

11. óra

Állati (és emberi) sejtek tenyésztése
2020. május 4.

Bevezetés

- Az élőlények hierarchikus szerveződése:
- Sejt → Szövet → Szerv → Szervrendszer

- Egyedfejlődés:
- embrionális őssejt → differenciálódott sejtek

Figyelemre méltó, hogy a mutációktól eltekintve egy többsejtű élőlény minden egyes testi sejtje ugyanazt a genetikai információt hordozza, csak a génállományának más-más részei aktívak.

Történeti áttekintés

1830 Schleiden-Schwann: kidolgozták a sejtelméletet, miszerint minden élőlény sejtekből áll

1855 Virchow: minden sejt sejtből lesz (omnis cellula e cellula)

1885 Roux embrionális (madár) sejtek in vitro fenntartása

1967 Van Wezel: a mikrokarrieres sejttenyésztés

1970 rekombináns DNS technika alkalmazása állati sejteknél

1975 Köhler-Milstein: hibridóma sejt előállítása és monoklonális antitestek (immunfehérjék) termelése

A tenyésztés alapjai

- Sejttenyésztés:** egymástól elválasztott (diszpergált) sejtek fenntartása “kémcsőben” = *in vitro* körülmények között.

- Szövettenyésztés:** a szövet fenntartását jelenti oly módon, mely lehetővé teszi a sejtek differenciálódását ill. a szövetre jellemző szerkezet (struktúra) és/vagy funkció megőrzését.

Állati sejt/szövettenyésztés

- Egészen más, mint a mikroorganizmusok tenyésztése. Miért?
- Mert a mikróba sejtek nincsenek alárendelve egy felsőbb irányító rendszernek, amit szervezetnek hívnak. “Egyéni vállalkozók”, szemben a többsejtű élőlények sejtjeivel, amik “egy multinak dolgoznak”. Ebből következően a többsejtű élőlények sejtjei a szervezet szabályozásától nem függetlenek. Létezésükhöz, növekedésükhöz, szaporodásukhoz szükségük van a szervezet többi sejtjével való kommunikációra (információ cserére).
- Ennek egyik következménye, hogy az egészséges állati sejtek nem osztódnak korlátlanul* akkor sem, ha elegendő tápanyag áll rendelkezésükre. Az osztódási hajlandóságuk függ attól, hogy a környezetükből milyen jelzések érkeznek hozzájuk. Közvetlen környezetüket a szomszédos sejtek, tágabb környezetüket a szervezet távolabbi részei jelentik, melyekkel a szövetközötti folyadék (szövetnedv és/vagy vér) útján kommunikálnak.
- Mi következik ebből a fenntartásukra nézve?
- * Emlékeztető: a prokarióták önmagába visszazáródó, ún. cirkuláris DNS-sel rendelkeznek, az eukariótáké viszont lineáris, tehát van “eleje” és “vége”. → az eukarióta DNS minden osztódáskor kicsit rövidül, ha nincs olyan mechanizmus a sejtben (telomeráz enzimek), ami ellensúlyozhatná ezt.

Miben más az állati sejtek tenyésztése a mikrobák tenyésztésétől?

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

A növekedéshez nem elég a tápoldatba keverni minden számukra szükséges táptalaj komponenst, hanem olyan anyagokat is kapniuk kell, amik növekedési és osztódási jelként vagy utasításként szolgálnak számukra.

Előfordul azonban, hogy egy sejt vagy sejtcsoport a szervezetben betöltendő szerepéhez képest nagyobb önállóságra tesz szert. Ezek a rákos sejtek. Az állati sejttenyésztés során többnyire rákos sejtvonalakat használnak.

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

Milyen élőlények sejtjeit szokták tenyészteni?

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

Mi értelme van állati sejteket tenyészteni?

