

SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZTÉS

5. Állati sejtek tenyésztése



Bevezetés

Az élőlények hierarchikus szerveződése:

Sejt → Szövet → Szerv → Szervrendszer

Egyedfejlődés:

embrionális őssejt → differenciálódott sejtek



Történeti áttekintés

- 1830 Schleiden-Schwann: kidolgozták a sejtelméletet, miszerint minden élőlény sejtekből áll
- 1855 Virchow: minden sejt sejtéből lesz (omnis cellula e cellula)
- 1885 Roux embrionális (madár) sejtek in vitro fenntartása
- 1967 Van Wezel: a mikrokarrieres sejtenyésztés
- 1970 rekombináns DNS technika alkalmazása állati sejteknél
- 1975 Köhler-Milstein: hibridóma sejt előállítása és monoklonális antitestek (immunfehérjék) termelése



A tenyésztés alapjai

Sejttenyésztés: diszpergált sejtek fenntartása *in vitro* körülmények között.

Szövettenyésztés: a szövet fenntartását jelenti oly módon, mely lehetővé teszi a sejtek differenciálódását ill. a struktúra és/vagy funkció megőrzését.



Állati sejt/szövettenyésztés

Egészen más, mint a mikroorganizmusok tenyésztése.

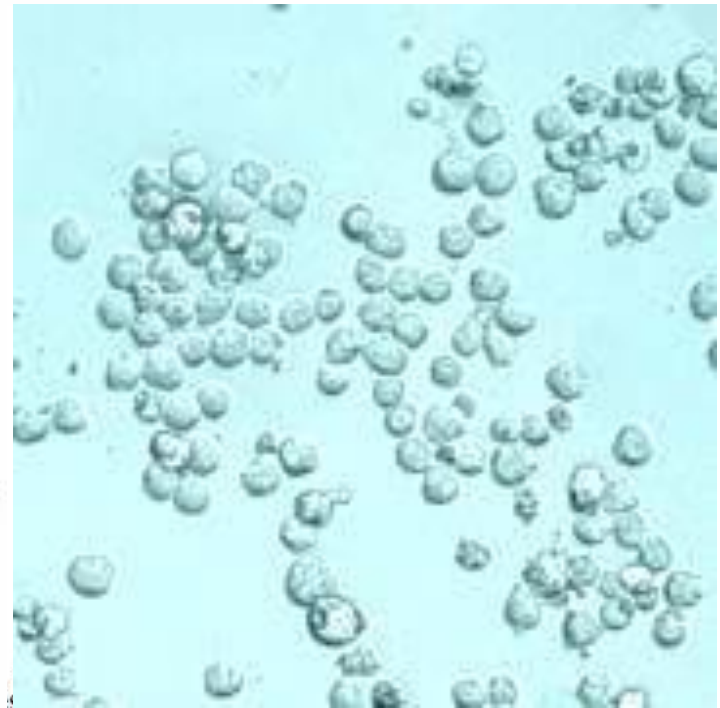
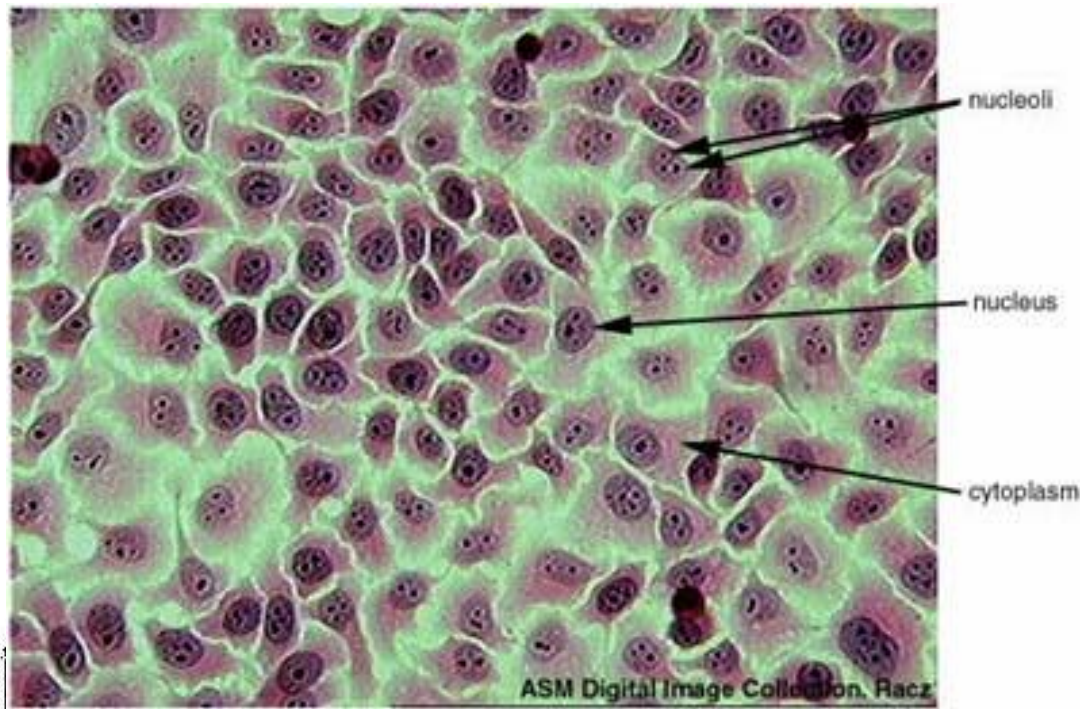
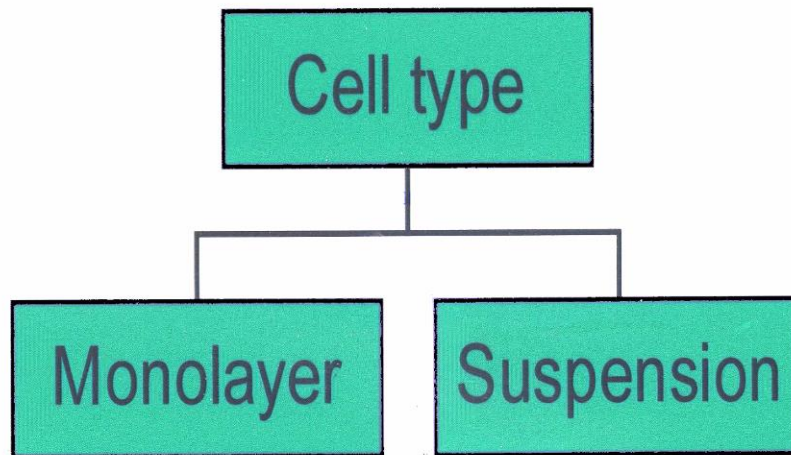
A sejtvonalak egy része csak felülethez kötve növekszik (monolayer, kontakt gátlás) → speciális tenyésztő edények

