

Wizualizacja profilu metabolicznego komórek odpornościowych z inhibitorami metabolicznymi przy użyciu analizatora metabolizmu żywych komórek

Wstęp

W komórkach nowotworowych występuje różnorodność profili metabolicznych, które mogą się znacznie różnić nawet w obrębie tego samego nowotworu¹. Zależność od glikolizy tlenowej, jednego z profili metabolicznych, jest również powszechna w komórkach odpornościowych². Zależność ta generuje konkurencję o źródła energii między komórkami nowotworowymi a komórkami odpornościowymi w mikrośrodowisku guza i jest związana z dysfunkcją komórek odpornościowych³. Komórki zmieniają również swój metabolizm w odpowiedzi na środowisko. Analiza metabolizmu komórkowego jest zatem kluczowym czynnikiem w zrozumieniu funkcji komórek. Dostępne są metody oceny metabolizmu komórek poprzez analizę składników podłoża hodowlanego, ale konwencjonalne metody oparte na co najwyżej kilku próbkach dziennie są nieodpowiednie do obserwowania zmian metabolizmu komórek w czasie. Biorąc to pod uwagę, firma PHC opracowała analizator metabolizmu żywych komórek z elektrochemicznymi czujnikami in-line, jak również metodę ciągłego pomiaru stężenia glukozy i mleczanu w pożywce hodowlanej. W tym badaniu podjęliśmy próbę wizualizacji profili metabolicznych komórek poprzez ciągły pomiar zmian w metabolizmie komórkowym przy użyciu inhibitora glikolizy oraz inhibitora metabolizmu mitochondrialnego.

Metoda

W badaniu tym wykorzystano komórki THP-1 z linii komórkowej ostrej białaczki monocytowej (uzyskane z banku komórek JCRB: JCRB0112.1) oraz komórki NB-4 z linii komórkowej ostrej białaczki promielocytowej (uzyskane od CLS – Cell Lines Service GmbH: 300299). Wiadomo, że linie komórkowe THP-1 i NB-4 są zależne odpowiednio od metabolizmu kwasów tłuszczowych i glikolizy⁴. Obie linie komórkowe hodowano przez 72 godziny w pożywce RPMI 1640 uzupełnionej 10% FBS, podczas których stężenia glukozy i mleczanu mierzono w sposób ciągły za pomocą analizatora metabolizmu żywych komórek.

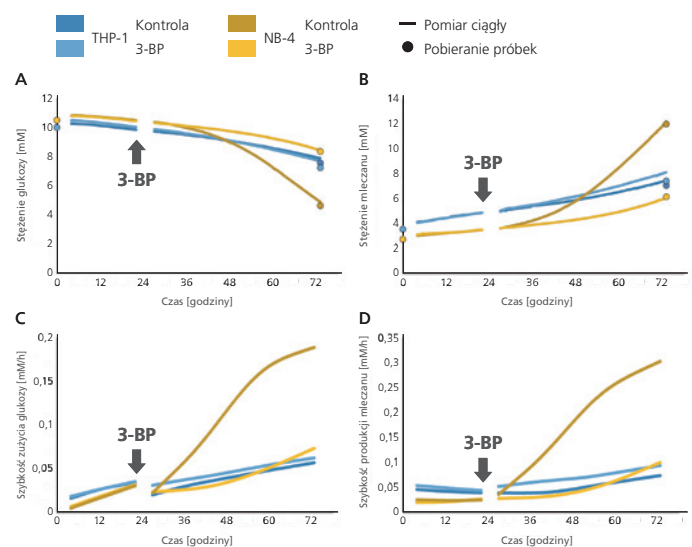
W 1. eksperymencie po 24 godzinach od wysiania komórek do końcowego stężenia 12,5 μM dodano inhibitor heksokinazy 3-bromopirogronian (3-BP). Pozwoliło nam to zbadać rodzaj zmian metabolicznych, które zachodzą, gdy glikoliza jest hamowana w liniach komórkowych o różnych właściwościach metabolicznych.

W 2. eksperymencie inhibitor syntazy ATP oligomycynę (Oligo) dodano do końcowego stężenia 0,25 μM (0,1% DMSO) 24 godziny po wysianiu komórek, co pozwoliło nam zbadać rodzaj zmian metabolicznych zachodzących w obu liniach komórkowych, gdy metabolizm mitochondrialny jest zahamowany.

W 1. i 2. eksperymencie stężenia glukozy i mleczanu w pożywce hodowlanej na koniec ciągłych pomiarów zostały porównane na podstawie wyników z analizatora metabolicznego żywych komórek i analizy kolorymetrycznej.