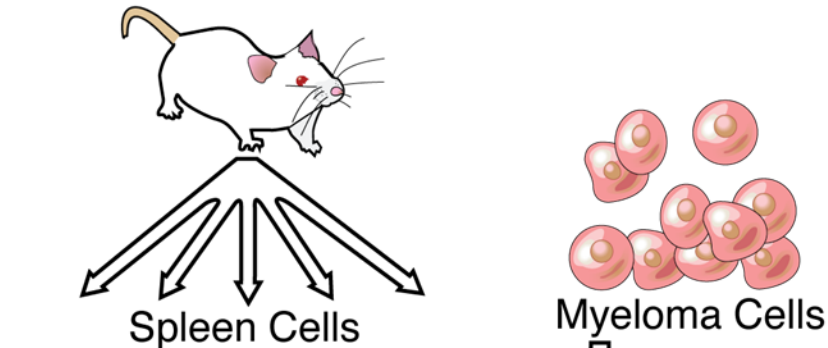
- kutatás: az állati sejtekre jellemző biokémiai utak, különböző sejtszintű szabályozások
- állatkísérletek kiegészítése, részleges helyettesítése
- rekombináns fehérjék előállítása (pl. interferonok, növekedési hormonok, stb.). Egyes **glikozilált fehérjéket** csak állati sejtenyészttel lehet előállítani, mert a prokarióta vagy egysejtű eukarióta sejtek nem tudják a rájuk jellemző **glikozilációs mintázatot** előállítani.
- A glikoziláció szén-hidrát (“cukor”) egységek hozzákapcsolását jelenti a fehérjékhez. Nem minden fehérjére jellemző. A fehérje szerkezet stabilizálásában, a fehérjék más molekulákkal való kölcsönhatásainak elősegítésében, a saját és idegen eredetű fehérjék megkülönböztetésében lehet szerepe. Prokarióták is képesek lehetnek rá, de az általuk a fehérjékhez kapcsolt szén-hidrát egységek más szerkezetűek, mint amit az emberi szervezet elő tud állítani. Részben ez a különbség játszik szerepet abban, hogy a veleszületett immunrendszer képes gyorsan felismerni a kórokozókra jellemző sejtfelszíni molekula mintázatokat, és ezáltal egy fertőzésre gyorsan reagálni.
- monoklonális ellenanyagok (immunfehérjék) termeltetése (hibridóma sejtekkel)
- vírusok szaporítására vakcinagyártás céljából

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 tumorsejtek osztódnak korlátlanul (immortality).

Állati protoplasztok – hibridóma sejtek

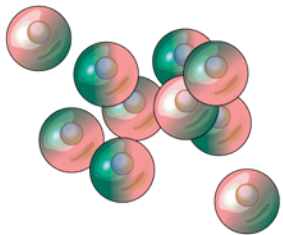
Mouse challenged with antigen



Fusion

Hybridomas

Culture in HAT Medium
Select for positive cells



Harvest monoclon antibodies



- **monoklonális antitestek (mAB-ok)** előállítására használják őket.
- Ezek azonos immunsejtek klónjai által termelt ellenanyagok, amelyek azonos molekuláris célpontot ismernek fel.
- A molekuláris célpontok olyan molekulák, amelyek aktiválják az immunrendszert (sejtek vagy vírusok felszínén található ún. antigének, allergia esetén akár pollenek, autoimmun betegségek esetén a szervezet egy saját molekulája).
- Lehetséges mAB-ot előállítani elméletileg bármilyen sejt felszíni vagy sejten kívüli molekula ellen, amit egy adott szervezet (példánkban a fehér egér) immunsejtjei idegenként felismerni képesek.
- Példa: rákellenes gyógyszerként felhasznált mAB-ok

Kutatásban gyakran használt daganatos emberi és állati sejtvonalak

- “Halhatatlanná tett” vagy immortalizált sejtvonalaknak is nevezik őket, mert nem működnek bennük a sejtosztódást gátló, sejten belüli vagy kívülről érkező mechanizmusok.

CHO = Chinese hamster ovary, kínai horcsog petefeszék sejtvonala.

