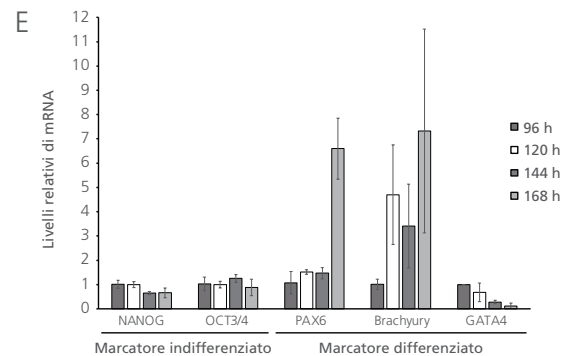
## Conclusione

L'analizzatore metabolico per cellule vive consente la misurazione continua della concentrazione di glucosio e lattato durante la coltura in una piastra a più pozzetti. Con questo dispositivo è stato possibile visualizzare i cambiamenti nella glicolisi delle iPSC tra una sostituzione e l'altra del terreno di coltura, che non potevano essere osservati con il metodo convenzionale di campionamento più volte al giorno. Inoltre, i risultati della misurazione continua della concentrazione hanno dimostrato di avere un'accuratezza equivalente ai risultati della misurazione con il metodo consueto della colorimetria.

Si prevede che le variazioni del tasso di consumo di glucosio e del tasso di produzione di lattato come marcatori quantitativi dei cambiamenti di stato che avvengono all'interno delle cellule consentano giudizi oggettivi, garantendo anche la produzione di cellule di alta qualità.

## Riferimento

- 1) Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Brief Report Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell*. 2009;5(3):237-241.
- 2) Zhou W, Choi M, Margineantu D, et al. HIF1 a induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC / hESC transition. *EMBO J*. 2012;31(9):2103-2116.
- 3) Folmes CDL, Nelson TJ, Martinez-fernandez A, et al. Somatic Oxidative Bioenergetics Transitions into Pluripotency-Dependent Glycolysis to Facilitate Nuclear Reprogramming. *Cell Metab*. 2011;14(2):264-271.
- 4) Lees JG, Rathjen J, Sheedy JR, Gardner DK, Harvey AJ. Distinct profiles of human embryonic stem cell metabolism and mitochondria identified by oxygen. *Reproduction*. 2015;150(4):367-382.
- 5) Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2014;4:1-7.
- 6) Gu W, Gaeta X, Sahakyan A, et al. Glycolytic Metabolism Plays a Functional Role in Regulating Human Pluripotent Stem Cell State. *Stem Cell*. 2016;19(4):476-490.
- 7) Moussaieff A, Rouleau M, Aberdam D, et al. Glycolysis-Mediated Changes in Acetyl-CoA and Histone Acetylation Control the Early Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Metab*. Published online 2015:392-402.



\*I dati sono il risultato della verifica di PHC e non costituiscono una garanzia dei dati del cliente.