

Biotechnologické procesy

Dnes o živočišných buňkách, potažmo pak o skupině živočišných buněk,
kterým říkáme kmenové buňky

Blok II.

Vladimír Rotrekl @ 2020

Biotechnologické procesy: Živočišné tkáňové kultury a kmenové buňky:

Sylabus

- 1) Úvod do živočišných buněk a jejich specifik, potence a diferenciacie, Hayflickuv limit, imortalizované linie, kultivace a jejich diferenciacie (včetně large scale, GMP a industry grade)
- 2) Použití živočišných buněk k výrobě léčiv, použití živočišných, potažmo kmenových buněk ve screeningu a výrobě léčiv
- 3) Živočišné buňky a buněčná terapie, kde končí transplantace a začíná biotechnologie, metody, příklady, požadavky SUKL/EMA na jejich výrobu a použití
- 4) Speciální aplikace a výhled do budoucna (3D kultivace, Organoidy, 3D tisk buněk, in vitro tvorba náhražek tkání a orgánů, genová)

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním
 2. Monoklonální protilátky
 3. Rekombinantní glykoproteiny
 4. Hormony a růstové faktory
 5. Enzymy
-
6. Testování léčiv
 7. Buněčná transplantace
 8. Tkáňové inženýrství
 9. Výroba organoidů a orgánů

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

Živé vakcíny	Oslabený mikrob/virus	spalničky, příušnice, zarděnky, žlutá zimnice
Inaktivované	Mrtvý mikrob/virus	cholera, žloutenka A, obrna, vzteklna
Podjednotková	Část mikroba/viru	žloutenka B, černý kašel, COVID-19(spike protein)
Konjugovaná	antigen konjugovaný s polysacharidy	chřipka
Toxoidová	inaktivovaný toxin	tetanus, záškrť
DNA/RNA	(transfekce) DNA/RNA do buněk organismu	DNA: zvířata (chřipka, herpes, HIV); RNA: CONV19
Rekombinantní	(transfekce) vektoru do tkáňové kultury	HIV, vzteklna, spalničky, chřipka – hemaglutinin v bakuloviru (FDA approved)

EXPERIMENTÁLNÍ

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

Živé vakcíny

Oslabený mikrob/virus

spalničky, příušnice, zarděnky, žlutá zimnice

Inaktivované

Mrtvý mikrob/virus

cholera, žloutenka A, obrna, vztekлина

Podjednotková

Část mikroba/viru

žloutenka B, černý kašel, COVID-19 (př. Astra Zeneca)

Konjugovaná

antigen konjugovaný s polysacharidy

chřipka

Toxoidová

inaktivovaný toxin

tetanus, záškrť

DNA/RNA

(transfekce) DNA/RNA do buněk organismu

DNA: zvířata (chřipka, herpes, HIV); RNA: CONV19

Rekombinantní

(transfekce) vektoru do tkáňové kultury

HIV, vztekлина, spalničky,
chřipka – hemaglutinin v bakuloviru (FDA approved)

V případě virů je třeba
hostitel k amplifikaci – často
tkáňová kultura

EXPERIMENTÁLNÍ

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

V případě virů je třeba hostitel k amplifikaci – často tkáňová kultura

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

- Živé vakcíny
- Inaktivované

Oslabený mikrob/virus

Mrtvý mikrob/virus

Inaktivace

Teplem

Chemicky (formaldehyd)

Ionizujícím zářením

Oslabení (genetické selekcí)

v jiném organizmu:

Živá zvířata

Oploďněná vejce

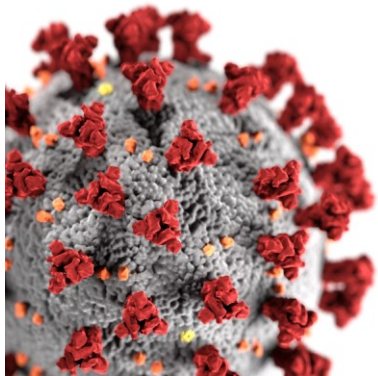
Tkáňové kultury (jiný druh)

Historicky nejrozšířenější, ale problematické

- Nebezpečné (hlavně imunokompromitovaným)
- Musíme mít kulturu/zvíře, kde se virus množí
- Musí jít bezpečně inaktivovat

Náhodné procesy

- mnohdy obtížně reprodukovatelné
- Poslední dobou kombinované s editací virového genomu



Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

Užití živočišné buněčné kultury při produkci vakcíny:

- Oslabení a selekce avirulentního kmene viru
- Amplifikace viru v susceptibilním buněčném typu

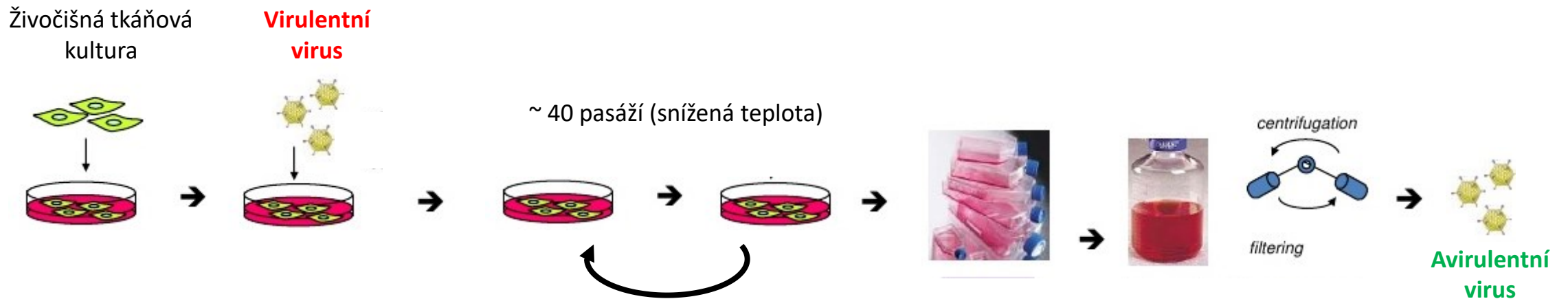
Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

Užití živočišné buněčné kultury při produkci vakcíny:

- Oslabení a selekce avirulentního kmene viru
 - ✓ ve zvířecích buňkách (ne lidských – jiný, suboptimální hostitel)
 - ✓ Alternativa k použití zvířat jako suboptimálního hostitele
 - ✓ Poslední dobou kombinováno s genetickou úpravou genomu viru



Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

Užití živočišné buněčné kultury při produkci vakcíny:

- Oslabení a selekce avirulentního kmene viru
 - ✓ ve zvířecích buňkách (ne lidských – jiný, suboptimální hostitel)
 - ✓ Alternativa k použití zvířat jako suboptimálního hostitele
 - ✓ Poslední dobou kombinováno s genetickou úpravou genomu viru

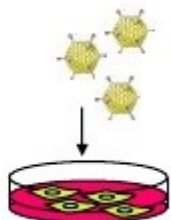
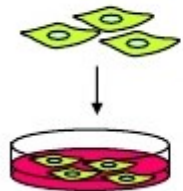
Kmen 17D ŽLUTÉ ZIMNICE byl oslaben pasážováním v myších a následně v kuřecích embryích

POLIOVIRUS obrny byl oslaben pasážováním v buněčné kultuře z opičích ledvin

VIRUS PŘÍUŠNIC v kultuře fibroblastů z kuřecího embrya

Živočišná tkáňová kultura

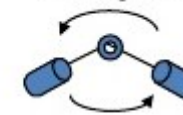
Virulentní virus



~ 40 pasáží (snížená teplota)



centrifugation



filtering



Avirulentní virus

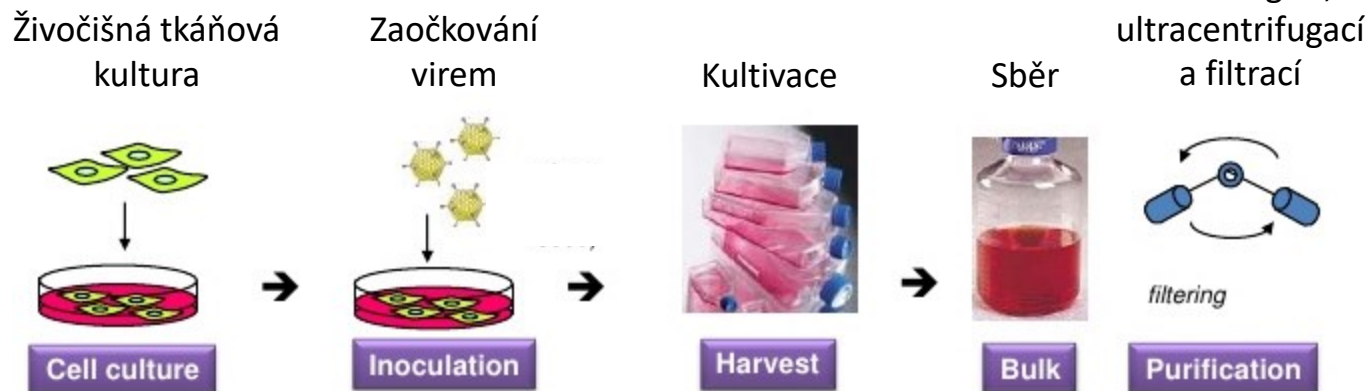
Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

Užití živočišné buněčné kultury při produkci vakcíny:

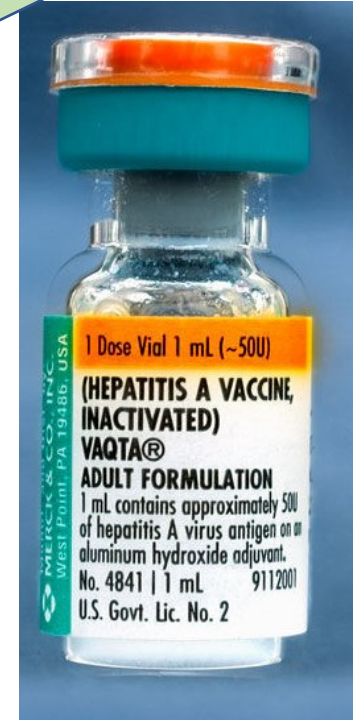
- Oslabení a selekce avirulentního kmene viru
- Amplifikace viru v susceptibilním buněčném typu (jednodušší škálování oproti užití např. slepičích vajec)



