

Visualizzazione del profilo metabolico delle cellule immunitarie con inibitori metabolici grazie all'analizzatore metabolico per cellule vive

Introduzione

Esiste una diversità di profili metabolici nelle cellule tumorali e questi profili possono essere molto diversi anche nello stesso tumore.¹ La dipendenza dalla glicolisi aerobica, uno dei vari profili metabolici, è comune anche alle cellule immunitarie.² Questa dipendenza genera una competizione per le fonti di energia tra le cellule tumorali e le cellule immunitarie nel microambiente tumorale ed è stata implicata nella disfunzione delle cellule immunitarie.³ Le cellule alterano il loro metabolismo anche in risposta all'ambiente. L'analisi del metabolismo cellulare è quindi un fattore chiave per la comprensione della funzione cellulare. Esistono metodi per valutare il metabolismo cellulare analizzando i componenti dei terreni di coltura, ma i metodi convenzionali basati al massimo su pochi campioni al giorno sono inadeguati per osservare i cambiamenti del metabolismo cellulare nel tempo. Alla luce di queste premesse, PHC ha progettato un analizzatore metabolico per cellule vive con sensori elettrochimici in linea e ha stabilito un metodo per misurare in continuo le concentrazioni di glucosio e lattato nel terreno di coltura. In questo studio abbiamo cercato di visualizzare i profili metabolici cellulari misurando continuamente i cambiamenti del metabolismo cellulare utilizzando un inibitore della glicolisi e un inibitore del metabolismo mitocondriale.

Metodo

Questo studio ha utilizzato cellule THP-1 di una linea di cellule di leucemia monocitica acuta (ottenute dalla JCRB Cell Bank: JCRB0112.1), e cellule NB-4 di una linea di cellule di leucemia promielocitica acuta (ottenute da CLS - Cell Lines Service GmbH: 300299). Le linee cellulari THP-1 e NB-4 sono note per essere dipendenti rispettivamente dal metabolismo degli acidi grassi e dalla glicolisi.⁴ Entrambe le linee cellulari sono state coltivate per 72 h in terreno RPMI 1640 integrato con il 10% di FBS, durante le quali le concentrazioni di glucosio e lattato sono state misurate in continuo con l'analizzatore metabolico per cellule vive.

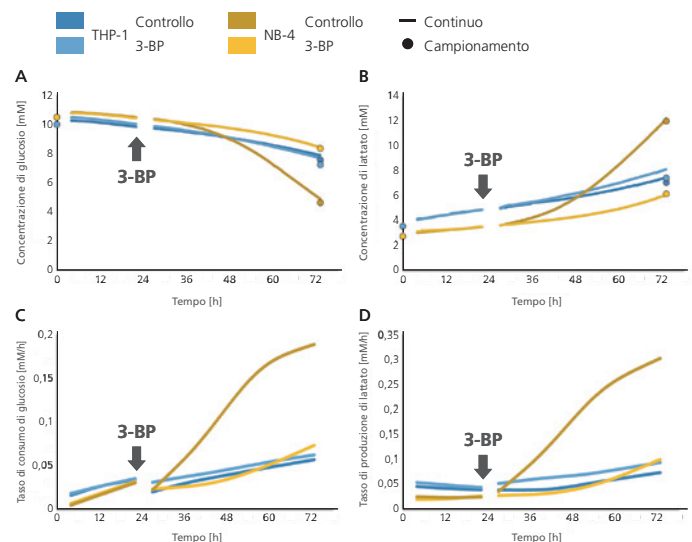
Nell'esperimento 1, l'inibitore dell'esochinasi 3-bromopiruvato (3-BP) è stato aggiunto a una concentrazione finale di 12,5 µM, 24 h dopo la semina delle cellule. Ciò ha permesso di esaminare il tipo di cambiamenti metabolici che si verificano quando la glicolisi viene inibita in linee cellulari con diverse proprietà metaboliche.

Nell'esperimento 2, l'inibitore dell'ATP sintasi oligomicina (Oligo) è stato aggiunto a una concentrazione finale di 0,25 µM (0,1% DMSO), 24 h dopo la semina delle cellule, consentendo di esaminare il tipo di cambiamenti metabolici che si verificano in entrambe le linee cellulari quando il metabolismo mitocondriale viene inibito.

Negli esperimenti 1 e 2, le concentrazioni di glucosio e lattato nel terreno di coltura al termine delle misurazioni continue sono state confrontate in base ai risultati dell'analizzatore metabolico per cellule vive e dell'analisi colorimetrica.