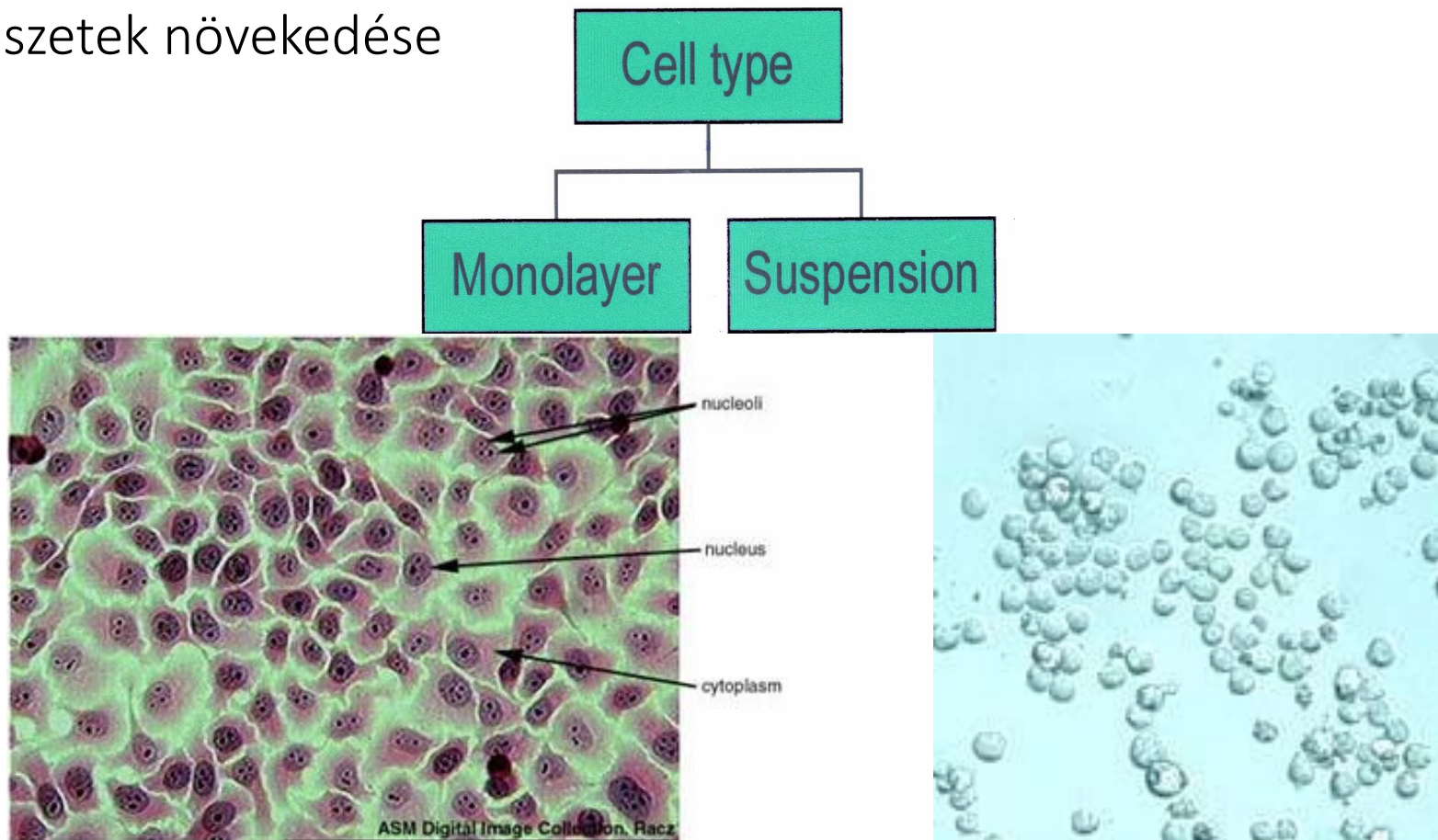
BHK = Baby hamster kidney, embrionalis horcsog vese sejtvonala

VeRo = majom veseszövet

HeLa = Személynevből, egy Henrietta Lacks nevű hölgynek állít emléket, akinek a nőgyógyászati tumorából izolálták ezt a sejtvonalat.