Van néhány, ami szuszpenzióban is szaporodik (CHO, BHK, VeRo, HeLa), mint a mikrobák → fermentorszerű készülékek.

Általában emlős sejteket tenyésztenek, de előfordul madár és rovar sejtek tenyésztése is.



Tenyészetek növekedése



A sejtenyésztés jelentősége

- kutatás: az állati sejtekre jellemző biokémiai utak, különböző sejtszintű szabályozások
- rekombináns fehérjék előállítása (pl. interferonok, növekedési hormonok, stb.)
- monoklonális ellenanyagok (immunfehérjék) termelése (hibridóma sejtekkel)
- vírusok szaporítására vakcinagyártás céljából
- állatkísérletek kiegészítése, részleges helyettesítése



A fenntartás korlátja

A gerincesek legtöbb sejtje csak korlátozott számban osztódik az izolálást követően, azaz a tenyészet előregszik (= szeneszencia)

Okai:

1. a kromoszómavégek (telomérák) minden osztódási ciklusban bekövetkező megrövidülése
2. aktiválódnak a sejtciklust ellenőrző (és azt leállító) mechanizmusok

Csak a tumor- és a rovarsejtek osztódnak korlátlanul (immortality).



Szaporítható sejtípusok:

Szinte minden szövet szaporítható, az izom és ideg kivételével. Az érett vérsejtek nem osztódnak.

Fibroblaszt (kötőszövet): generációs ideje kicsi, felületeken gyorsan nő, túlnövi az egyéb szöveteket

Epitheliális (hám) sejtek: sok specializálódott sejt van

A korai embrionális eredetű sejtek jól szaporodnak

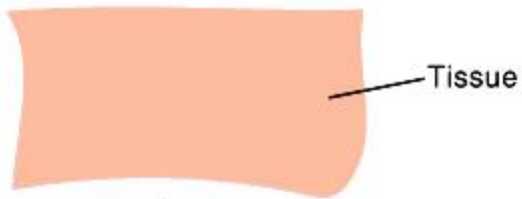
Rágcsálók (pl. egér, patkány, hörcsög) sejtjei is



Sejtpreparálás tenyésztéshez

1. A sejttenyésztéshez szükséges oldatok elkészítése.
2. A tenyésztés céljára felhasználandó szövet előkészítése.
3. Enzimes sejtdisszociáció: kollagenáz, tripszin és egyéb proteáz enzimek alkalmazásával
4. A sejtszuszpenzió szűrése a sikeresen diszpergált sejtek és a megmaradt szövetdarabok szétválasztására.
5. A sejtek centrifugálása
6. A sejttöledék reszuszpendálása, friss tápfolyadékban.





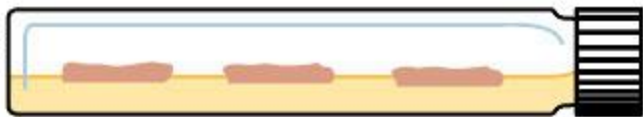
(1) Mince tissue into small fragments



(2) Incubate with a protease (trypsin) to disperse cells



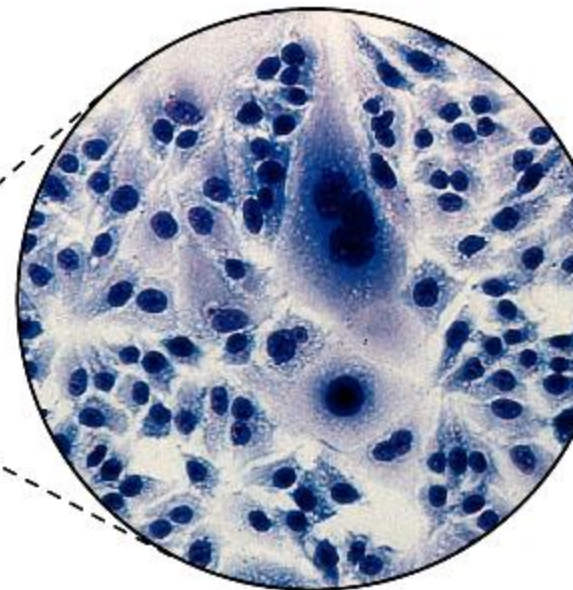
(3) Place fragments into flask with growth media; allow cells to grow



