

Роль метаболического профилирования в оценке дифференцировки клеточных культур

Metabolic profiling in the evaluation of cell culture differentiation

А.А. Жлоба

zhloba@mail.spbnit.ru



ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова»



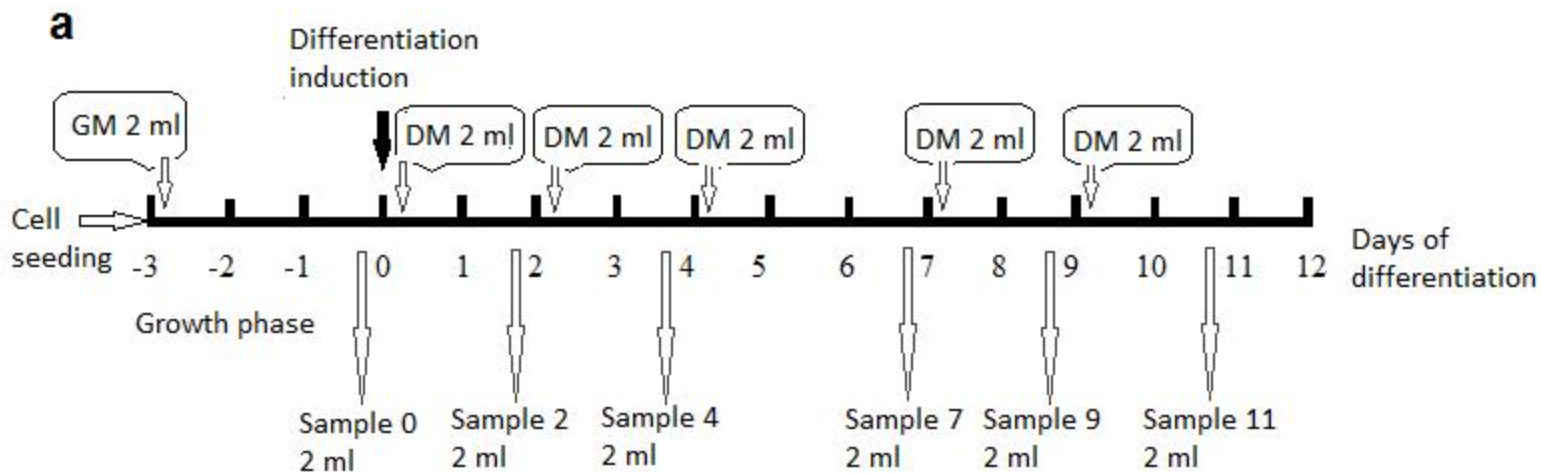
ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
Federal North-West Medical Research Centre

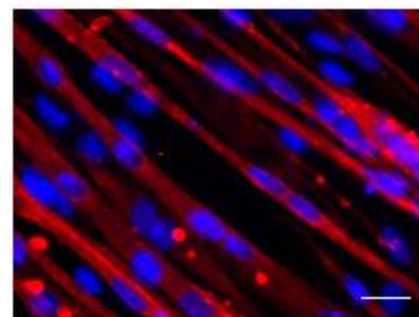
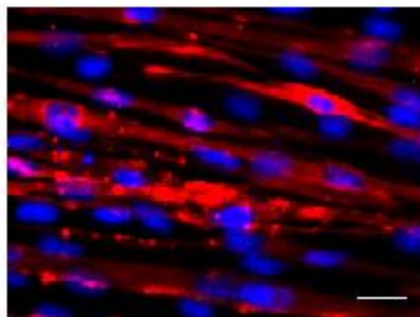


2017

Взятие проб для метаболического профилирования в ходе миогенной дифференцировки C2C12 миобластов