VAQTA:
vakcína proti hepatitidě A

VAQTA – kultivována na
buněčné kultuře
lidských MRC-5 buněk

MRC-5:
Primokultura fibroblastů z
(potráceného) 14 týdenního
kavkazského chlapce

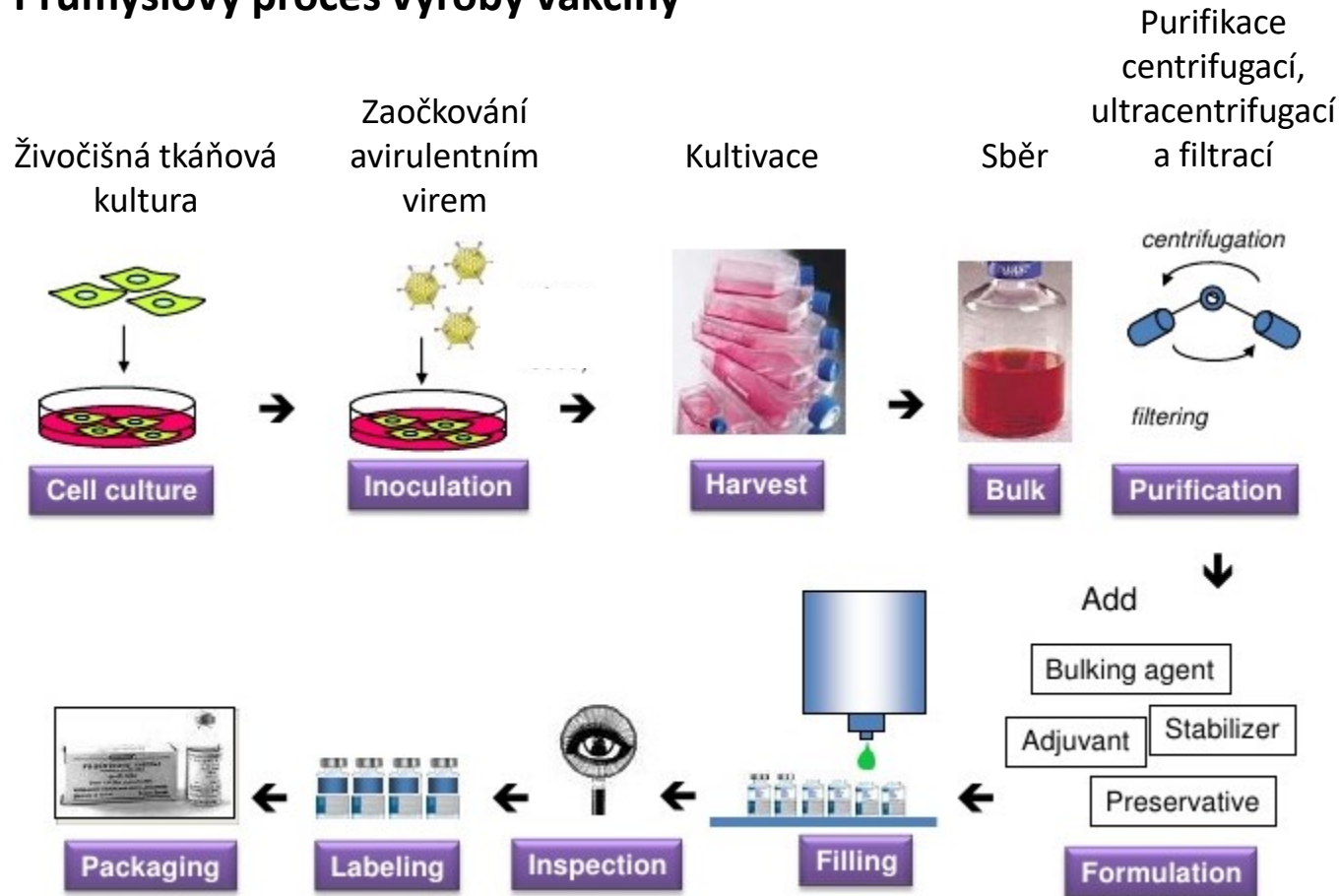


Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

Průmyslový proces výroby vakcíny



VAQT – kultivována na buněčné kultuře lidských MRC-5 buněk

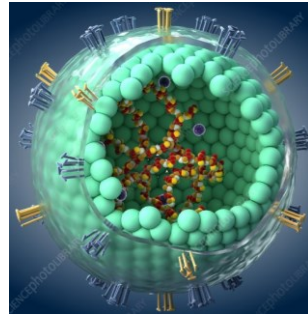


Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

K dispozici několik oslabených variant



Morbilivirus

Příklad (často) používaného Morbiliviru
– virus spalniček

Díky plasticitě viru spalniček můžeme do jeho genomu (RNA virus) naklonovat (povrchové) peptidy jiných virů. Při zachování pravidla šesti, lze virus silně modifikovat a použít jej jako nosič antigenu jiného viru a použít jej k vakcinaci proti jiným virovým onemocněním.

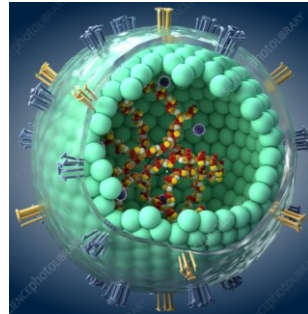
Pravidlo šesti: celkový počet nukleotidů v RNA genomu některých Paramyxovirů je dělitelný 6...

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

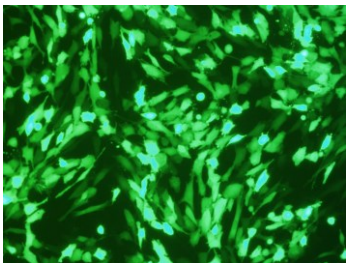
Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

K dispozici několik oslabených variant



Morbillivirus



Tkáňová kultura fibroblastů MRC-5

Linie odvozená z plicního epitelu 14 týdenního plodu (těhotenství ukončené ze zdravotních důvodů)

Příklad tvorby anti-CoNV19 vakcíny

DNA/RNA peptid
(směsi peptidů)
(např. CoNV19 6 peptidů)



Klonování do genomu oslabeného kmene
(například oslabený kmen morbilliviru - spalniček)



Amplifikace viru v susceptibilní tkáňové kultuře
(např. lidské fibroblasty MRC5)



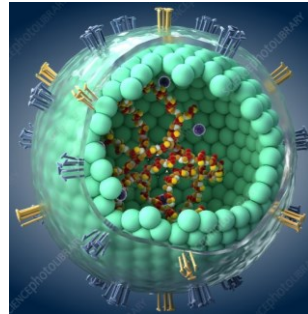
Izolát viru = vakcína (1.Fáze klinického testování)

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

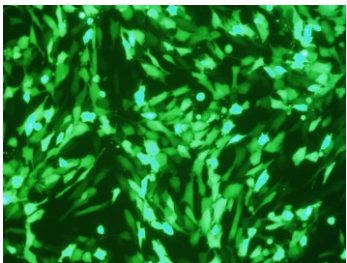
Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

K dispozici několik oslabených variant



Morbillivirus



Tkáňová kultura fibroblastů MRC-5

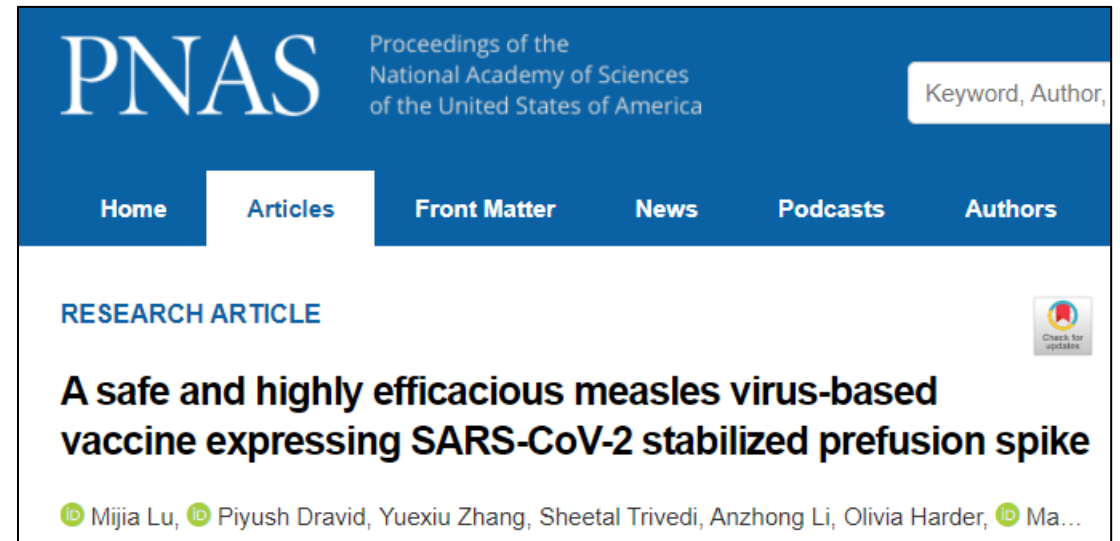
Linie odvozená z plicního epitelu 14 týdenního plodu (těhotenství ukončené ze zdravotních důvodů)

Příklad tvorby anti-CoNV19 vakcíny

DNA/RNA peptid
(směsi peptidů)
(např. CoNV19 6 peptidů)



Klonování do genomu oslabeného kmene
(například oslabený kmen morbilliviru - spalniček)



PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Keyword, Author,

Home Articles Front Matter News Podcasts Authors

RESEARCH ARTICLE

A safe and highly efficacious measles virus-based vaccine expressing SARS-CoV-2 stabilized prefusion spike

Check for updates

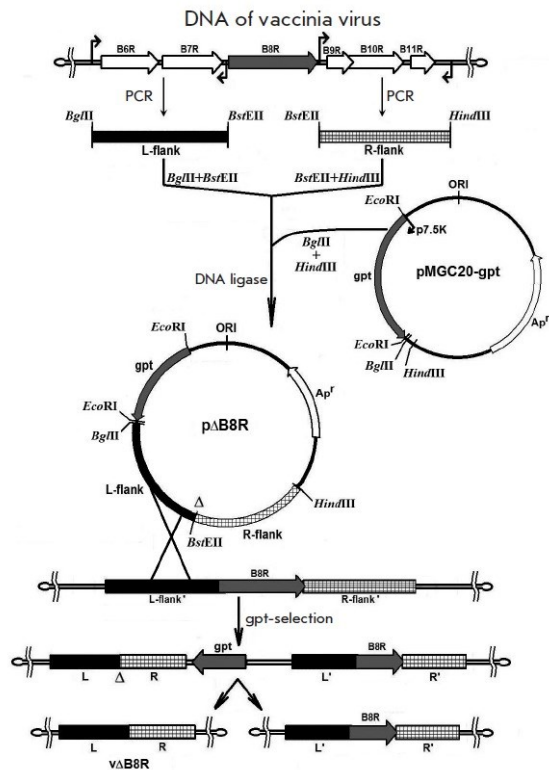
Mijia Lu, Piyush Dravid, Yuexiu Zhang, Sheetal Trivedi, Anzhong Li, Olivia Harder, Ma...