(4) Cells settle on surface of glass and grow into a confluent single layer, termed a monolayer



Monolayer



100mm

Sejtpreparálás tenyésztéshez

Ha elérték a megfelelő sejtsűrűséget, a tenyészetből szubkultúrákat készítenek, ezek egy részét tárolásra/deponálásra előkészítik (→ eltartás ld. később), illetve közvetlenül továbbtenyésztésre, manipulációra vagy termelésre használják fel.

Szubkultúra: egy genetikailag homogén tenyészetet több résztenyészetre osztanak, amelyeknek további felhasználása eltérő lehet (pl. konzerválják, termelésre használják, stb).



Sejtvonalak eltartása

Egy sejtvonal átlagosan 100 átooltás után előregszik, szaporodó képessége csökken, majd a szaporodás leáll.

Ezért „gazdálkodni” kell a szaporítási ciklusokkal.

Célszerű a preparálás után kevés átooltással számos szubkultúrát készíteni, és ezek nagy részét tartósítani. Ez az ún. „Master cell bank”, amihez vissza lehet nyúlni, ha a használatban lévő tenyészetek előregedtek, vagy befertőzödték.

Az egyes munkahelyeken (labor, üzem) is létrehozhatnak tartósan tárolt szubkultúrákat a kapott sejtvonalakból, amihez vissza lehet nyúlni a szaporodó tenyészetek elvesztése esetén („working cell bank”).

Célszerű a tenyészeteket és az átooltásokat törzskönyv-szerűen nyilvántartani.



Az állati sejtenyésztés tápoldatai

Tápoldatok: reprodukálni kell a természetes környezetet:
→ vér, sejtközi folyadék (sokkomponensű, drága)

- Szénforrás: glükóz (mint a vércukor), glutamin! → energia és N-forrás.
- 15 - 20 féle aminosav,
- vitaminok,
- koenzimek,
- lipidek,
- ásványi ionok (pontos összetétel, ozmózis nyomás)



Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Component	D5546 [1×] g/L	D5648 g/L		D5546 [1×] g/L	D5648 g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379	0.10379
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS		
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	<i>myo</i> -Inositol	0.0072	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Niacinamide	0.004	0.004
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	<i>D</i> -Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—	0.004
L-Glutamine	—	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004	—
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	OTHER		
L-Leucine	0.105	0.105	<i>D</i> -Glucose	1.0	4.5
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	HEPES	—	—
L-Methionine	0.03	0.03	Phenol Red • Na	0.0159	0.0159
L-Phenylalanine	0.066	0.066	Pyruvic Acid • Na	0.11	—
L-Serine	0.042	0.042	ADD		
L-Threonine	0.095	0.095	Glucose	—	—
L-Tryptophan	0.016	0.016	L-Glutamine	0.584	—
			Sodium Bicarbonate	—	3.7

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

SZÉRUM: a sejtvonalak nagy része igényli a vérfehérjék jelenlétét is, enélkül a legtöbb sejtvonal elpusztul.

Ezt újszülött állatok (borjú, csikó) vérszérumával biztosítják (5-15%). Ez nagyon drága (és nehezen reprodukálható), ezért törekszenek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.

Komplex rendszer, az albumin mellett sok szabályozó, serkentő és gátló faktort tartalmaz.



Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

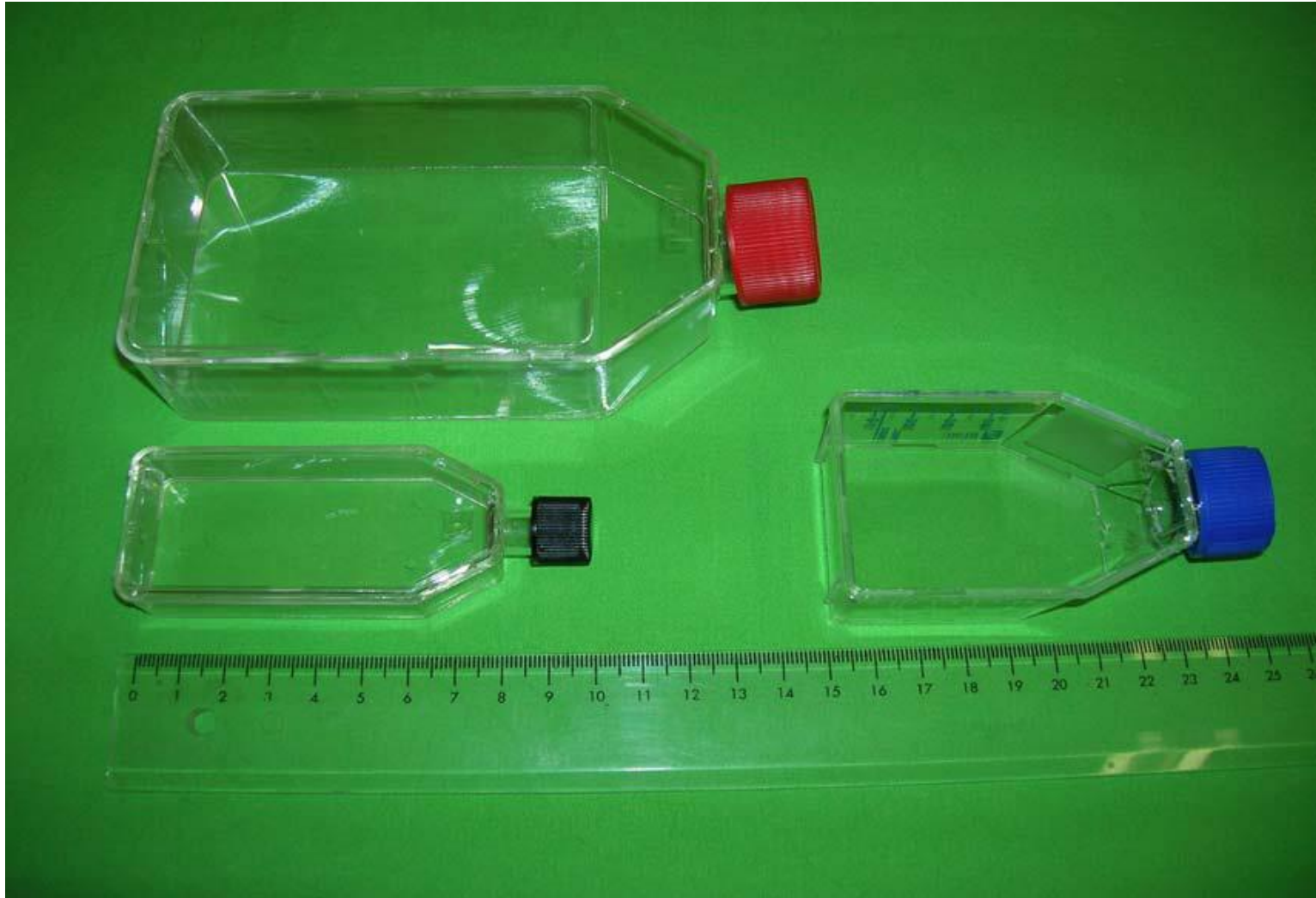
- nagyon kíméletes keverés,
- a levegőztetésnél sem lehetnek buborékok

Az oxigénigény nagyon kicsi, rendszerint elég a fejtér-fogatot átöblíteni levegővel. Sok sejtvonat kedveli a CO₂ jelenlétét (2-5%)

Hőmérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C, rovarsejteknél 25-30 °C



Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Felület növelése

Multitray



roller bottles

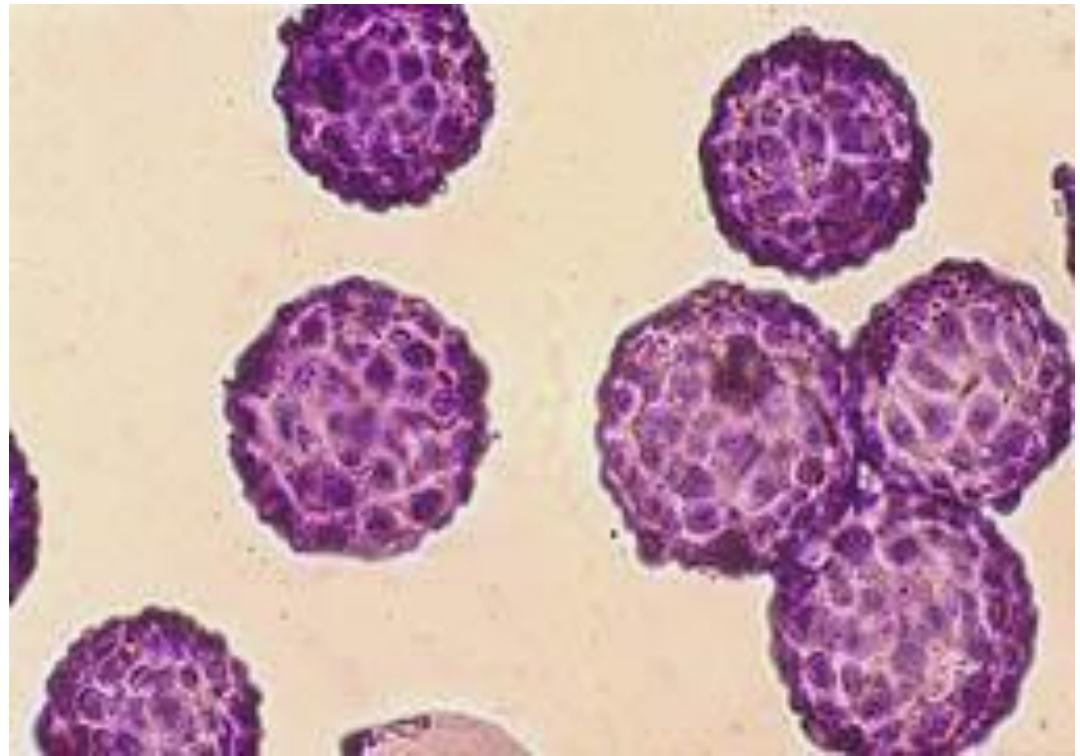


Mikrokarrieres tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis



kialakult monolayer



Mikrokarrieres tenyésztés

van Wezel 1967: DEAE Sephadex A50-en

Apró, szuszpendált gyöngyök felületén,

átmérő: 100-300 μm ,

sűrűség: 1,02-1,05 g/cm^3 (lebegésben tartható),

A fermentor térfogatának 8-15%-a hordozó,

felülete 0,5-1,5 m^2/l , ami 10-30 forgó palacknak felel meg,

= nagy produktivitás

Előnyei:

- nagy felületet be lehet bevinni egy adott reaktor-térfogatba
- viszonylag homogén környezet
- nincs szükség új reaktortípusokra



Mikrokarrieres tenyésztés

Lépések:

inokulum: forgó palackból a tenyészetet tripszinnel leoldják

A sejtek megtapadnak a gyöngy felületén, átlagosan 5-6 sejt egy gyöngyön, elszaporodnak, egy rétegben nőnek (monolayer, kontakt gátlás),

függ: sejtvonaltól, mikrokarrierek jellemzőitől, a sejt növekedési fázisától, a médium összetételétől és a sejt/mikrokarrier számaránytól



Mikrokarrieres tenyésztés

Keverés: az immobilizált sejtek érzékenyebbek a nyírásra, lekerekített keverők, nagy keverő átmérő, kis fordulatszám

Levegőztetés: direkt levegőztetésnél a felszálló és szétpukkanó buborékok károsíthatják a sejteket, ezért a felső légtérben vagy indirekt módon.

A gyöngyök könnyen leülepednek, fölötte a tápoldat lecserélhető, illetve könnyű feldolgozni.

A gyöngyöket nem lehet/érdemes újra felhasználni.



„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú mozgatás

Mikrokarrieres és szuszpenziós tenyésztésre egyaránt



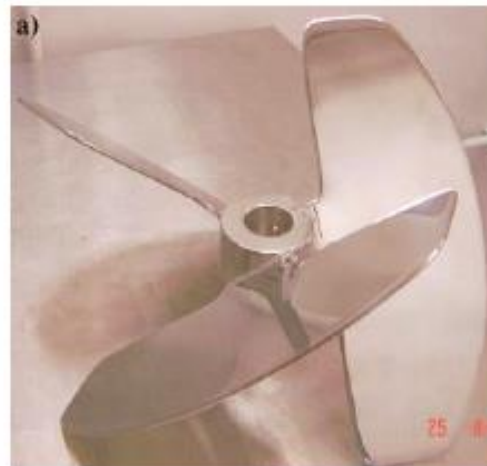
Kevert reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrierrel felületi tenyészetekhez is használható.

Energiabevitel kisebb, kevesebb O_2 kell, így kevésbé károsodik a sejt, néha elegendő a felületi levegőztetés, a cél csak a homogenizálás és szuszpenzióban tartani a sejteket/mikrokarriereket

perfúziós levegőztetés: valamilyen elválasztón keresztül (acélszita, szilikon cső), nincs károsodás

Keverő: lekerekített formák, hajócsavar, 25-250 rpm



BME Fig. 13 (a) An ABEC 'elephant ear' impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil



Összehasonlítás

Szakaszos: rossz produktivitás, sejtkoncentráció $\sim 10^6$ sejt/ml, ~ 1 hét

Rátáplálásos: glükóz + aminosavak, 3 hét, nagyobb produktivitás

Folytonos (lefejtés - rátöltés): sejtkoncentráció $\sim 10^7$ sejt/ml, 6 hét, termék is koncentráltabb, a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak 1%-a

A reaktor és módszer kiválasztása az alapján történik, hogy mennyi a szükséges termék mennyiség:

rEPO: 100 μ g/beteg \rightarrow elegendő a forgó palack,

rtPA: 100 mg/ beteg \rightarrow fermentor



Klónozás

- Klón = hasonmás
- A szaporodás olyan módját jelenti, amely nem jár a DNS szekvenciájának megváltozásával (a mutációktól eltekintve).
- Más szóval az utód génekészlete teljesen megegyezik az eredeti élőlény génekészletével.



Jango Fett klónjai a Star Wars-ból

Mennyire science fiction a klónozás?

- A definíció szó szerinti értelmében egyáltalán nem.
- Az ivaros szaporodásra nem képes sejtek ugyanis mind egymás klónjai.
- Egy sejt egyszerű kettéosztódása két klónt, vagyis a kiindulási sejttel genetikailag azonos utódsejteket eredményez.
- Az ivartalanul szaporodó élőlények (pl. az összes prokarióta vagy a sarjadzással osztódó elesztő sejtek) tehát mind klónozzák magukat.
- Egy ivaros szaporodó többsejtű élőlény összes testi sejtje annak a sejtnek a klónja, amely a petesejt és a hímivarsejt egyesülése következtében alakult ki a megtermékenyítéskor.



Mennyire science fiction a klónozás?