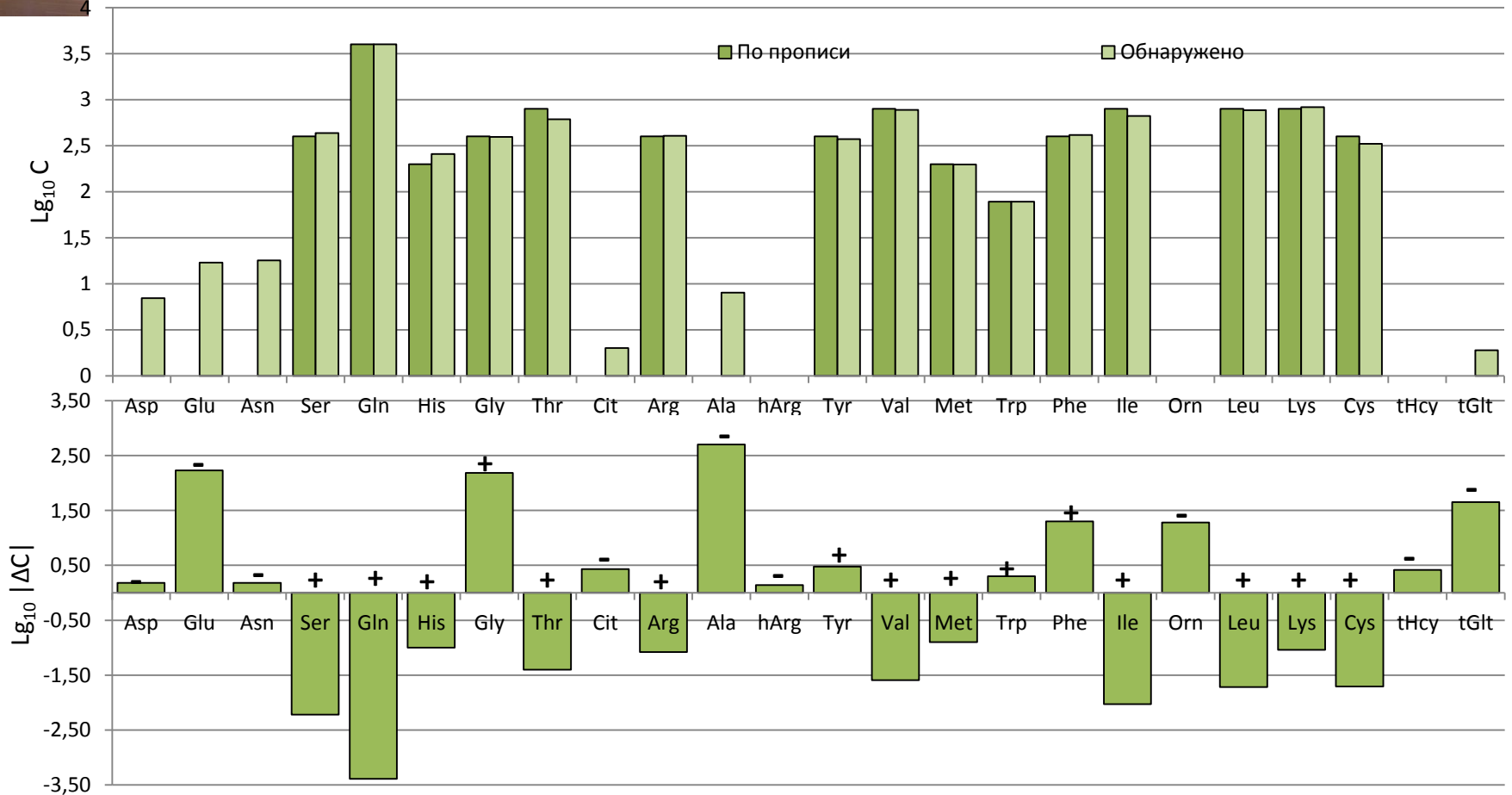
b



Работа с культурами клеток проводилась в НИИ молекулярной биологии и генетики (директор – Анна Александровна Костарева) СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова Натальей Александровной Смолиной и Александром Александровичем Худяковым



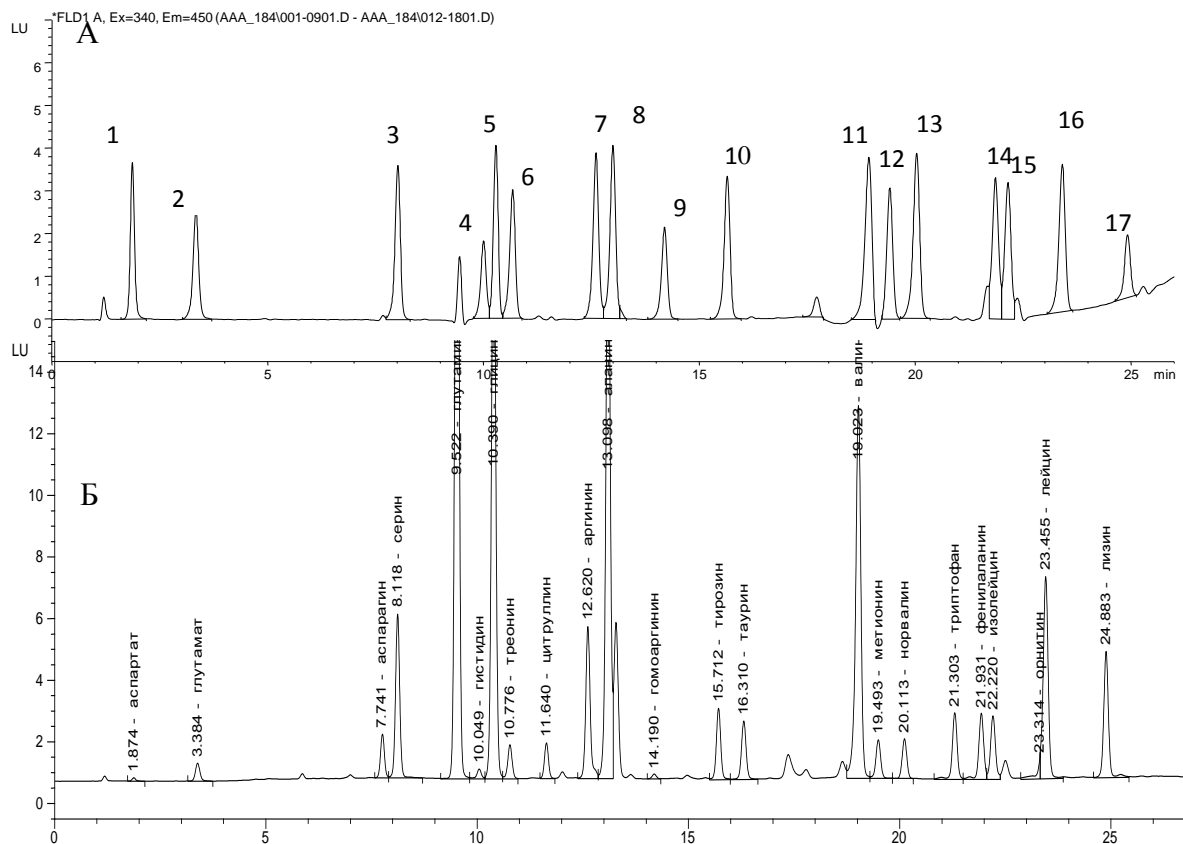
Метаболический профиль среды до и в ходе миогенной дифференцировки C2C12 миобластов мыши