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

PŘÍKLAD:
rekombinantí inaktivovaný virus pravých neštovic

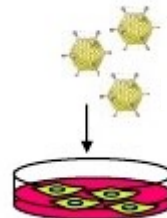
1. Vakcíny proti virovým onemocněním



Linie 4647 (fibroblasty)
Odvozené z ledvin
kočkodana - vervet monkey



infekce



48 hodin



- 1) Ultrazvuková dezintegrace
- 2) Centrifugace
- 3) 4 000g → Odstraní
Fragmenty buněk
- 4) 30 000g → Virus

Cílená mutageneza viru
(virus defektní ve virulentních genech
Ale množící se v tkáňové kultuře)

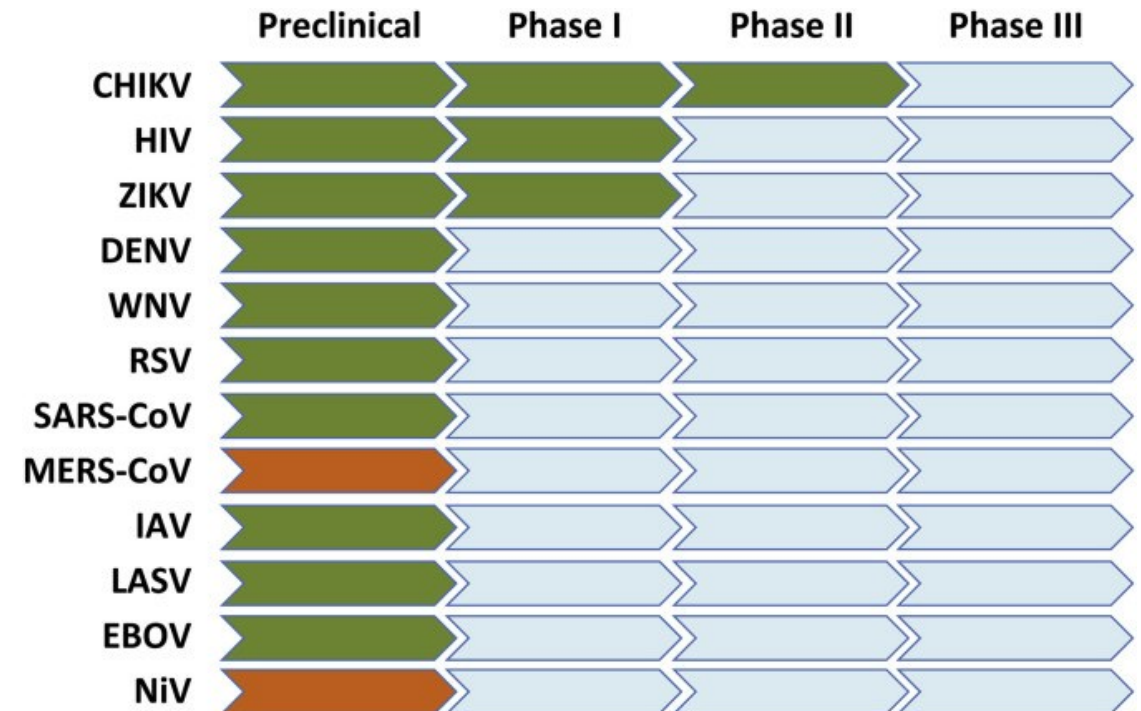
Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

Biotechnologie: využití živočišné tkáňové kultury k amplifikaci antigenu (oslabeného modifikovaného viru), určeného k imunizaci pacientů

Příklad vakcín odvozených od viru spalniček v klinickém testování (2020)



Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

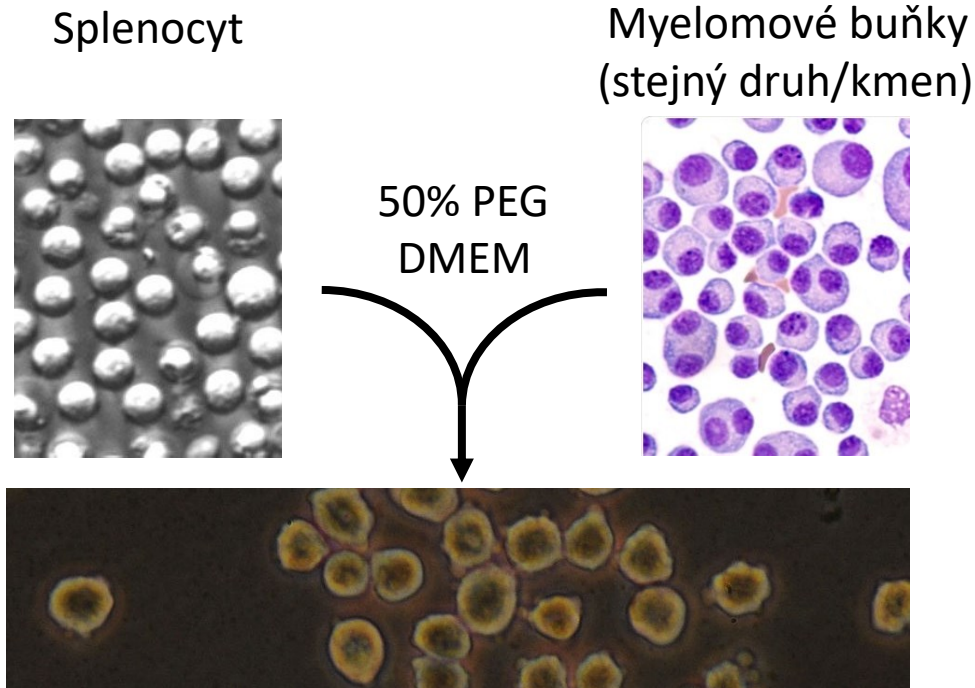
Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním
2. Monoklonální protilátky

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

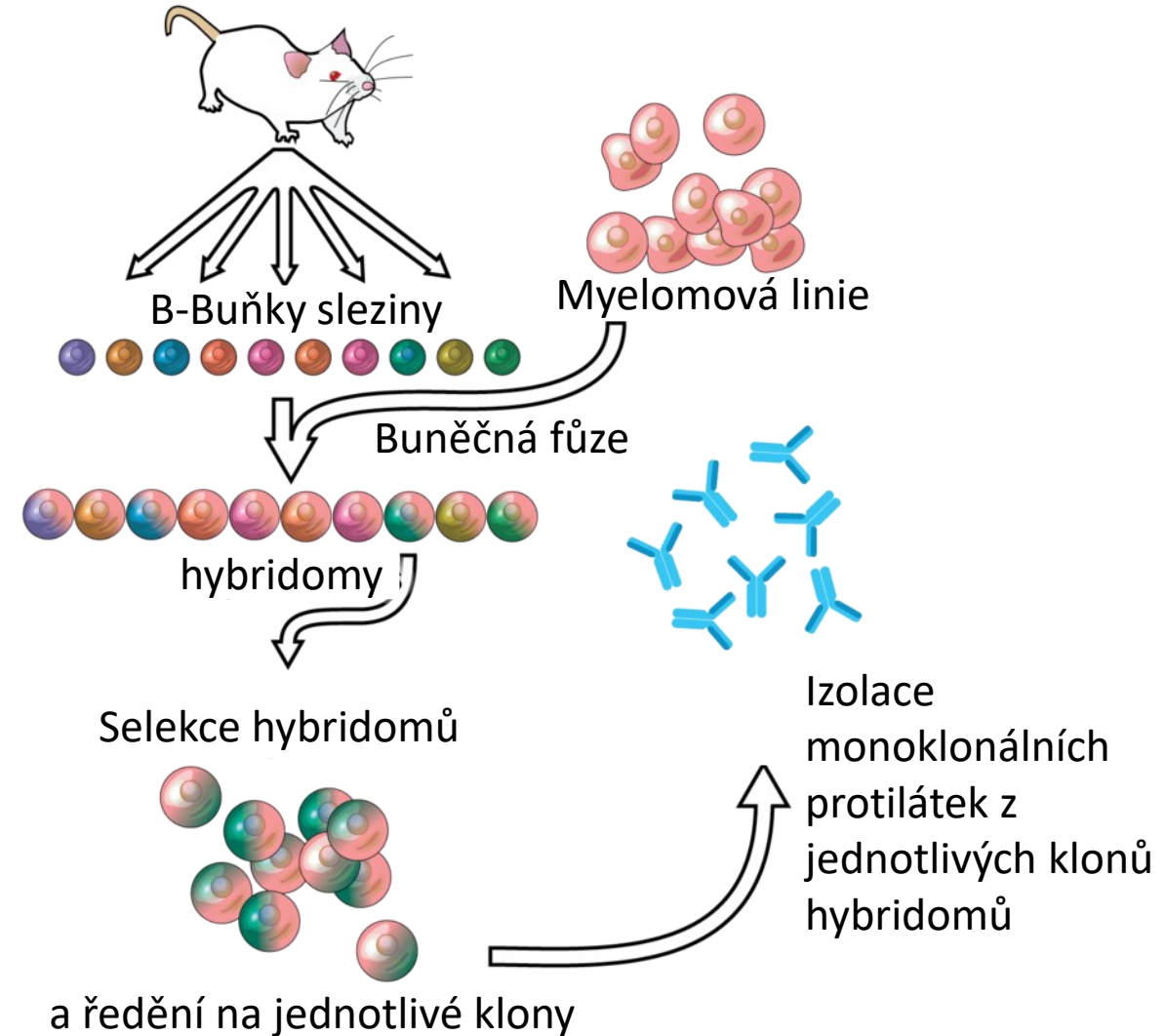
Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním
2. **Monoklonální protilátky**