- Az egypetájú ikrek is a természetben előforduló klónozás példái.
- Az egypetájú ikrek egyetlen zigóta (megtermékenyített petesejt) klónjai, ahol a legelső osztódások során bekövetkező „rendellenesség” miatt két külön szervezet indul fejlődésnek.



*Actresses Mary Kate Olsen, left, and Ashley Olsen arrive at the Vanity Fair Oscar Party, Sunday, March 24, 2002, in West Hollywood.
(Chris Weeks / Associated Press)*



Hogyan tölthetnek be eltérő funkciót a testi sejtjeink, ha mind egymás klónjai?

A testi sejtek mindegyike rendelkezik a szervezet felépítéséhez szükséges összes információval.

Azonban a génállomány átírása az egyes sejtípusokban eltérő módon van szabályozva.

Más-más génszakaszok aktívak egy izomsejtben, egy bélhám sejtben vagy egy agyi idegsejtben, pedig a genetikai állományuk teljesen azonos (a mutációktól eltekintve).

Differenciálódott sejtek: azok a sejtek, amelyekben már eldőlt, hogy mely génszakaszok átírása megengedett és melyeké tiltott. Ezek már „elköteleződtek” valamilyen konkrét feladatkör betöltésének irányába.

Őssejtek: azok a sejtek, amelyekben még dinamikusan változhat, hogy mely génszakaszok aktívak és melyek átírása válik gátolttá. Ezek nincsenek még konkrét feladatkör betöltésére elköteleződve.



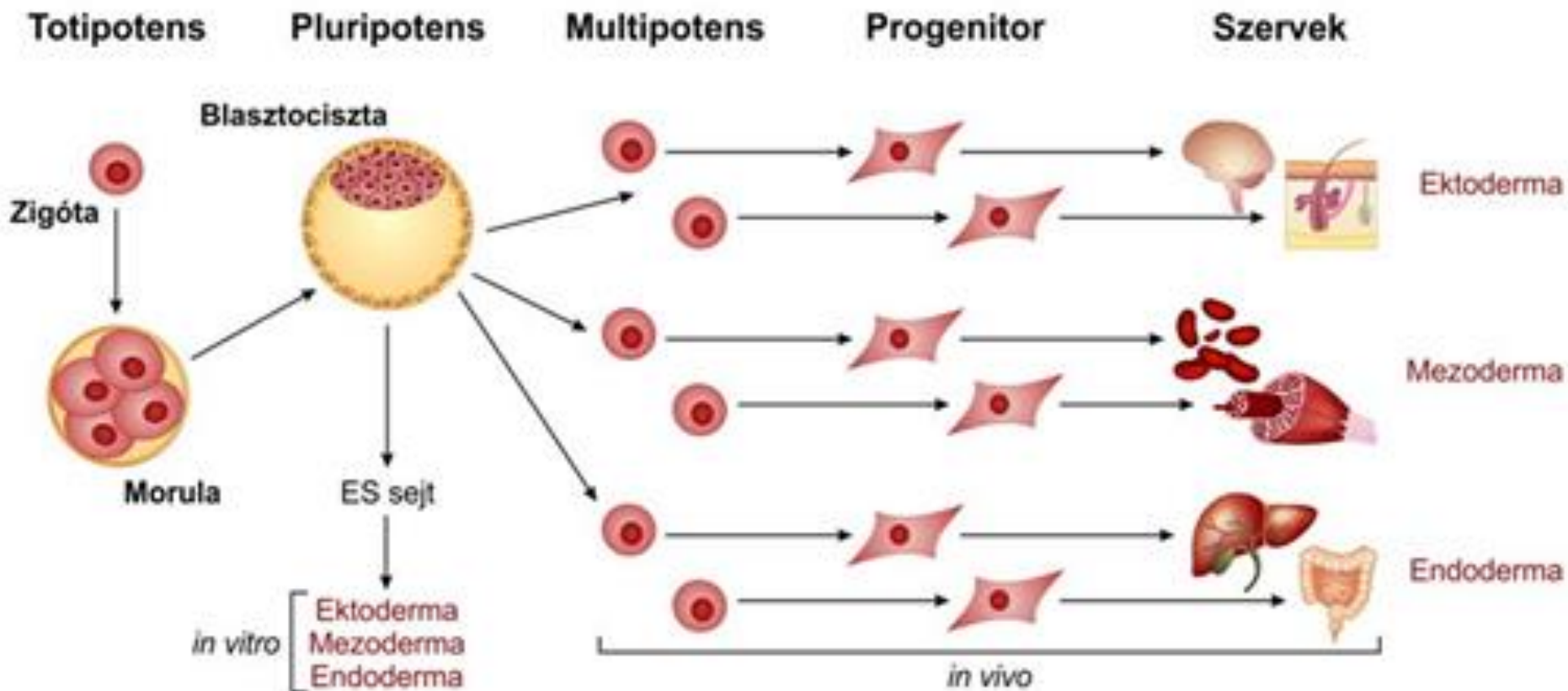
Mesterséges klónozás

- Több szintje létezik: molekuláris klónozás, sejt klónozás, szövet klónozása, teljes élőlény klónozása.
- Molekuláris klónozás: pl. plazmidok bejuttatása egy sejtbe és ezek lemásoltatása a sejt DNS replikációs rendszerével.
- Sejt klónozás: osztódással szaporodó egysejtű élőlények mesterséges szaporítása. Eukarióta és emlős sejtvonalak mesterséges szaporodása. A daganatos sejtek is „klónozzák magukat”.
- Szövet vagy teljes élőlény klónozása:
őssejtekből (tehát a még nem elköteleződött sejtekből) kell hozzá kiindulni.