- A legelsőként izolált és leggyakrabban használt immortalizált emberi sejtvonala
- 1951-ben izolálták Ms. Henrietta Lacks szövetmintájából.
- 1953-ban már a poliomyelitis (gyermekbénulás) vírus elleni vakcina laboratóriumi teszteléséhez használták a sejtvonalat.

Tenyészetek növekedése



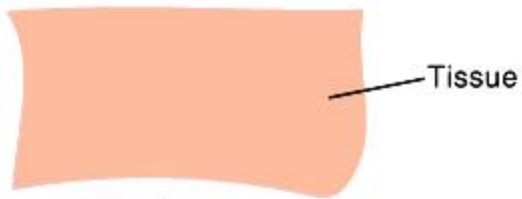
- Balra egy letapadó sejtenyészet mikroszkópos képe, jobbra egy lebegő, ún. szuszpenziós tenyészet mikroszkópos képe látható.
- A tápoldatban való lebegés nem jellemző az állati sejtekre, ezt rákos sejtvonalakkal dolgozva lehet csak elérni. Kivétel: a vér sejtsejtes elemei, így a fehérvérsejtek (az immunrendszer sejtsejtes elemei).
- A lebegő sejtek teljes felületükkel érintkeznek a tápoldattal, így nagyobb felületen keresztül zajlik az anyacsere a sejt és a környezet között.

Milyen típusú sejteket lehet szaporítani?

- Szinte minden szövet szaporítható, az izom és ideg kevésbé. 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
- FONTOS:** nem csak rákos állati sejtvonalak tenyésztésével foglalkoznak, egészséges sejt kultúrákat is lehet szaporítani. Csak ebben az esetben a korlátozott számú osztódás határt fog szabni a felhasználás időtartamának.

Hogyan lehet egy állati szövetmintából állati sejtenyészetet készíteni?

1. A sejtenyésztéshez 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 sejtüledék reszuszpendálása, friss tápfolyadékban.



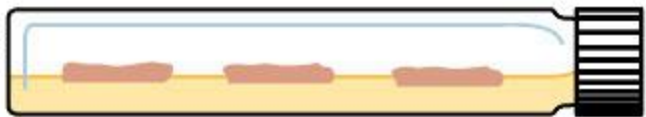
(1) Mince tissue into small fragments



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



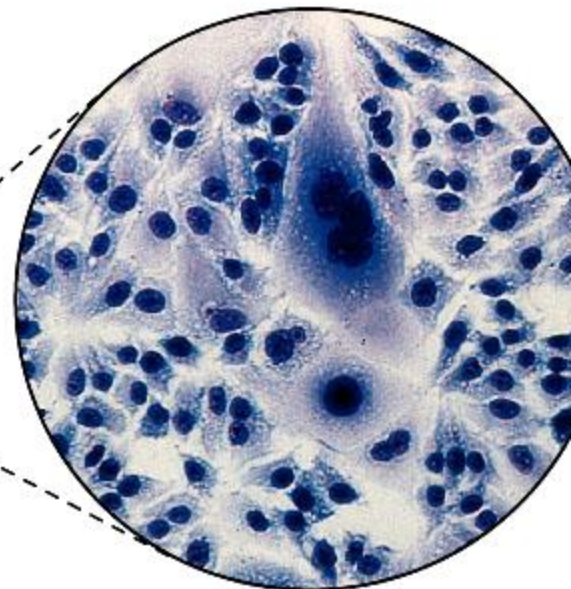
(3) Place fragments into flask with growth media; allow cells to grow



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



Monolayer



100mm

Szubkultúra készítése a véges számú osztódás korlátainak ellensúlyozására

- Ha elérték a megfelelő sejtsűrűséget, a tenyészetből szubkultúrákat készítenek, ezek egy részét tárolásra/deponálás-ra 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 átoltás után előregszik, szaporodó képessége csökken, majd a szaporodás leáll.
- Ezért „gazdálkodni” kell a szaporítási ciklusokkal.
- Célszerű a preparálás után kevés átoltással 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 befertőződtek.
- 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 átoltásokat törzskönyv-szerűen nyilvántartani.