Hybridomové buňky v tkáňové kultuře

Antigen (např. protein) injikován do krve (opakovaně)

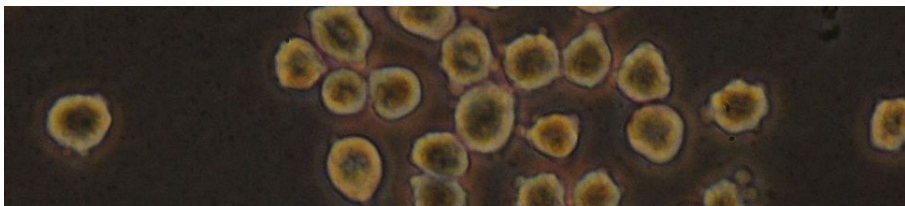
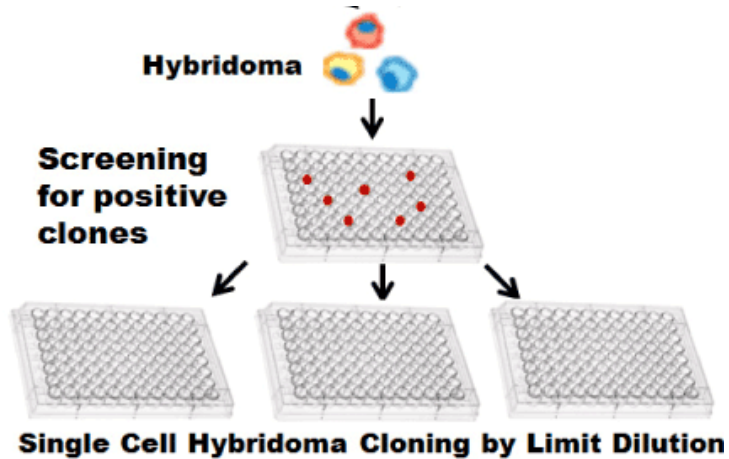


Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

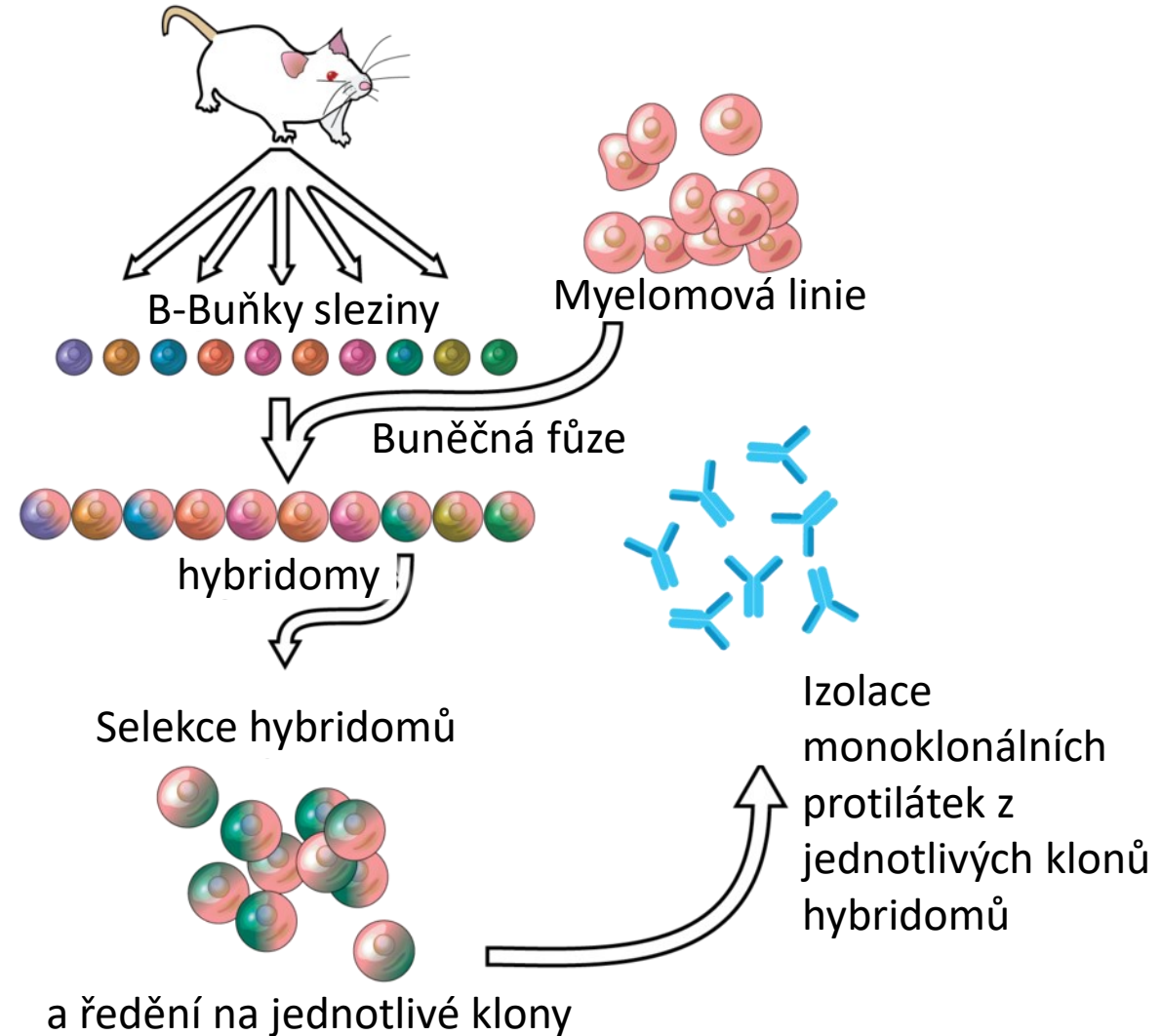
1. Vakcíny proti virovým onemocněním
2. **Monoklonální protilátky**

Selekce klonů hybridomů..



Hybridomové buňky v tkáňové kultuře

Antigen (např. protein) injikován do krve (opakovaně)



Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním

2. Monoklonální protilátky

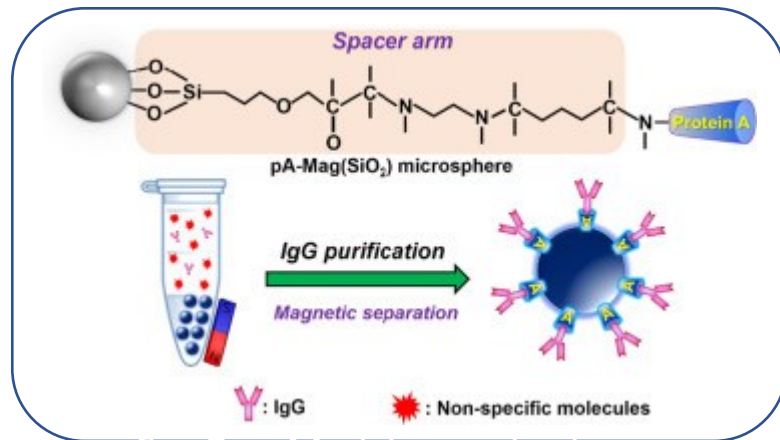
Příklady použití monoklonálních protilátek

Klinické aplikace monoklonálních protilátek

- protinádorová léčba (anti-TNF α , anti-VEGF)
- protijed bakteriálních toxinů (antrax)
- astma (anti-IgE)
- atd.

Laboratorní aplikace monoklonálních protilátek

- imunodetekce
(westernův přenos, imunohistochemické barvení atd.)
- imunoprecipitace
- blokování funkčních domén proteinů



Např. blokování vazebných domén Fibulinu 3 - extracelulární matrice (u glioblastomu)

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

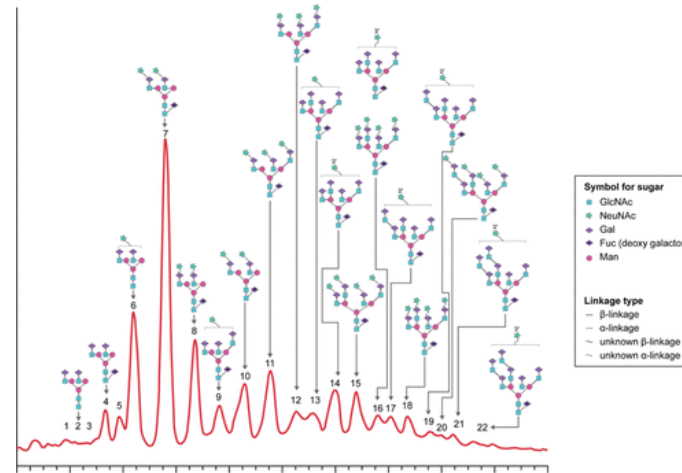
1. Vakcíny proti virovým onemocněním
2. Monoklonální protilátky
3. **Rekombinantní glykoproteiny**

Glykozylace záleží na:

- Organismu
- Buněčném typu
- Fyziologických podmínkách

Na glykozylaci záleží:

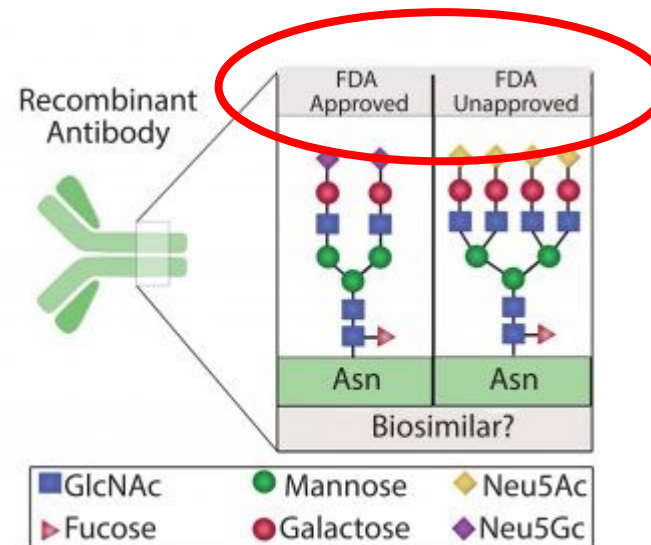
- Biologická aktivita
- Imunogenicita



Song a kol., X-Mol, 2020

Př.: Heterogenita N-glykozylace rekombinantního interferonu- γ

Interferon- γ : Léčba autoimunitních poruch, osteoporózy atd..