Wynik 1

Wstępnie oceniono dokładność wyników pomiarów ciągłych. Gdy wyniki z analizatora metabolizmu żywych komórek porównano z wynikami z analizy kolorymetrycznej dla stężeń glukozy i mleczanu w pożywce hodowlanej pod koniec ciągłych pomiarów, maksymalna rozbieżność wyniosła 9%. Stwierdzono zatem, że pomiary były wystarczająco dokładne (A i B). Następnie na podstawie zmian stężeń glukozy i mleczanu określonych w pomiarach ciągłych (C i D) obliczono szybkość zużycia glukozy oraz szybkość produkcji mleczanu. Porównanie tych wartości wykazało, że tempo metabolizmu zarówno glukozy, jak i mleczanu w komórkach NB-4 znacznie wzrosło, ale wzrost ten zmniejszył się 60 godzin po wysianiu komórek. Co więcej, tempo metabolizmu w komórkach NB-4 zostało zahamowane natychmiast po dodaniu 3-BP, a efekt hamowania utrzymywał się przez pozostałą część eksperymentu. Z kolei komórki THP-1 wykazywały jedynie niewielką zmianę tempa metabolizmu i brak zmian w odpowiedzi na 3-BP.



Wynik 2

Gdy wyniki z analizatora metabolizmu żywych komórek porównano z wynikami z analizy kolorymetrycznej dla stężeń glukozy i mleczału w pożywce hodowlanej pod koniec pomiarów ciągłych, maksymalna rozbieżność wyniosła 6% (E i F). Gdy szybkość zużycia glukozy i szybkość produkcji mleczału obliczono na podstawie stężeń glukozy i mleczału określonych w pomiarach ciągłych, szybkość metabolizmu obu linii komórkowych wykazała znaczący wzrost w odpowiedzi na Oligo (G i H). Jednakże, chociaż tempo metabolizmu w komórkach NB-4 wzrosło w wyniku zastosowania Oligo, było ono wyższe w grupie DMSO 45 godzin po wysianiu komórek.

Dyskusja

Hamowanie glikolizy przez podanie 3-BP miało wpływ tylko na komórki NB-4, a pomiary ciągłe wykazały, że komórki NB-4 mają właściwości zależne od glikolizy. Co więcej, zmiana tempa metabolizmu nastąpiła 60 godzin po wysianiu, co sugeruje, że w tym czasie nastąpiła również zmiana stanu komórek.

Zmiana metaboliczna mogła nastąpić, ponieważ Oligo sprzyjało glikolizie w komórkach THP-1, a mitochondrialna produkcja ATP została zahamowana. Ciągłe pomiary mogły zatem wykazać, że komórki THP-1 mają właściwości zależne od metabolizmu mitochondriów. Zmiana tempa metabolizmu po leczeniu Oligo różniła się między komórkami THP-1 i NB-4, co sugeruje, że reakcja na inhibitory metabolizmu zmienia się w czasie w zależności od typu komórek.

Wniosek

Opracowaliśmy metodę ciągłego pomiaru stężenia glukozy i mleczału przy użyciu analizatora metabolizmu żywych komórek z czujnikami in-line. Potwierdziliśmy również, że pomiary ciągłe były wystarczająco dokładne niezależnie od tego, czy zastosowano inhibitor.

Ciągłe pomiary pożywki hodowlanej umożliwiły wizualizację zmian w metabolizmie komórek w odpowiedzi na środowisko, a nie tylko zapewnienie migawki metabolizmu komórek. Ocena różnej reakcji każdego typu komórek na inhibitory metaboliczne w czasie przy użyciu ciągłych pomiarów była również przydatna do wyjaśnienia właściwości metabolicznych komórek.

Zrozumienie metabolizmu w komórkach odpornościowych jest ważne dla wyjaśnienia właściwości tych komórek⁵. Wiadomo również, że komórki odpornościowe dynamicznie zmieniają swój metabolizm podczas faz aktywacji, proliferacji i wyczerpania⁶. Ścisły związek między funkcjonowaniem komórek a metabolizmem był przedmiotem badań nad terapiami komórkami odpornościowymi — szczególnie tymi ukierunkowanymi na raka. Oczekujemy, że zastosowanie analizatora metabolizmu żywych komórek z monitorowaniem in-line przyczyni się do nowych odkryć w badaniach nad właściwościami metabolicznymi komórek odpornościowych.

Informacje dodatkowe

- 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.
- Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: Insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 2013;342:1242-54.
- 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.
- 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.
- Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med*. 2015;212:1345-1360.
- Jones RG, Thompson CB. Rewiring the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*. 2007;27:173-178.

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