Az állati sejttenyésztés tápoldatai “1”

- Tápoldatok: reprodukálni kell a természetes környezetet: → vér, sejtközi folyadék (sokkomponensű, drága).
- A normál sejteket vér veszi körül, illetve a sejtközi folyadék. Ez nagyon sok komponensből áll, ezeket mind bele kell mérni a tápoldatba. Míg a mikróbáknál elegendő volt a cukor, a szójadara és néhány műtrágya, az állati sejteknél sokféle, tiszta és drága anyagra van szükség:
 - 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 sejttenyésztés tápoldatai “2”

- (VÉR)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 **törekcsenek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.**
- Komplex rendszer, az albumin mellett sok szabályozó, serkentő és gátló faktort tartalmaz.
- Kitekintés: miért kell ehhez újszülött állat, amikor egy kifejlett marhában sokkal több a vér?
- Mert tisztább a vérszéruma. A felnőtt vérébe bele van írva az egész kórtörténete. Benne van az átélt összes fertőző betegség immunfehérjéje, az összes kapott védőoltás által létrehozott immunfehérjék, valamint a lappango vírusok és vírusfehérjék. Az újszülött állat vérében ezek még nem jelentek meg.
- A szerum komponens nagyon drága (és nehezen reprodukálható, hiszen nincs két egyforma állat, meg testverek esetében sincs tökéletes azonosság). A kutatók sok erőfeszítést tesznek a szerummentes tápoldatok kifejlesztésére, vannak is eredmények, de termelési méretben kevés technológiát valósítottak meg szerummentes tápoldattal. A szerum költsége még a laboratóriumi kísérleteket is nagyon megdrágítja. A vérszérumok legfőbb komponense az albumin (kb. 2/3), mellette még legalább 40 fehérjét lehet megkülönböztetni, és mindegyiknek van valamilyen funkciója a sejtek működésében (pl. ragasztó fehérjék, hormonok → inzulin).

