

## Monitorowanie tempa metabolizmu niezróżnicowanych komórek iPSC i analiza ekspresji markerów różnicowania

### Wstęp

Przeprogramowanie komórek somatycznych do indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) wymaga zmiany głównego szlaku metabolicznego z fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) na glikolizę<sup>1,2</sup>. Ta zmiana metaboliczna ma miejsce na wczesnym etapie przeprogramowania, przed samoodnową i ekspresją genów pluripotencji, a niezróżnicowane iPSC wykazują znacznie większy metabolizm glikolityczny niż komórki somatyczne<sup>3</sup>. Dlatego przypuszcza się, że istnieje ścisły związek między pluripotencją a glikolizą.

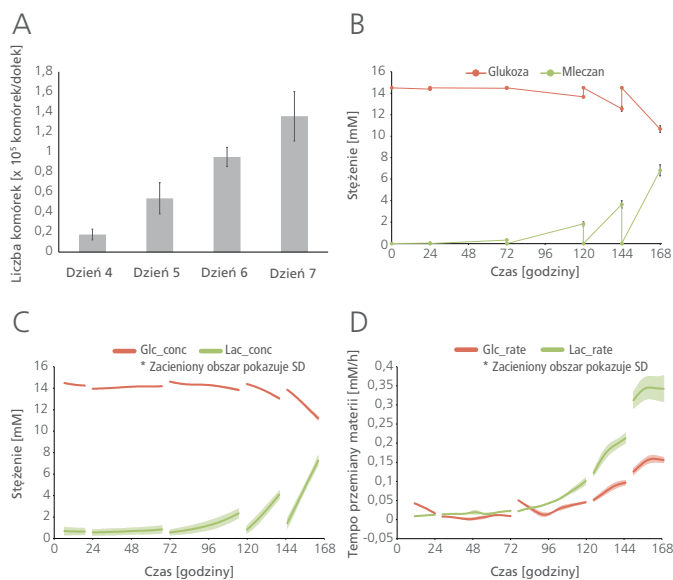
Ponieważ stan niezróżnicowanych iPSC jest głównym czynnikiem wpływającym na jakość i wydajność kolejnych procesów, takich jak zamrażanie materiału i indukcja różnicowania, konieczne jest zrozumienie stale zmieniającego się stanu komórek, aby przeprowadzić operacje hodowli w najlepszym możliwym czasie. Zasadniczo przy hodowli komórkowej oceny jakościowe często opierają się na doświadczeniu praktyków, co stanowi problem dla zapewnienia jednolitej jakości. Jedną z metod ilościowej oceny stanu komórek jest ocena metabolizmu komórek poprzez analizę pożywki hodowlanej<sup>4</sup>. Nie da się jednak dokładnie zrozumieć stanu komórek, pobierając próbki kilka razy dziennie. Chociaż istnieją metody oceny wykorzystujące automatyczne pobieranie próbek, jest to trudne w przypadku hodowli na płytках wielodołkowych używanych w laboratoriach. Dlatego też firma PHCbi opracowała analizator metabolizmu żywych komórek, który może w sposób ciągły mierzyć stężenie glukozy i mleczanu w pożywce hodowlanej w powszechnie dostępnych na rynku 24-dołkowych płytках poprzez monitorowanie in-line. Umożliwia to ilościowe określenie zmian stanu komórek w czasie.

### Metoda

Komórki iPSC 1231A3 (HPS0381 dostarczone przez RIKEN BRC w ramach projektu National BioResource Project of the MEXT, Japonia) hodowano przez 7 dni (168 godzin) w 24-dołkowych płytках zgodnie ze standardowym protokołem<sup>5</sup>, a stężenie glukozy i mleczanu mierzono w sposób ciągły za pomocą analizatora metabolizmu żywych komórek. Pożywką hodowlaną był StemFit® AKO2N (Ajinomoto Healthy Supply). Y-27632 dodano po 24 godzinach od pasażowania, a pożywkę hodowlaną wymieniano po 24, 72, 120 i 144 godzinach. Pożywkę zbierano za każdym razem, gdy była wymieniana, a stężenia glukozy i mleczanu mierzono metodą kolorymetryczną. Stan komórek oceniano przy użyciu qRT-PCR do pomiaru poziomów ekspresji niezróżnicowanych markerów (NANOG, OCT3/4) i zróżnicowanych markerów (PAX6 w ektodermie, Brachyury w mezodermie, GATA4 w endodermie).