Суточная скорость потребления аминокислот из среды (-) или продукции аминокислот в среду (+) на 4-й день после индукции миогенной дифференцировки C2C12 миобластов мыши. Приведены логарифмы средних значений (мкМ) из шести экспериментов. Помимо аминокислот среда содержала также D-глюкозу (25 мМ), пируват (1мМ), а также добавки витаминов B1, B2, PP, B6, ФК, инозитола и холина. Содержание компонентов несколько изменяется после добавок, в т.ч. лошадиной сыворотки.

- Исследование поддержано грантом РФФИ № 15-04-02480

Метаболический профиль компонентов питательных сред



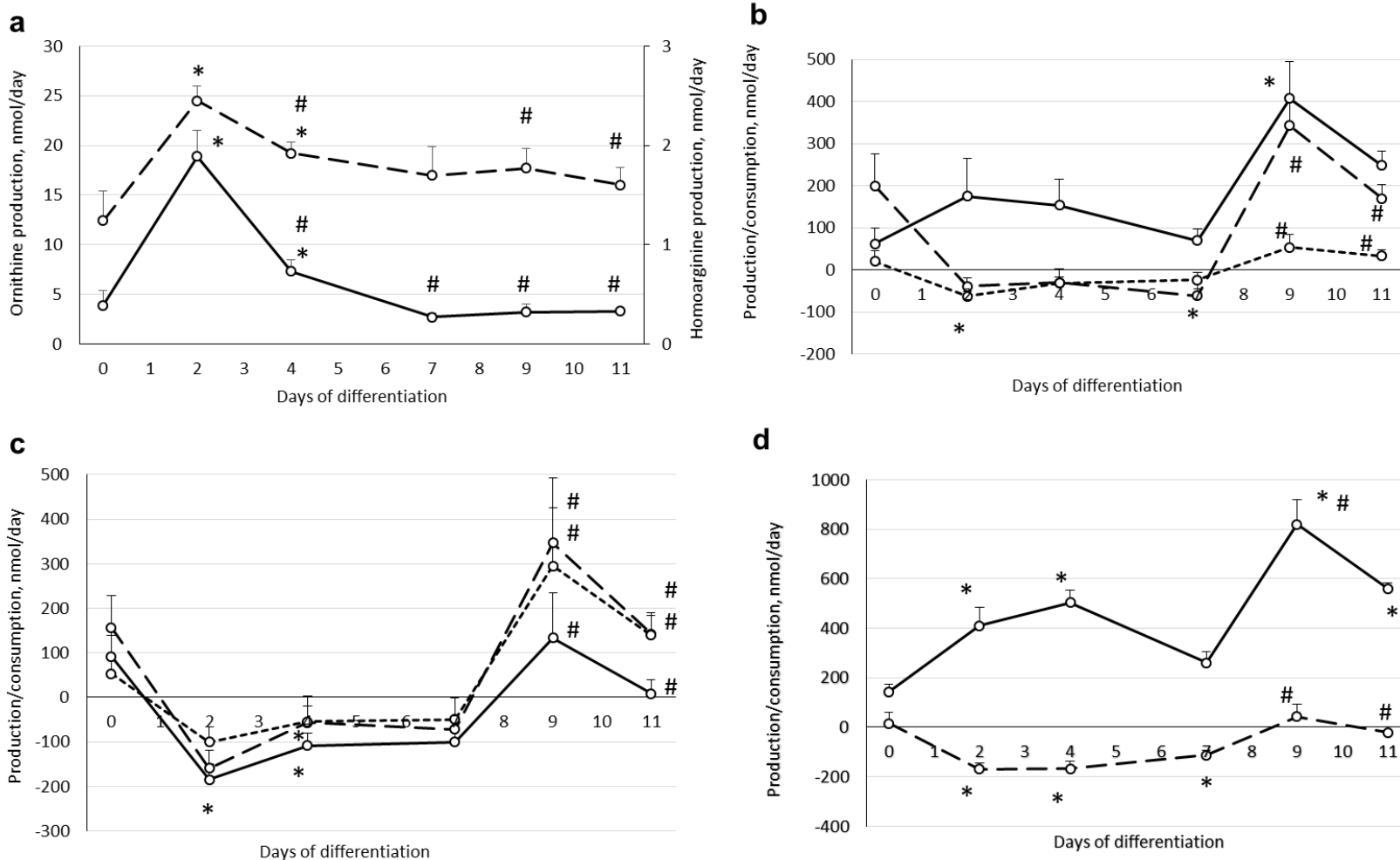
Хроматография на колонке Zorbax Eclipse AAA C18 (4.6 × 150) мм (3.5 мкм).