Össejt típusok

A szervezetünkben előforduló szöveti őssejtek multipotensek.



➤ *Többsejtű, ivarosán szaporodó élőlény klónozásához az adott élőlény embrionális őssejtjeiből (~pluripotens őssejtjeiből) kell kiindulni.*

➤ Az egypetűjű ikrek fejlődése is az embrionális őssejtek elköteleződési szintjén válik ketté.

➤ A multipotens és unipotens (progenitor) őssejtek terápiás jelentősége

A szövet szintű klónozás és a teljes élőlények (csak állatok!) klónozásának terápiás célja

Azoknak a tudományos ismereteknek a megszerzése, amelyek segítségével:

- Egy beteg szervezetéből egy testi (= valamilyen irányba elköteleződött) sejtet izolálni lehet,
- majd ebből a beteg számára szükséges sejteket vagy szövetet lehet létrehozni,
- Végül pedig a beteg szervezetébe visszajuttatni.
- Így a visszaültetést követően a beteg ember immunrendszere ezeket a sejteket vagy szöveteket a sajátjának fogja majd felismerni.



Teljes élőlény klónozása embrió osztással

- Pluripotens embrionális őssejtekre van hozzá szükség.
- Emberi élőlény szervezet szintjén történő klónozása tilos.
- Embrió osztás: egypetējű ikrek mesterséges létrehozása. →
Itt a zigóta osztódásának kezdeti szakaszában (8 sejtés osztódási állapot) avatkoznak be, ahol a sejtek még embrionális őssejtként vannak jelen.
- Ekkor az embriót több részre hasítják, leggyakrabban négy, két sejtből álló darabra. Az így kapott embriók génállománya azonos egymással.
- A leválasztott sejteket a ezután egy üres peteburokba juttatják, ahol olyan fázisig engedik fejlődni, amíg beültethető lesz egy nőstény állat méhében.



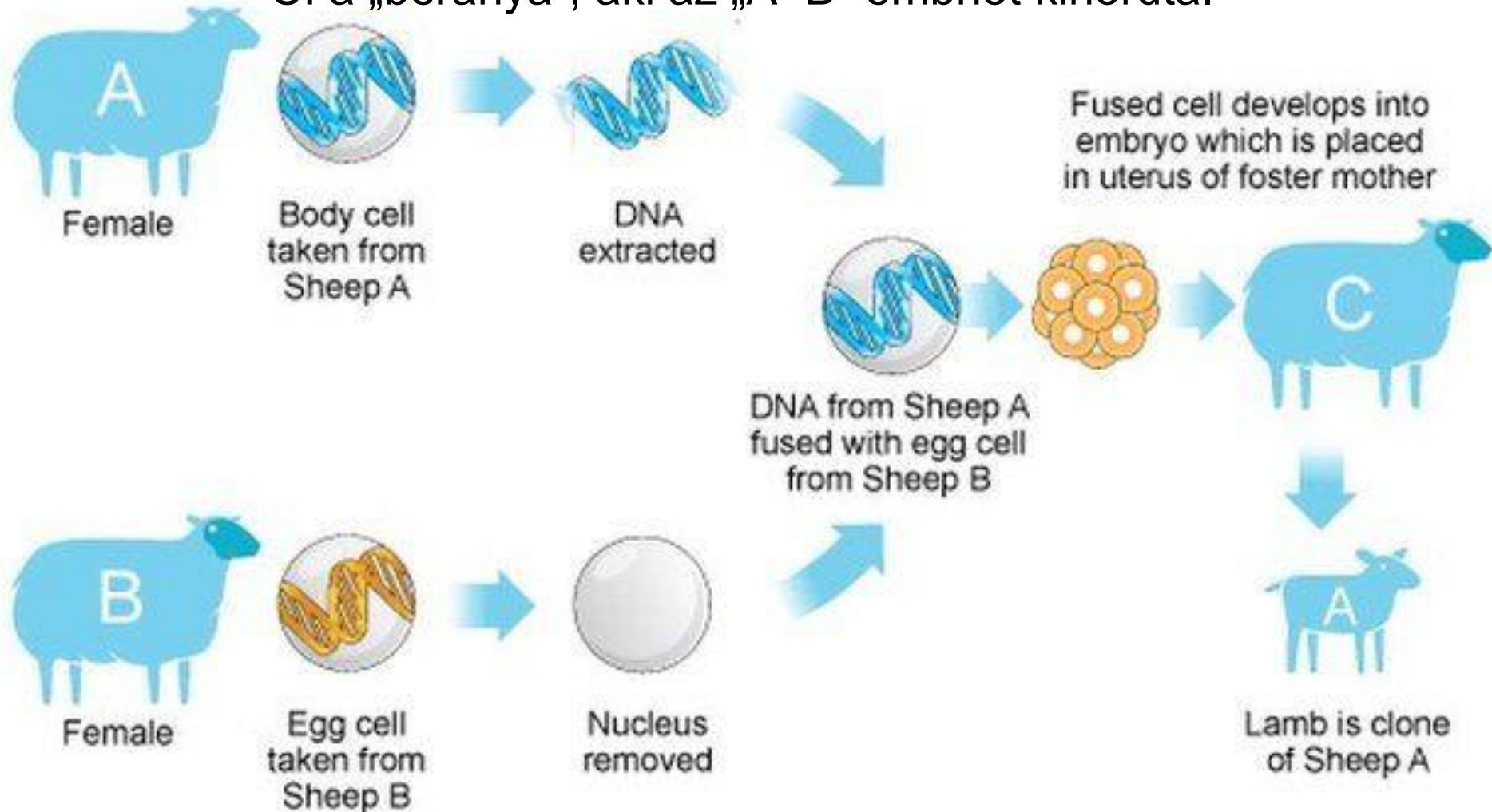
Teljes élőlény klónozása egy testi sejtből