Fortin a kol., BioProcess Intl., 2018

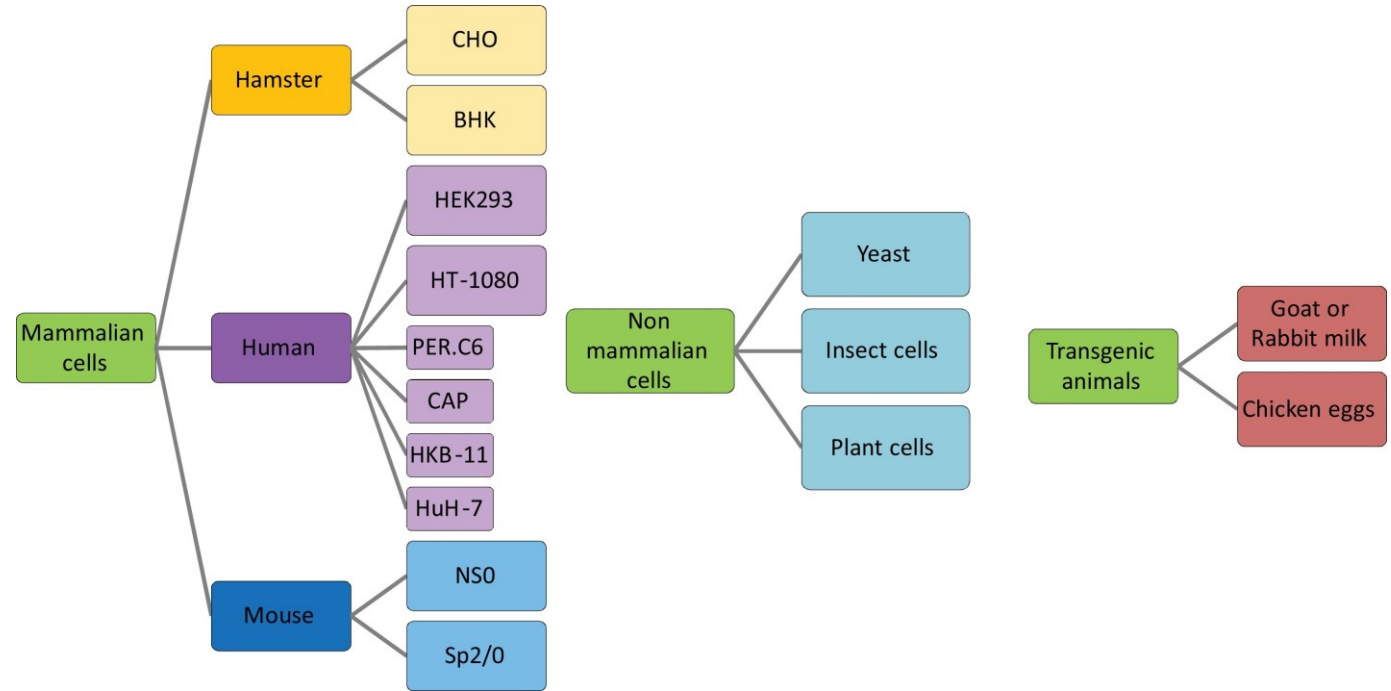
Bezpečnostní konsekvence rozdílné glykozilace

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním
2. Monoklonální protilátky
3. **Rekombinantní glykoproteiny**

Expresní systémy používané k produkci glykoproteinů



Někdy je možné využít „humanized yeast“ nebo hmyzí buněčné linie)

Příklad: Epoetin delta (DYNEPO®)

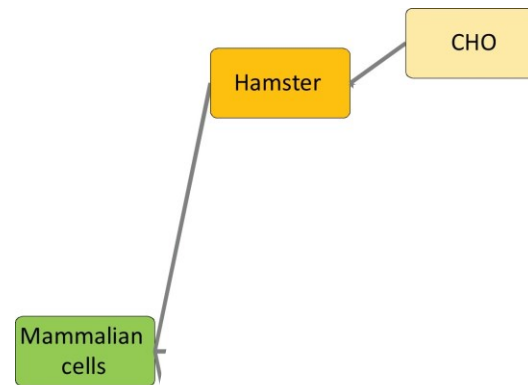
- Rekombinantní erythropoetin připravený v lidské tkáňové kultuře
- Vyšší míra homogenní glykosylace, než erythropoetin z buněk křečka (CHO - Chinese Hamster Ovary)
- Výsledek: Vyšší účinnost a obtížněji zjistitelný antidopingovým testem!!!

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním
2. Monoklonální protilátky
3. Rekombinantní glykoproteiny
4. Hormony a růstové faktory
5. Enzymy
6. Buněčná transplantace
7. Tkáňové inženýrství
8. Výroba organoidů a orgánů

Příklad produkce růstového hormonu v CHO buňkách



N-glykosilace prodlužuje
half-life v krvi...



Děti s nedostatečným růstem
Turnerův syndrom
Dsytrofičtí pacienti s AIDS

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

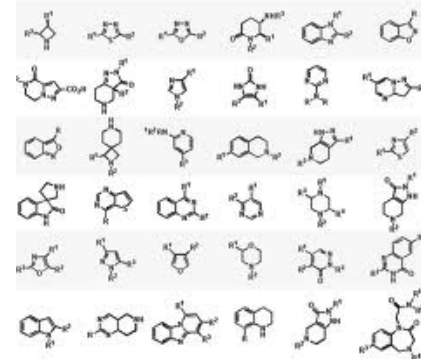
1. Vakcíny proti virovým onemocněním
2. Monoklonální protilátky
3. Rekombinantní glykoproteiny
4. Hormony a růstové faktory
5. Enzymy

6. Testování léčiv/Toxikologické studie

7. Buněčná transplantace
8. Tkáňové inženýrství
9. Výroba organoidů a orgánů

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur



Knihovny malých molekul ...

dostupné jako kolekce tisíců látek na mikrotitračních destičkách
umožňují rychlý skrining tisíců látek v reálném čase

• Nature-Inspired Chemistry:

[TimTec Natural Compound Library, NPL](#)
[TimTec Natural Derivatives Library, NDL](#)
[Flavonoid Derivatives](#)
[Plant Extracts](#)

• ActiTarg Series - Targeted libraries:

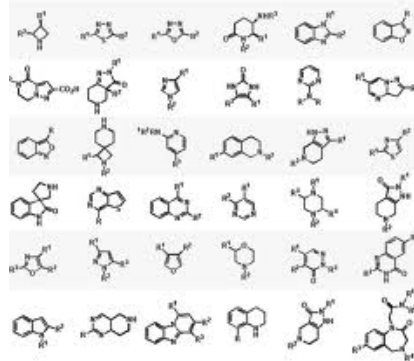
[ActiTarg-G \(GPCR Ligands\)](#)
[ActiTarg-K \(Kinase Modulators\)](#)
[ActiTarg-P \(Protease Inhibitors\)](#)
[ActiTarg-S \(Serpins Inhibitors\)](#)
[ActiTarg-I \(Potassium Channel Modulators\)](#)
[ActiTarg-N \(Nuclear Receptor Ligands\)](#)

• Template-Based - Groups with common heterocyclic lattices:

5-Membered Aromatic Heterocycles
5-Membered Fused Aromatic Heterocycles

Kinase	Lattice type
Contact us if you are interested in a chemical diversity selection of structures from the different kinase libraries assembled as 5, 10 and 20 plate sets	
Tyrosine / CDK	Various
CDK	Adenines
p38 MAP	4,5-Diarylimidazoles
Raf	Diarylureas
CDK	Flavones
CDK	Isoflavones
CDK	2-Aminothiazoles
Ser/Thr	NaphthBONH
CDK / PASS* >0.50	CDK isoxazolidinine subset CDK aminothiazole subset
Tyrosine / PASS >0.50	Various
p38MAP / PASS >0.50	Various

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk



Aplikace živočišných tkáňových kultur

Knihovny malých molekul ...

dostupné jako kolekce tisíců látek na mikrotitračních destičkách umožňují rychlý skrining tisíců látek v reálném čase

• Nature-Inspired Chemistry:

- TimTec Natural Compound Library, NPL
- TimTec Natural Derivatives Library, NDL
- Flavonoid Derivatives
- Plant Extracts

• ActiTarg Series - Targeted libraries:

- ActiTarg-G (GPCR Ligan
- ActiTarg-K (Kinase Modu
- ActiTarg-P (Protease Inh
- ActiTarg-S (Serpins Inhil
- ActiTarg-I (Potassium C
- ActiTarg-N (Nuclear Rec

Kinase	Lattice type
Contact us if you are interested in a chemical diversity selection of structures from the different kinase libraries assembled as 5, 10 and 20 plate sets	
Tyrosine / CDK	Various

Známe tisíce chorob....