Метаболическое профилирование выполнено в отделе биохимии НОИ биомедицины ПСПбГМУ им. И.П.Павлова

проф. Татьяной Федоровной Субботиной и

проф. Александром Анатольевичем Жлобой

Скорость высвобождения (положительные величины) или потребления (отрицательные величины) аминокислот из(в) культуральной среды на протяжении дифференцировки C2C12 миобластов



(a) гАрг (сплошная) и орнитин (пунктир);

(b) Другие участники AGAT реакции: Гли (сплошная), Арг (точки) и Лиз (пунктир);

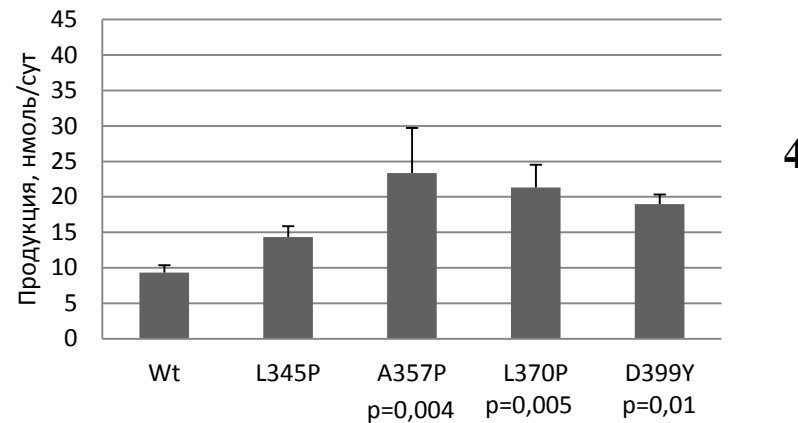
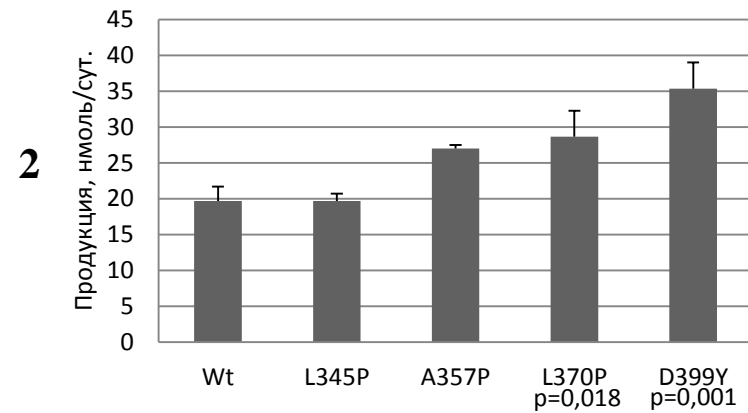
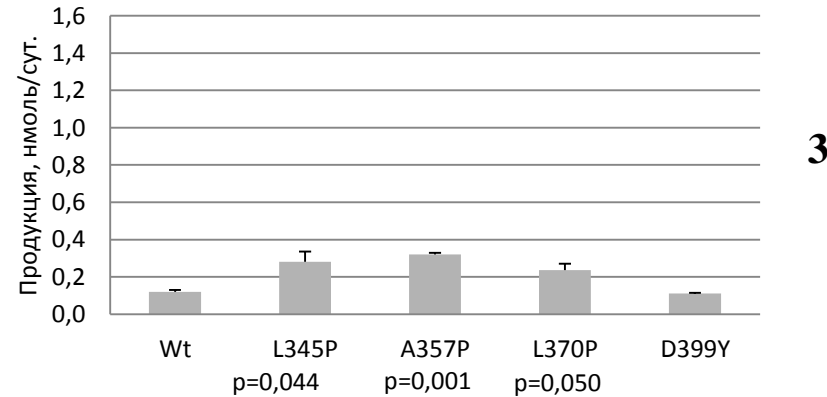
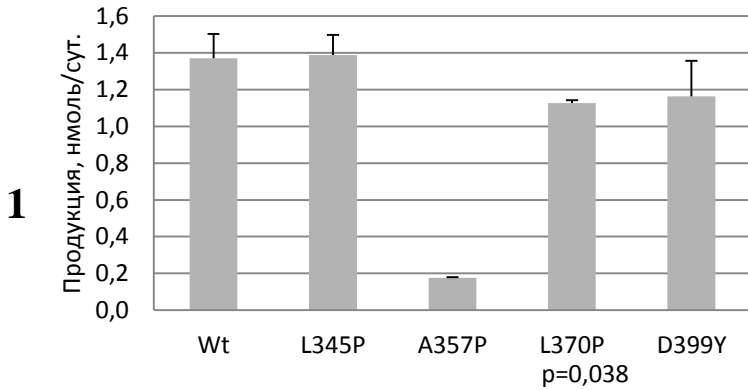
(c) АК с разветвленной цепью: Иле (сплошная), Лей (точки) и Вал (пунктир);