Az állati sejttenyésztés körülményei

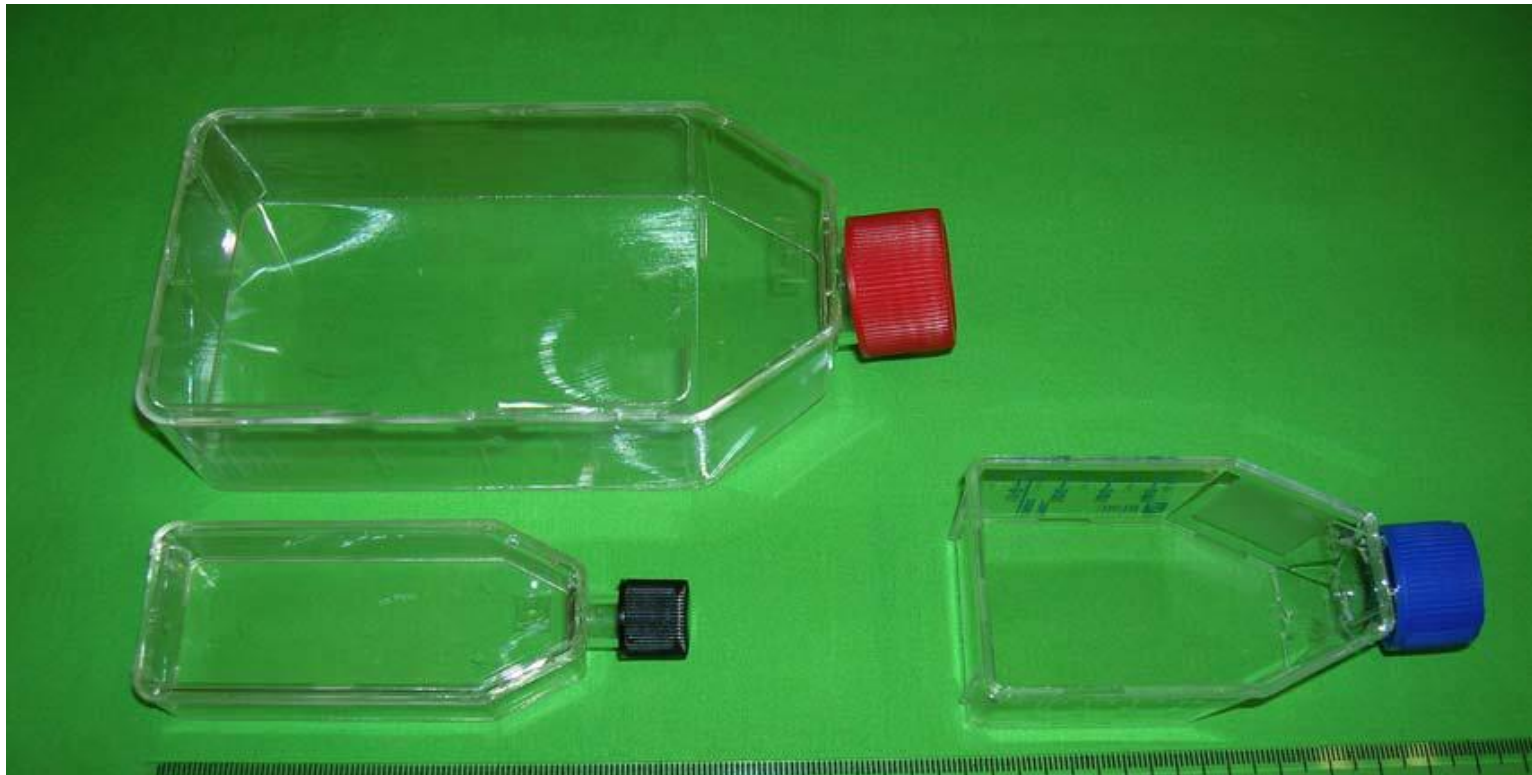
- A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyíróerőkre, mivel csak sejtembrán határolja őket, de nincsen sejtfaluk:
 - nagyon kíméletes keverés,
 - a levegőztetésnél sem lehetnek buborékok
 - Az ozmózis nyomás kiegyenlítésére is figyelni kell, hasonlóan a protoplasztok tenyésztéséhez.
- Hőmérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C, rovarsejteknél 25-30 °C
- Szerencsére az **oxigén igényük** elég kicsi, körülbelül százszor kisebb, mint egy hasonló mikroba teneszete.
- Emiatt nem kell atbuborekoltatni a folyadékon a betaplalt levegőt, hanem elegendő a folyadékfelszín felett ataramoltatni a steril levegőt.
- A kis oxigén-igeny lassu anyagcseret jelez, lassabban szaporodnak, es lassabban hasznaljak fel a cukrot is.
- Némelyik sejt vonal igényli a széndioxid jelenletet is a légtérben (2-5%). Ennek magyarázata az, hogy a szervezetben azok a sejtek, amelyek tavol vannak a gyors es intenziv gazcseretől, alacsony oxigentartalom es magas széndioxid tartalom jelenleteben működnek, azaz természetes környezetükben is magas a széndioxid szint.

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Az ábrán látható, hogy itt is használnak Petri cseszeket. A képen látható elrendezés sok (6, 12, 24, 48, 96) kis Petri csesze együttesenek fogható fel, ezeket talcának nevezik. A tálcák sorozatvizsgálatokra különösen alkalmasak.

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Az ábrán látható tenyésztőedények also sima részt használnak szaporításra, tehát a tapoldatot beoltják a sejtekkel, melyek letapadnak a felületre és monolayerrel borítják be az edény also falát. A sejt réteg annyira vékony, hogy átlátszó, szabad szemmel alig látszik. Ha egy kicsit megmozgatják az edényt, akkor lehet némi opalizálást lehet látni a felületen. Az edény nyaka nem szimmetrikusan, középen helyezkedik el, hanem felfelé eltolva. A magasabban levő nyak miatt a folyadék nehezebben löttyenhet ki. Az edények különböző méretben, sterilizálva kaphatók, anyaguk műanyag, általában egyszeri használat után eldobhatóak. Üveg edényeket nem szokták használni, mert az üveg anyagából kálium és nátrium ionok oldódnak ki, és ezek a sejtek érzékenyek az alkáli kationokra.