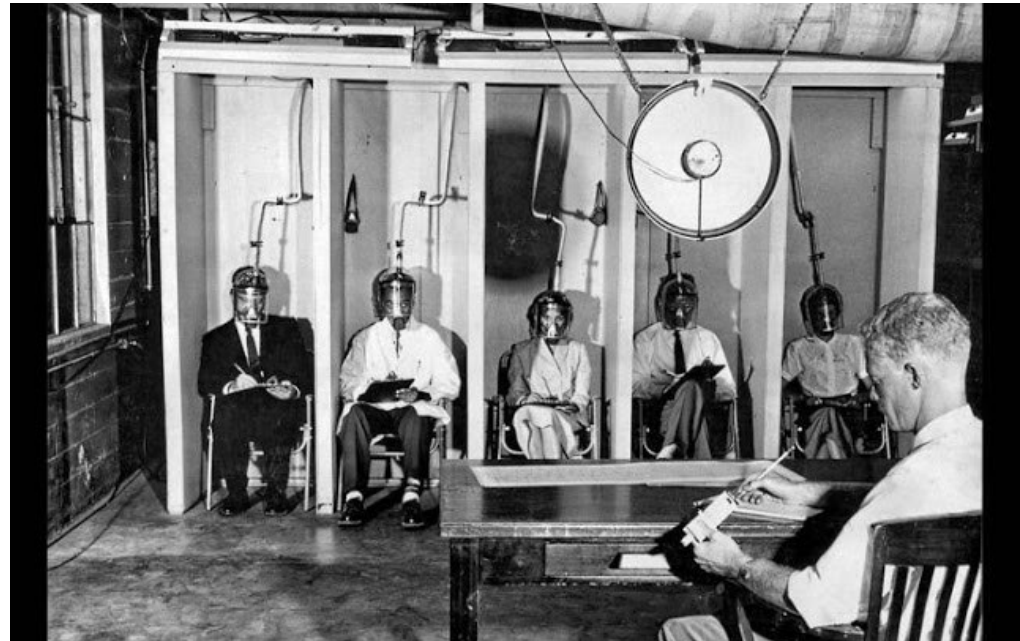
...a máme k dispozici stovky tisíc chemických sloučenin...

• Template-Based - Groups with common heterocyclic lattices:

- 5-Membered Aromatic Heterocycles
- 5-Membered Fused Aromatic Heterocycles

Ser/Thr	NaphthBONH
CDK / PASS* >0.50	CDK isoxazolidinine subset CDK aminothiazole subset
Tyrosine / PASS >0.50	Various
p38MAP / PASS >0.50	Various

Jak ale testovat účinky tak velkého množství látek?



Testování účinků smogu (1956)



Jak ale testovat účinky tak velkého množství látek?

... když jen jedna látka – atropin – stála život nejen polovinu vojska Marka Antonia

... než jsme se ji naučili používat



Potřebujeme model...



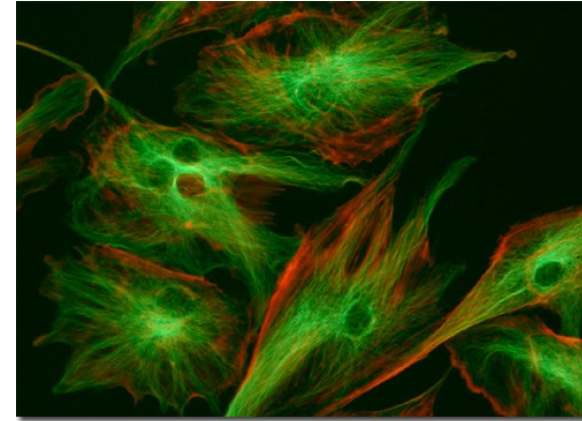
Potřebujeme model...



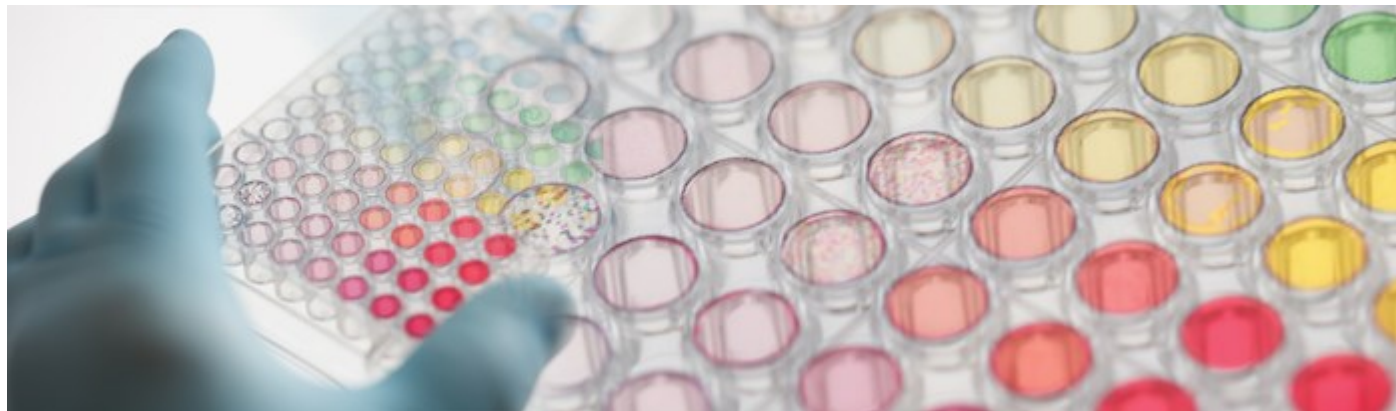
Nevýhody zvířecích modelů:

- Mnohdy chybí relevance k lidským chorobám
- Není možné testovat rozsáhlé knihovny sloučenin

Potřebujeme model...



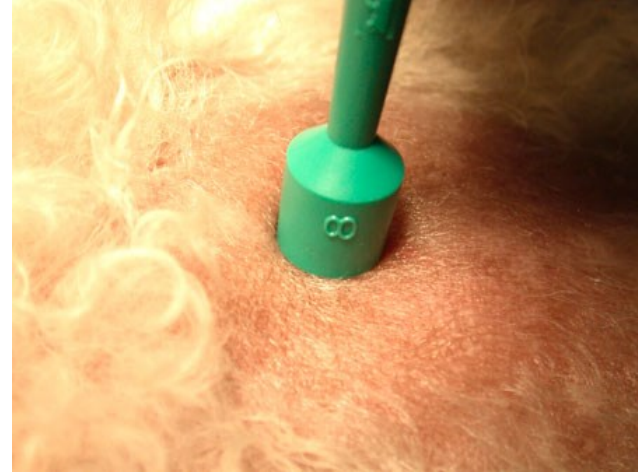
... buněčný model!



... buněčné modely:

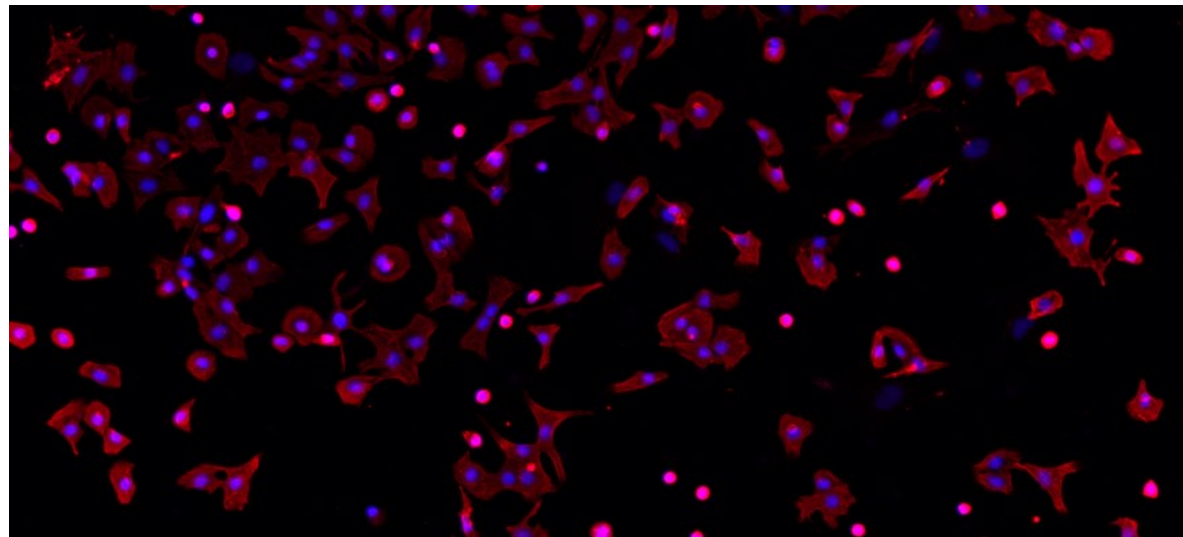
Primokultury (primární tkáňové kultury)

- Nedostatečné množství z biopsií
- Omezené množství buněčných typů lze kultivovat *in vitro*
- Délka kultivace je omezena



... buněčné modely:

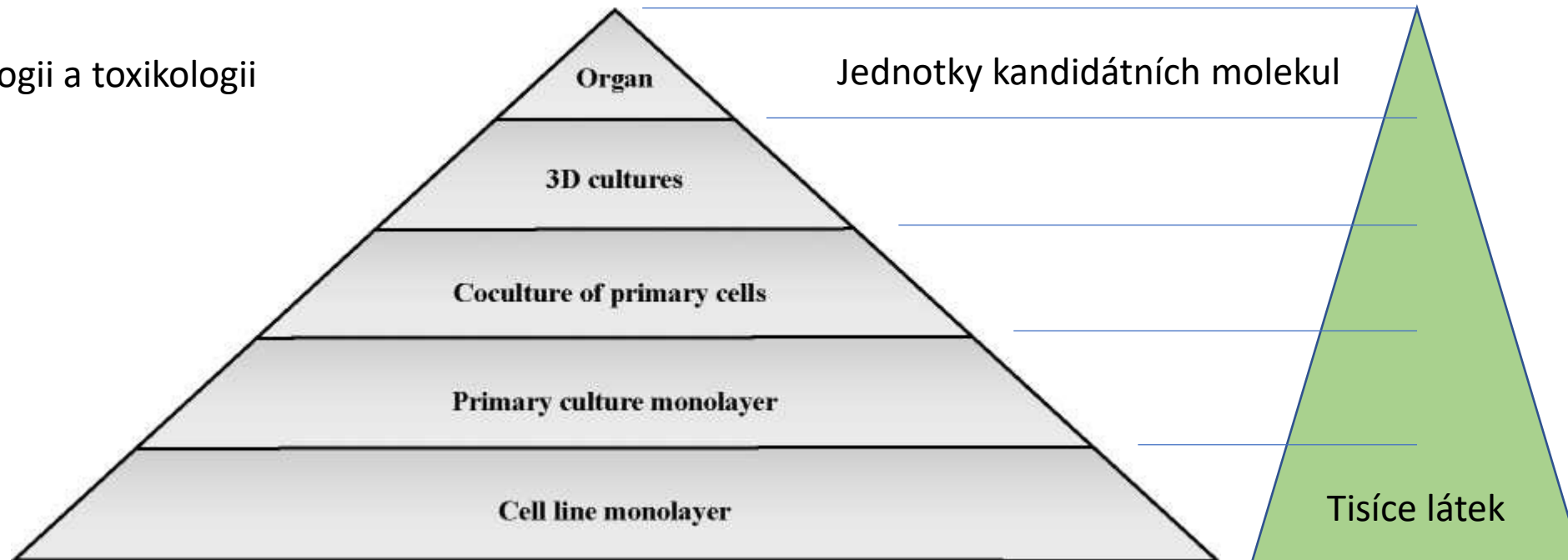
- Rakovinné linie
- Kmenové buňky a odvozené buněčné typy..



... buněčné modely:

- Rakovinné linie
- Kmenové buňky a odvozené buněčné typy..

Použití ve farmakologii a toxikologii



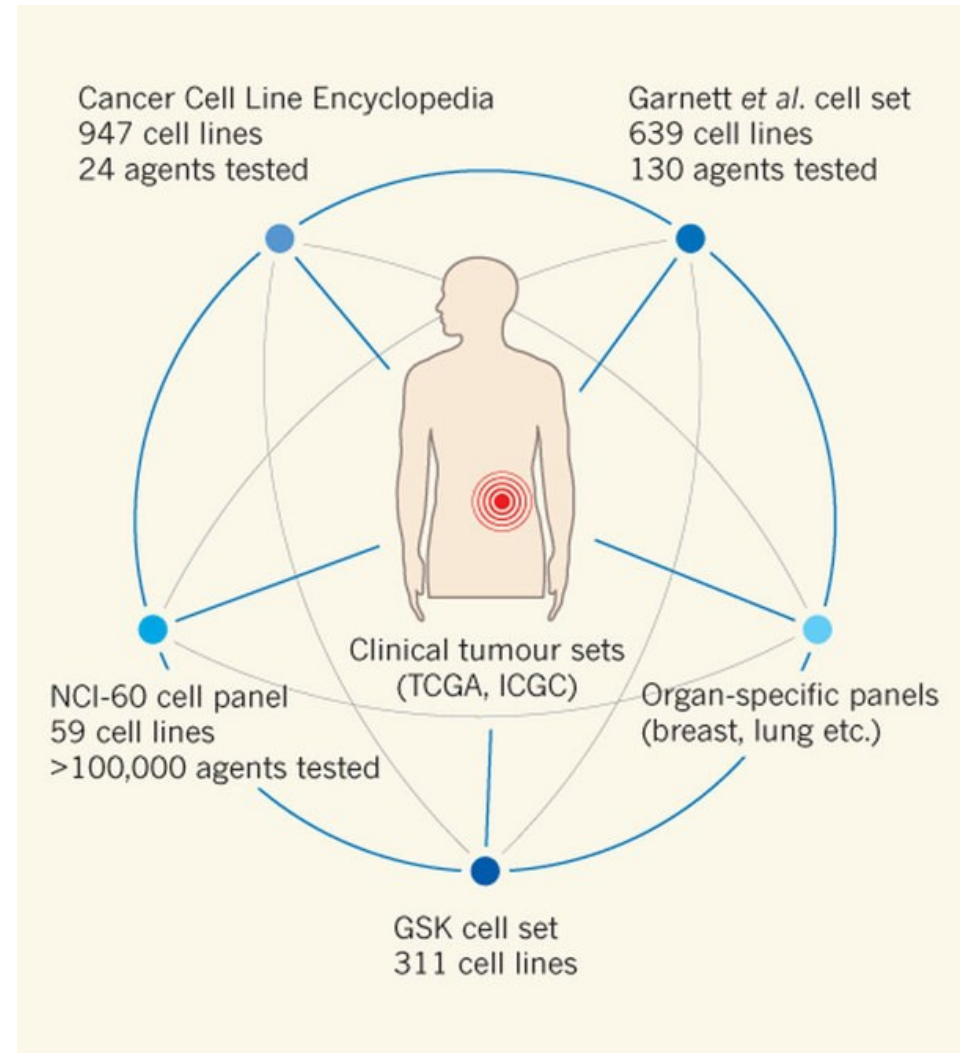
... buněčné modely: rakovinné linie

Výhody:

Onemocnění na buněčné úrovni
Immortalizované linie

Nevýhody:

Velká diverzita v mechanismu
onemocnění
Genomová nestabilita a s tím
spojená nestálost modelu



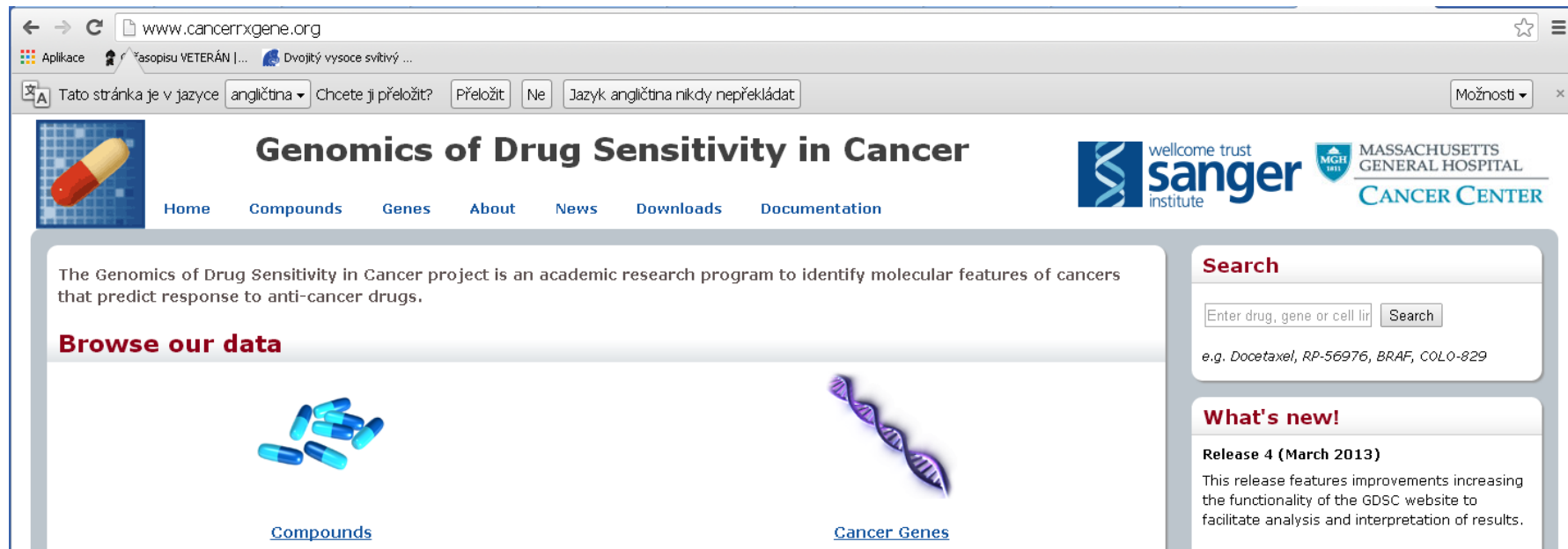
Projekt „Genomics of Drug Sensitivity in cancer“

Celkem vzorků doposud 1010 (z toho 1010 celých genomů)

Analyzovaných genů 23699

Identifikovaných mutací 1141626

Z toho jedinečných variant 1021175



The screenshot shows the website www.cancerrxgene.org. The page features a navigation menu with links for Home, Compounds, Genes, About, News, Downloads, and Documentation. The main content area includes a search bar, a "Browse our data" section with links to "Compounds" and "Cancer Genes", and a "What's new!" section highlighting "Release 4 (March 2013)". The website is supported by the Wellcome Trust Sanger Institute and the Massachusetts General Hospital Cancer Center.

Genomics of Drug Sensitivity in Cancer

Home Compounds Genes About News Downloads Documentation

The Genomics of Drug Sensitivity in Cancer project is an academic research program to identify molecular features of cancers that predict response to anti-cancer drugs.

Browse our data

[Compounds](#) [Cancer Genes](#)

Search

Enter drug, gene or cell line

e.g. Docetaxel, RP-56976, BRAF, COLO-829

What's new!

Release 4 (March 2013)

This release features improvements increasing the functionality of the GDSC website to facilitate analysis and interpretation of results.