(d) АК в основном вовлеченные в энергетический обмен: Ала (сплошная) и Сер (пунктир).

Показаны средние (ошибка среднего); n=6.

*p<0,05 в сравнении с днем 0; # p<0,05 в сравнении с днем 2 (t-тест Стьюдента).

Накопление гомоаргинина и орнитина в среде дифференцирующихся *C2C12* миобластов с мутантными типами десмина



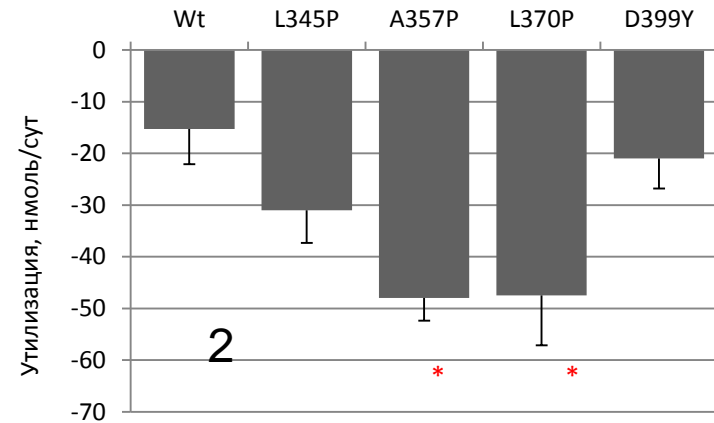
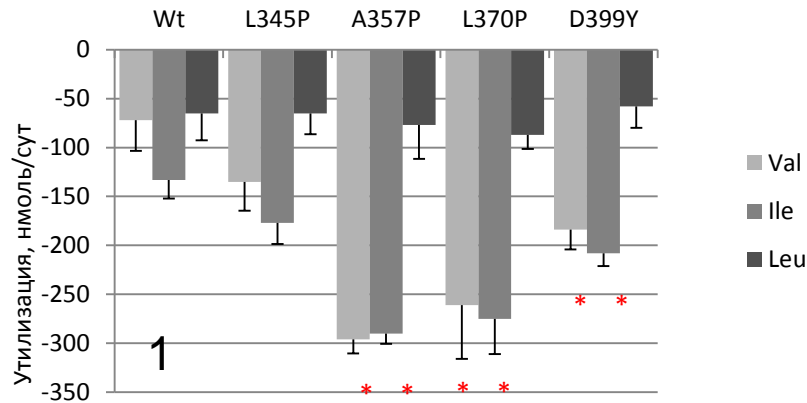
Продукция гАрг (1, 3) и орнитина (2, 4) в ходе миогенной дифференцировки *C2C12* миобластов мыши на вторые (1, 2) и четвертые (3, 4) сутки после индукции дифференцировки.

Предварительно клетки были трансдуцированы лентивирусным вектором, содержащим ген десмина дикого (Wt) или мутантного типов.

Достоверность различий указана по сравнению с клетками, содержащими ген дикого типа десмина(Wt).