### Wynik 1

Liczba komórek stale rosła przez 7 dni hodowli (ryc. A). Pomiar kolorymetryczny pożywki zebranej po jej wymianie wykazały, że z czasem stężenie glukozy spadło, a stężenie mleczanu wzrosło (ryc. B). Ciągłe pomiary wykonywane przy użyciu analizatora metabolizmu żywych komórek pozwoliły na wizualizację ciągłych zmian stężenia glukozy i mleczanu w sposób, który nie byłby możliwy w przypadku pomiarów wykonywanych po wymianie pożywki (ryc. C). Ponadto porównanie pomiarów stężenia uzyskanych z czujnika elektrochemicznego analizatora metabolicznego żywych komórek i kolorymetrycznych pomiarów stężenia pożywki, która została zebrana po jej wymianie, wykazało, że pomiary stężenia glukozy w zakresie 1–27 mM różniły się o  $-2 \pm 4\%$ , a pomiary stężenia mleczanu w zakresie 1–15 mM różniły się o  $+11 \pm 18\%$ , na podstawie czego wywnioskowano, że dokładność była wystarczająca. Szybkość zużycia glukozy i szybkość produkcji mleczanu obliczono na podstawie danych z ciągłego pomiaru stężenia, a wyniki wskazały, że istniał punkt, w którym wzrost zmienił się w spadek po 130 godzinach, po wymianie pożywki po 120 godzinach, a także po 155 godzinach, po wymianie pożywki po 144 godzinach (ryc. D).



## Wynik 2

Analizę ekspresji genów przeprowadzono po 96, 120, 144 i 168 godzinach, aby ocenić komórki w drugiej połowie hodowli, kiedy szybkość zużycia glukozy i szybkość produkcji mleczanu są zmniejszone (ryc. E). Nie zaobserwowano zmian w ekspresji NANOG ani OCT3/4, które są markerami niezróżnicowanych iPSC. Zaobserwowano jednak zwiększoną ekspresję PAX6 i Brachyury, które są markerami wczesnego różnicowania. Ekspresja GATA4 zmniejszyła się.

## Dyskusja

W tym eksperymencie iPSC hodowano przy użyciu standardowego protokołu hodowli przez 7 dni. Ponieważ komórki nadal się namnażały w ciągu 7 dni, szybkość zużycia glukozy i produkcji mleczanu zmniejszyła się, co można podsumować jako zmniejszenie szybkości zużycia glukozy i produkcji mleczanu na komórkę. Wynik ten sugeruje, że glikoliza jest tłumiona po 130 i 155 godzinach od rozpoczęcia hodowli. Glikoliza jest bardziej aktywna w iPSC niż w komórkach somatycznych, doniesiono jednak, że glikoliza jest tłumiona w iPSC, w których różnicowanie jest indukowane przez kwas retinowy<sup>6</sup>. Ponadto doniesiono, że iPSC hodowane w pożywce bez bFGF i indukowane do spontanicznego różnicowania nie wykazują spadku ekspresji niezróżnicowanych markerów i wzrostu ekspresji markerów wczesnego różnicowania<sup>7</sup>. Ponieważ istnieje ścisły związek między pluripotencją iPSC a glikolizą, może istnieć korelacja między tendencją do tłumienia glikolizy i zwiększoną ekspresją markerów wczesnego różnicowania w drugim etapie hodowli.

## Wniosek

Analizator metabolizmu żywych komórek umożliwia ciągły pomiar stężenia glukozy i mleczanu podczas hodowli na płytce wielodołkowej. Dzięki temu urządzeniu możliwe było wizualizowanie zmian w glikolizie iPSC między wymianami pożywki, których nie można było zaobserwować za pomocą konwencjonalnej metody pobierania próbek kilka razy dziennie. Ponadto wykazano, że wyniki ciągłego pomiaru stężenia mają dokładność równoważną wynikom pomiaru zwykłą metodą kolorymetryczną.

Oczekujemy, że zmiany w szybkości zużycia glukozy i szybkości produkcji mleczanu jako ilościowe markery zmian stanu zachodzących w komórkach pozwolą na obiektywną ocenę, która zapewni również produkcję wysokiej jakości komórek.

## Informacje dodatkowe

- 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.

\* Dane są wynikiem weryfikacji przez PHC i nie stanowią gwarancji danych klienta.