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



A taptalaj színe azért piros, mert adnak hozzá egy indikatort, melynek az a tulajdonsága, hogy a pH változására megváltoztatja a színt. Ezzel az esetleges fertőzéseket lehet kimutatni. Normális növekedésnél a közeg semleges marad, az indikátor megtartja piros színt. Ha viszont a tenyészet befertőződik, mert mikroba kerül bele, akkor az megsavanyítja a folyadékot, amitől az indikátor sárga színű lesz. Így ranezesre észre lehet venni a mikrobiális fertőzéseket.

Felület növelése

Nagyobb leptekű szaporításhoz minél nagyobb benőhető felületre van szükség a készülékekben. Erre többféle szellemes megoldást is kitaláltak.

Multitray



roller bottles



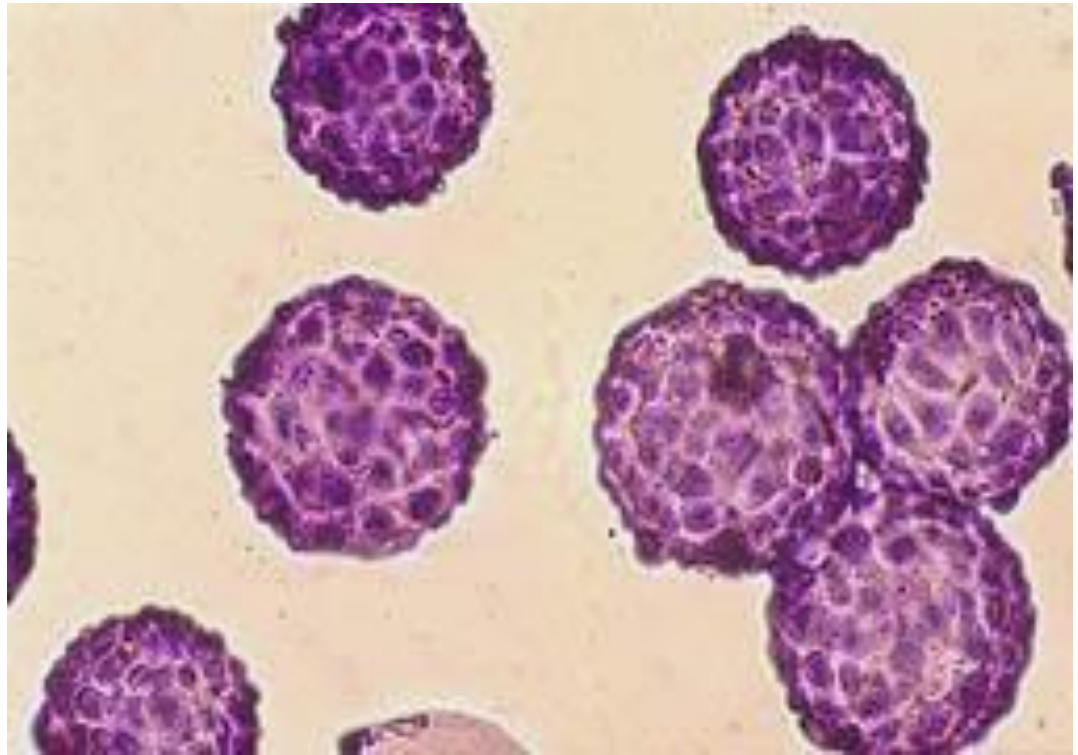
A forgó edények “szakaszos kenést” biztosítanak a belső falukra tapadó sejtkultúra számára.

Mikrokarrieres tenyésztés a sejtek rendelkezésére álló letapadási felület további növelésére

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 vagy “oltó tenyészet” készítése az első lépése: forgó palackból a tenyészetet tripszin enzimmel leoldják.