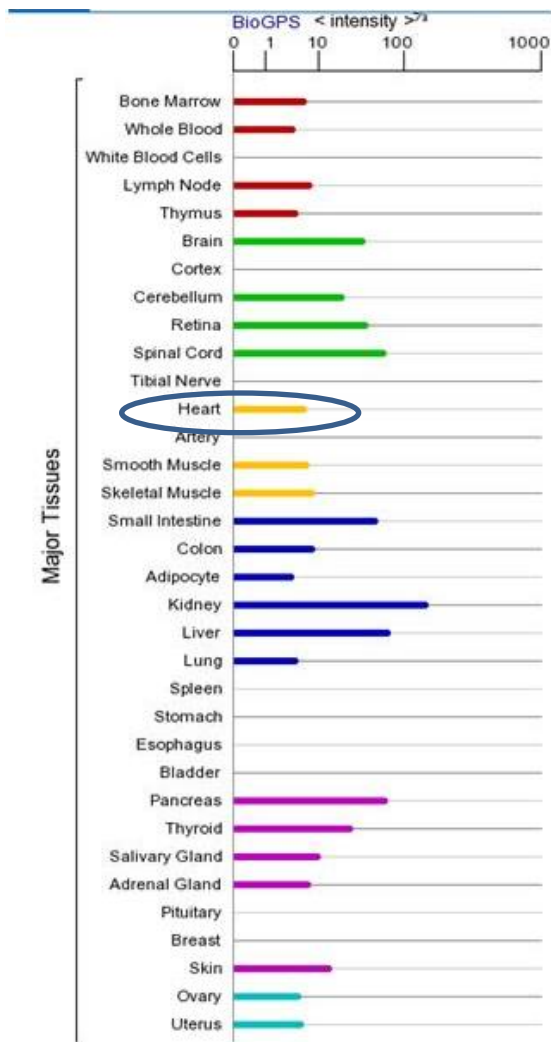
Потребление аминокислот C2C12 дифференцирующимися миобластами с дефектным геном десмина



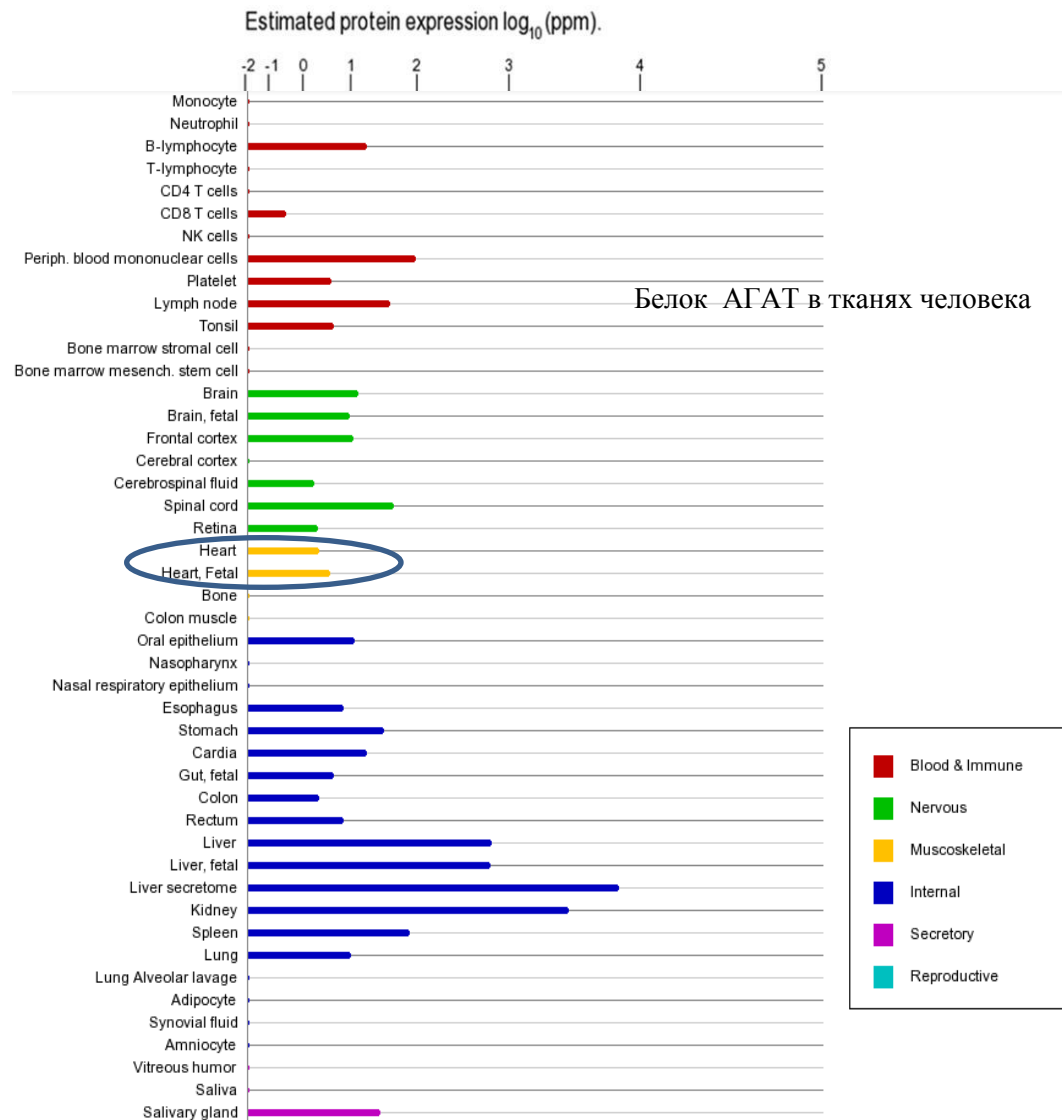
Среднее (n=6) суточное потребление аминокислот с разветвленной цепью (1) и метионина (2) в ходе миогенной дифференцировки C2C12 миобластов мышцы на четвертые сутки после индукции дифференцировки. Предварительно клетки были трансдуцированы лентивирусным вектором, содержащим ген десмина дикого (Wt) или мутантного типов. Звездочками отмечены достоверные отличия по сравнению с Wt