- Pluripotens embrionális őssejtekre van hozzá szükség.
- Ehhez a már elköteleződött (differenciálódott) testi sejtrel „el kell feledtetni” a feladatkörét. Vagyis fel kell oldani a sejt génállományának szabályozott, korlátozott módon történő átírását.
- Erre 3 lehetőség ismert a szakirodalomban:
 1. Testi sejtmag átvitele sejtmagjától megfosztott embrionális őssejtbe (petesejtbe)
 2. Testi sejt fúzionáltatása embrionális őssejttel (petesejttel).
 3. Indukált pluripotens őssejtek létrehozása.



Testi sejtmag átvitele sejtmagjától megfosztott embrionális őssejtbe

- Ezzel a módszerrel sikerült Dolly-t, a klónozott bárányt létrehozni.
- 3 „édesanyja” volt. A: a DNS gazdája. B: a petesejt gazdája.
C: a „béranya”, aki az „A+B” embriót kihordta.



Dolly, a bárány

- Dolly (1996-2003) egy nőstény Finn-Dorset fajtájú házi juh volt.
- Ő volt az első emlős állat, akit testi sejt DNS-éből sikerült klónozni.
(Vö.: az embrió osztás nem testi sejtből, hanem közvetlenül embrionális őssejtekből indul ki.)
- Az első sikeres felnőtt állat klónozás testi sejt DNS-éből: John Gurdon, béka, 1962 → megosztott Nobel-díj, 2012
- Dolly nem volt egészséges. Krónikus ízületi gyulladásban szenvedett, majd súlyos proorgesszív tüdőbetegséget kapott.
- 6,5 éves korában súlyos állapota miatt el kellett altatni, pedig fajtájának várható élettartama 11-12 év.
- A klónozás volt-e felelős Dolly rossz egészségi állapotáért és korai haláláért?
- Elképzelhető-e, hogy Dolly DNS-e már születése pillanatában annyi idős volt, mint a forrásaként szolgáló juh emlőmirigy sejtvonalban?



Dolly „testvérei”

Healthy ageing of cloned sheep.

Sinclair KD, **Corr** SA, **Gutierrez** CG, **Fisher** PA, **Lee** JH, **Rathbone** AJ, **Choi** I, **Campbell** KH, **Gardner** DS.

Nat Commun. 2016 Jul 26;7:12359. doi: 10.1038/ncomms12359.

- A testi sejtmag petesejtbe való átvitelével történő klónozás hatékonysága kicsi a nagy embrió- és újszülött kori halandóság miatt.
- Ennek közvetlen okai vese és szívfejlődési rendellenességek, valamint tüdő megnövekedett vérnyomása.
- Viszont ezeknek a fejlődési rendellenességeinek a konkrét molekuláris biológiai okai még nem tisztázottak.
- DE: amelyik bárány túléli az újszülött kort, az a természetes úton fogant bárányokéval megegyező élettartamra és egészségi állapotra számíthat.
- Ezt Dolly „testvérei” bizonyítják, akiket Dolly halálát követően ugyanabból a juh emlőmirigy sejtvonalból klónoztak, mint Korábban Dolly-t magát.
- Tehát a DNS korábbi „életkora” a sejtmag petesejt burokba juttatásának köszönhetően



valamilyen molekuláris mechanizmus eredményeként törlődik

Indukált pluripotens őssejtek létrehozása

[Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures.](#)

Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S.

Nat Protoc. 2007;2(12):3081-9.

- Tamashi és Yamanaka japán kutatók egér fibroblaszt (kötőszöveti) sejteket tudtak pluripotens őssejteké visszaalakítani
- 4 **transzkripciós faktor** segítségével tudták a már elköteleződött kötőszöveti sejtek pluripotenciáját indukálni.
- Vírus vektorral vitték be ezeket a transzkripciós faktorokat a már differenciálódott kötőszöveti sejtekbe.
- DE: ezekben a sejtekben nem törlődött a DNS genetikai életkora...



Photo: U. Montan
Sir John B. Gurdon
Prize share: 1/2



Photo: U. Montan
Shinya Yamanaka
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 was awarded jointly to Sir John B. Gurdon and Shinya Yamanaka "for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"

Köszönöm a figyelmet!