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

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

Mikrokarrieres tenyésztés

Keverés: az immobilizált sejtek érzékenyebbek a nyíróerőkre, lekerekített keverők, nagy keverő átmérő, kis fordulatszám szükséges.

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 mikrokarrie-ekkel felületi tenyészetekhez is használható.

Energiabevitel kisebb, kevesebb O_2 kell, így kevésbé káro-sodik 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 c

Kevert reaktorok

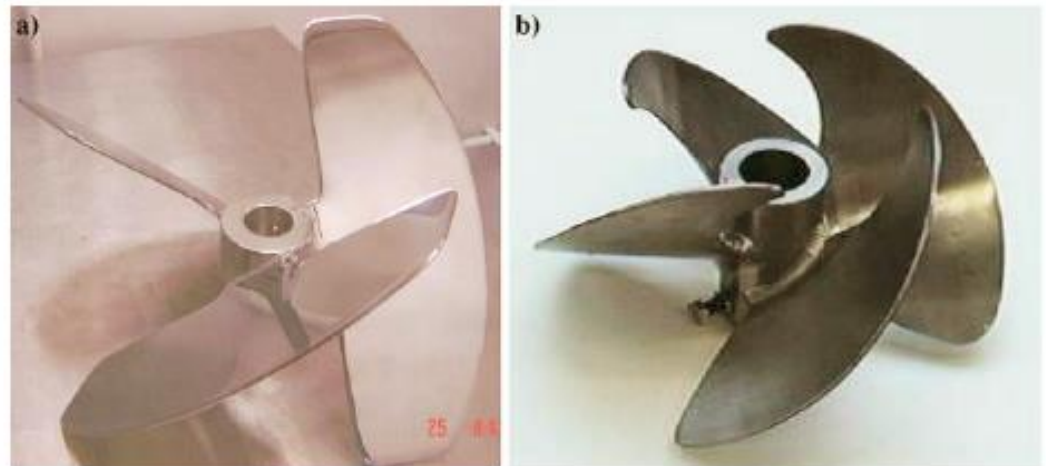


Fig. 13 (a) An ABEC 'elephant ear' impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil

• Sejtszaporítási technikák csoportosítása a tápanyag bevitel alapján

Szakaszos tenyésztés: (batch): a folyamat legelejen az összes tápanyagot bemerik tápfolyadékba, beviszik az oltótenyészetet, elindul a szaporodás, termékkepzés, majd a végén megtörténik a feldolgozás. Menet közben további tápanyagot nem adnak hozzá. Gyenge produktivitas, a sejtkoncentracio $\sim 10^6$ sejt/ml. Időtartama ~ 1 het.

Rataplalajos-szakaszos (fed-batch): a szakaszoshoz hasonlóan indul, de menetközben többször is pótoljuk az elfogyasztott tápanyagokat. Általában glukozt és aminosavakat adnak hozzá. A többszöri rataplalaj miatt akár 3 hétig is fenntartható a folyamat, és ennek megfelelően a produktivitas is nagyobb.

Felfolytonos tenyésztés (perfuzios): Itt folytonos vagy kvazi-folytonos tápanyag betaplalást alkalmaznak és ugyanakkor a terméket tartalmazó fermentleből is elvesznek. Mivel a mikrokarrierek könnyen ülepednek a keverés kikapcsolása után, fölülről a fermentle leszívható, egyszerű elválasztani, és belőle a terméket kinyerni. A hordozón levő sejtekre újra friss tápoldatot toltanak. A sejtszám egy idő után már nem növekszik, hiszen a monolayer már kialakult, de az elérhető sejtszám egy nagyságrenddel is nagyobb lehet, elérheti a 10^7 sejt/ml-t is. Ha nagyobb a sejtsűrűség, akkor nagyobb a megtermelt anyag (feherje) mennyisége is. Napi lefejtéssel és rataplalajjal akár 6 hétig is fenntartható egy termelési folyamat. Összességében a termék is koncentratibb, és a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak 1%-a.