Экспрессия РНК и белка АГАТ в тканях человека

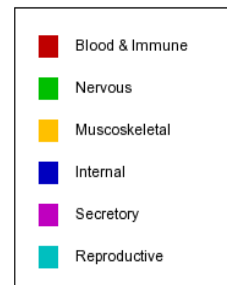
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GATM>



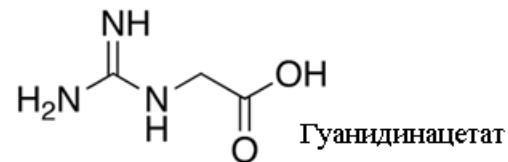
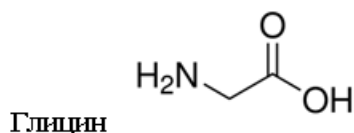
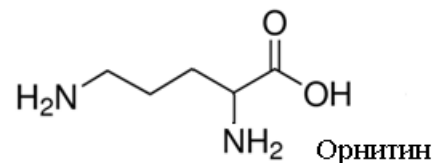
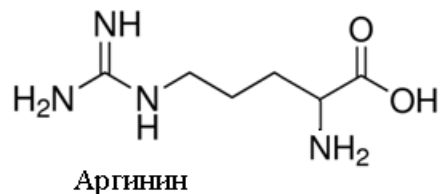
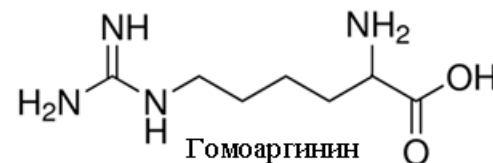
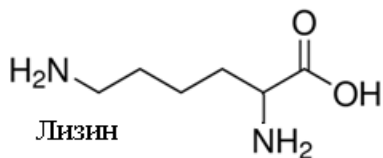
1 РНК АГАТ в тканях человека



Белок АГАТ в тканях человека



Образование гомоаргинина и орнитина в АГАТ-реакции

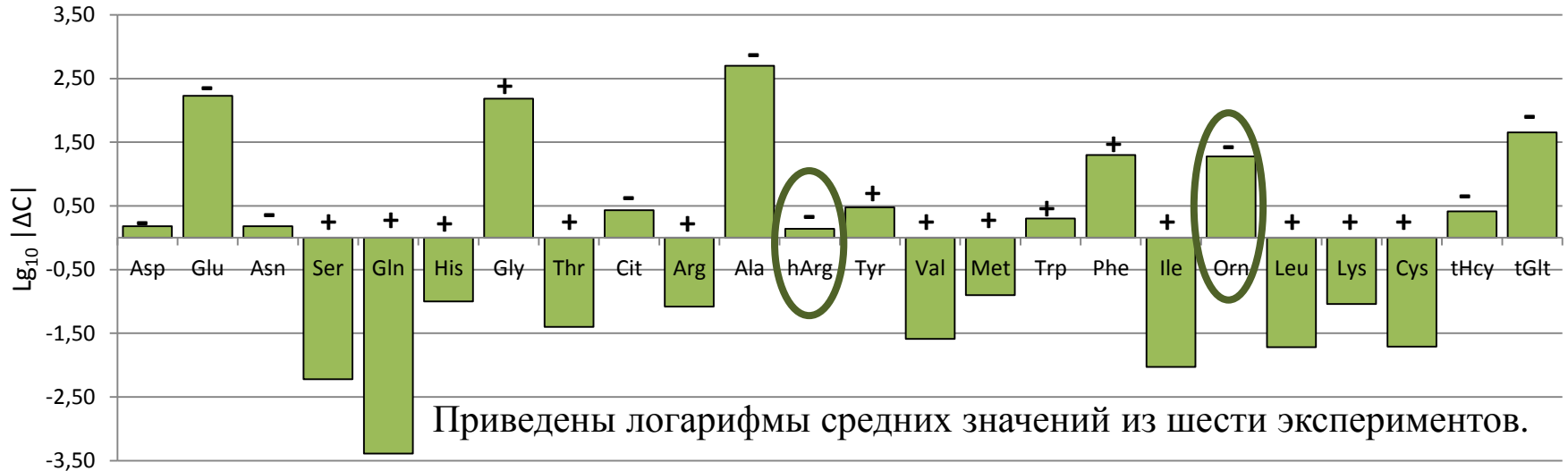


L-Arginine:Glycine Amidinotransferase (AGAT, АГАТ), Glycine Amidinotransferase (GATM)
Другие аббревиатуры белка АГАТ: AT, CCDS3, P50440