Risultato 1

Inizialmente è stata valutata l'accuratezza dei risultati delle misurazioni continue. Quando i risultati dell'analizzatore metabolico per cellule vive sono stati confrontati con quelli dell'analisi colorimetrica per le concentrazioni di glucosio e lattato nel terreno di coltura al termine delle misurazioni continue, la discrepanza massima era del 9%. Si è pertanto concluso che le misurazioni erano sufficientemente accurate (A e B). Successivamente, sono stati calcolati il tasso di consumo di glucosio e il tasso di produzione di lattato in base alle variazioni delle concentrazioni di glucosio e lattato determinate da misurazioni continue (C e D). Il confronto di questi valori ha mostrato che il tasso metabolico del glucosio e del lattato nelle cellule NB-4 è aumentato notevolmente, ma l'aumento si è attenuato 60 h dopo la semina delle cellule. Inoltre, il tasso metabolico delle cellule NB-4 è stato inibito immediatamente dopo l'aggiunta di 3-BP e tale inibizione è continuata per il resto dell'esperimento. Al contrario, le cellule THP-1 hanno mostrato solo una piccola variazione del tasso metabolico e nessun cambiamento nella risposta al 3-BP.



Risultato 2

Quando i risultati dell'analizzatore metabolico per cellule vive sono stati confrontati con quelli dell'analisi colorimetrica per le concentrazioni di glucosio e lattato nel terreno di coltura al termine delle misurazioni continue, la discrepanza massima era del 6% (E e F). Quando il tasso di consumo di glucosio e il tasso di produzione di lattato sono stati calcolati a partire dalle concentrazioni di glucosio e lattato determinate da misurazioni continue, i tassi metabolici di entrambe le linee cellulari hanno mostrato un drastico aumento in risposta all'Oligo (G e H). Tuttavia, sebbene il tasso metabolico delle cellule NB-4 sia aumentato in seguito al trattamento con Oligo, era più elevato nel gruppo DMSO 45 h dopo la semina delle cellule.

Discussione

L'inibizione della glicolisi mediante trattamento con 3-BP ha interessato solo le cellule NB-4 e le misurazioni continue hanno dimostrato che le cellule NB-4 hanno proprietà dipendenti dalla glicolisi. Inoltre, si è verificata una variazione del tasso metabolico 60 h dopo la semina, suggerendo che in questo momento si è verificato un cambiamento nello stato delle cellule.

È possibile che si sia verificato un cambiamento metabolico perché il trattamento con Oligo ha promosso la glicolisi nelle cellule THP-1 e la produzione mitocondriale di ATP è stata inibita. Le misurazioni continue sono state quindi in grado di dimostrare che le cellule THP-1 hanno proprietà dipendenti dal metabolismo mitocondriale. La variazione del tasso metabolico dopo il trattamento con Oligo variava tra le cellule THP-1 e le cellule NB-4, suggerendo che la reattività agli inibitori metabolici cambia nel tempo a seconda del tipo di cellula.

Conclusione

Abbiamo sviluppato un metodo per misurare continuamente le concentrazioni di glucosio e lattato utilizzando un analizzatore metabolico per cellule vive con sensori in linea. Abbiamo anche confermato che le misurazioni continue erano sufficientemente accurate indipendentemente dall'uso di un inibitore.

Le misurazioni continue del terreno di coltura hanno permesso di visualizzare i cambiamenti del metabolismo cellulare in risposta all'ambiente, anziché limitarsi a fornire un'istantanea del metabolismo cellulare. La valutazione della diversa reattività di ciascun tipo di cellula agli inibitori metabolici nel corso del tempo, utilizzando misurazioni continue, è stata utile anche per chiarire le proprietà metaboliche delle cellule.

La comprensione del metabolismo nelle cellule immunitarie è importante per chiarire le proprietà di tali cellule.⁵ È inoltre noto che le cellule immunitarie modificano dinamicamente il proprio metabolismo durante le fasi di attivazione, proliferazione ed esaurimento.⁶ La stretta relazione tra funzione cellulare e metabolismo è stata al centro della ricerca sulle terapie delle cellule immunitarie, in particolare quelle mirate al cancro. Ci aspettiamo che l'uso dell'analizzatore metabolico per cellule vive con monitoraggio in linea contribuisca a nuove scoperte nella ricerca sulle proprietà metaboliche delle cellule immunitarie.

Riferimento

1. Chen P-H, Cai L, Huffman K, et al. Metabolic diversity in human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cell*. 2019;76:838-851.
2. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 2013;342:1242-54.
3. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell*. 2015;162:1229-1241.
4. Miwa H, Shikami M, Goto M, et al. Leukemia cells demonstrate a different metabolic perturbation provoked by 2-deoxyglucose. *Onco Rep*. 2013;29:2053-2057.
5. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med*. 2015;212:1345-1360.
6. Jones RG, Thompson CB. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*. 2007;27:173-178.

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