- Исследование поддержано грантом РФФИ № 15-04-02480

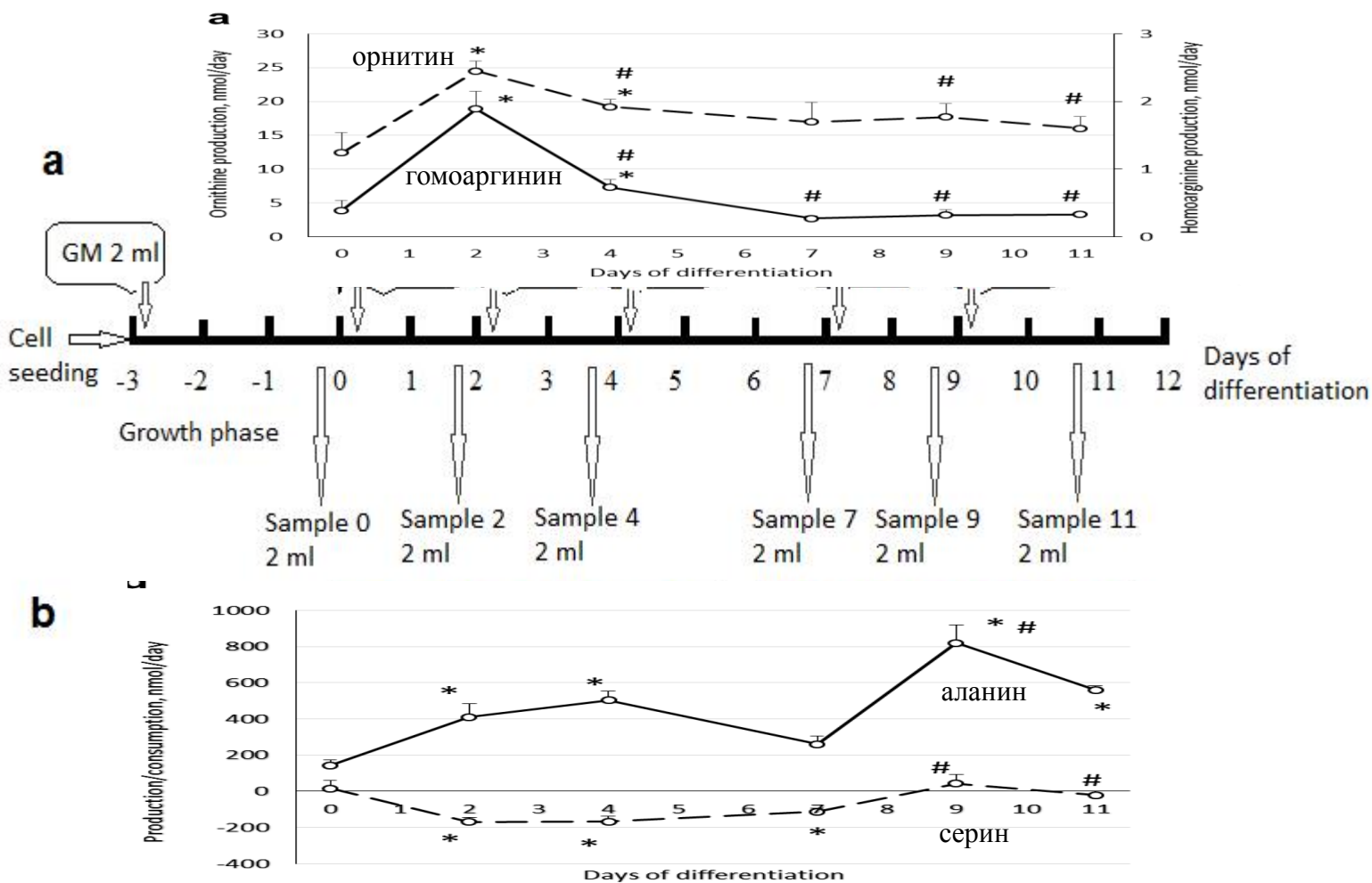


Метаболическое профилирование в динамике дифференцировки позволяет определять наличие существенных последствий мутаций в изучаемой культуре



- Метаболическое профилирование особенно важно для решения вопроса о правильности направления дифференцировки и целесообразности планируемой клеточной терапии.
- Этот метод актуален также при скрининге совместимости планируемой клеточной трансплантации и внутренней среды организма (влияние пептидов-регуляторов).
- Перспективно использовать метаболическое профилирование при скрининге и изучении инициации и модуляторов дифференцировки, наблюдая появление и падение содержания метаболитических маркеров ранней постмитотической стадии.

Основные маркеры метаболического профилирования в ходе миогенной дифференцировки C2C12 миобластов



Метаболические маркеры ранней постмитотической стадии



На ранней постмитотической стадии происходит высвобождение в среду гомоаргинина и орнитина за счет экспрессии аргинин: глицин амидинотрансферазы (КФ 2.1.4.1).

До морфологических признаков миогенной дифференцировки высвобождение этих метаболитов резко тормозится.

Старение клеточной культуры сопровождается резким высвобождением аминокислот в среду.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