Projekt „Genomics of Drug Sensitivity in cancer“

Celkem vzorků doposud 1010 (z toho 1010 celých genomů)
Analyzovaných genů 23699
Identifikovaných mutací 1141626
Z toho jedinečných variant 1021175

Pokud známe mutaci, můžeme přiřadit mechanismus konkrétní účinné látky

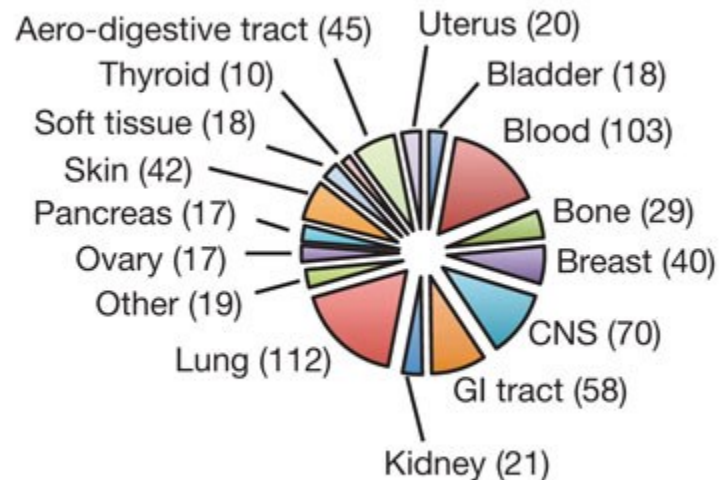
2024: POKRYTO 621 SLOUČENIN NA 1000 BUNĚČNÝCH LINIÍ CÍLÍCÍCH 24 DRAH

Projekt „Genomics of Drug Sensitivity in cancer“

Identifikace nových cílových molekul protinádorové terapie..

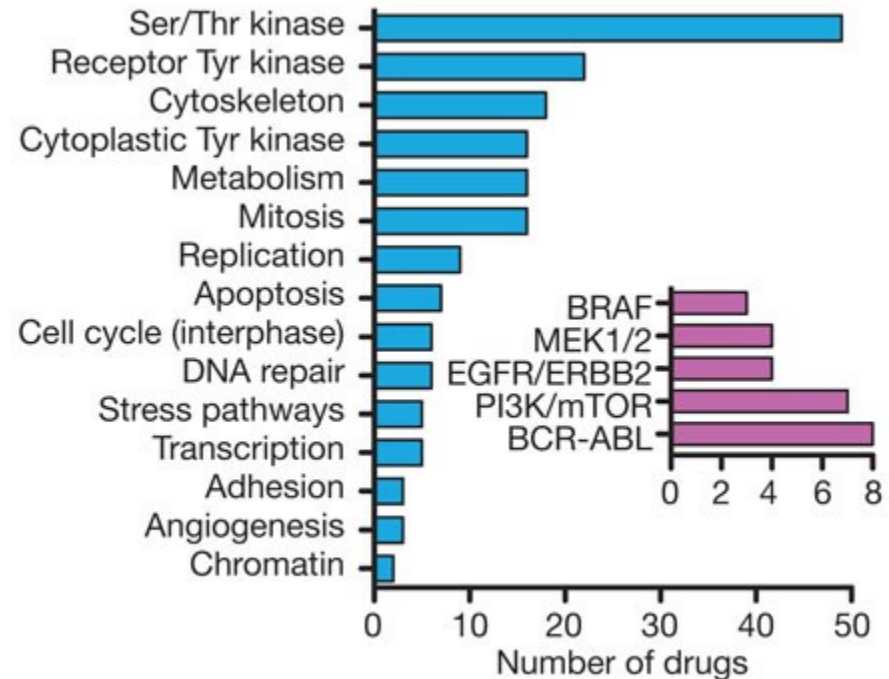
Několik set rakovinných linií

a



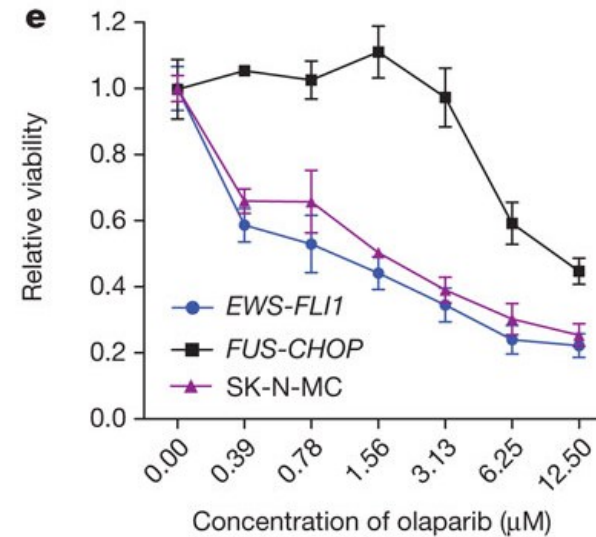
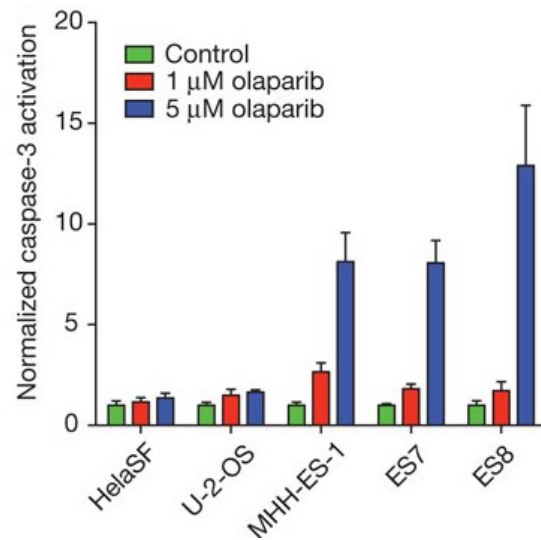
130 látek v klinickém a preklinickém testování

b



Projekt „Genomics of Drug Sensitivity in cancer“

Identifikace nových cílových molekul protinádorové terapie..



Identifikován biomarker typický pro Ewingův sarkom rezpozivní na inhibitory PARP

Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

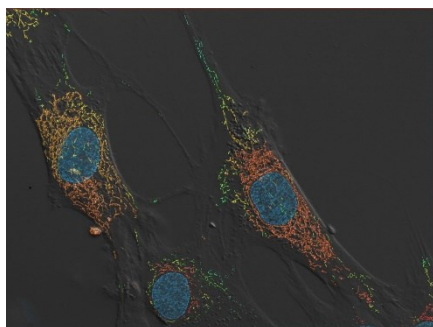
Embryonální kmenové buňky

- + konzistentní genetické pozadí
- + "čistota" genetické manipulace
- nutnost použití řízené manipulace genomu
- absence polygenních faktorů

Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

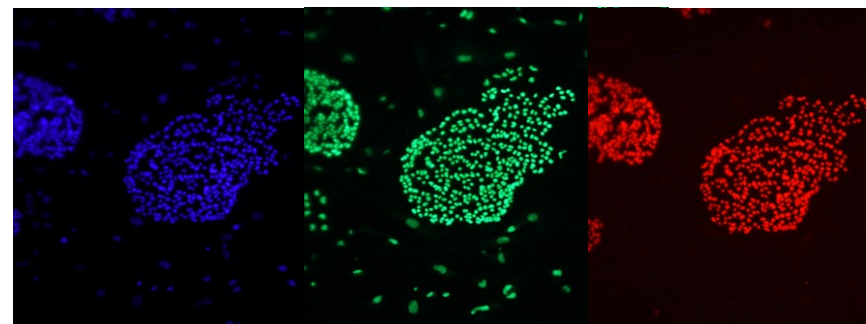


diferencovaná buňka

epigenetický reset
Yamanakovým „koktejlem“



Oct4
Sox2
Klf4
C-Myc

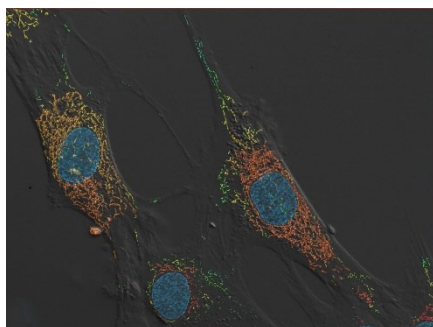


Pluripotentní buňka

Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

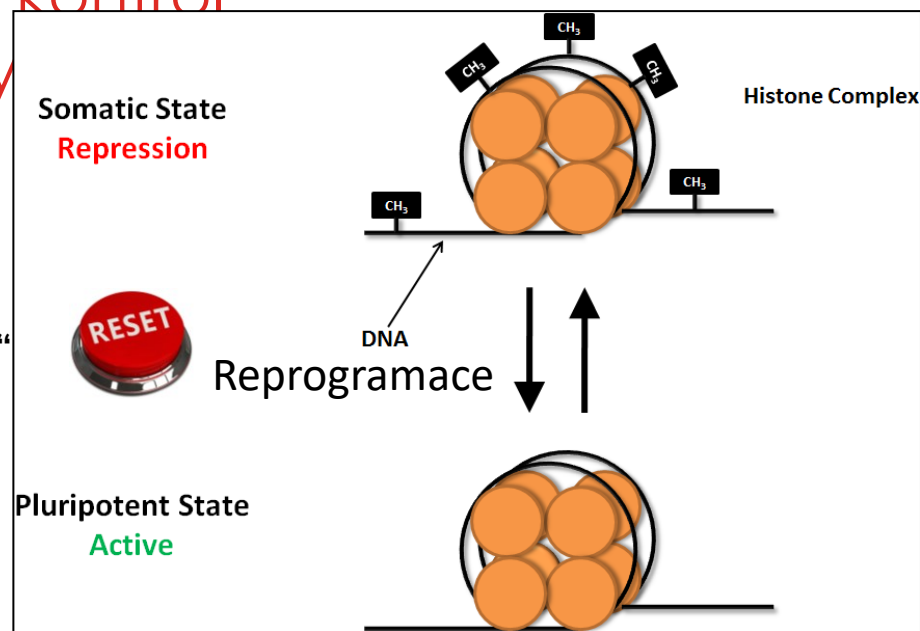
- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý poly



diferencovaná buňka

epigenetický reset
Yamanakovým „koktejlem“

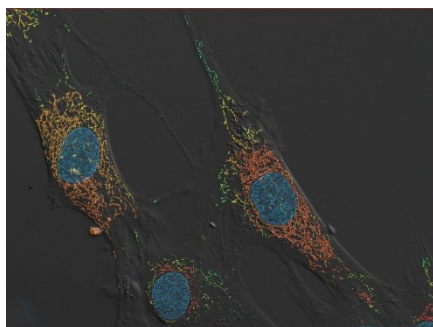
Oct4
Sox2
Klf4
C-Myc



Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

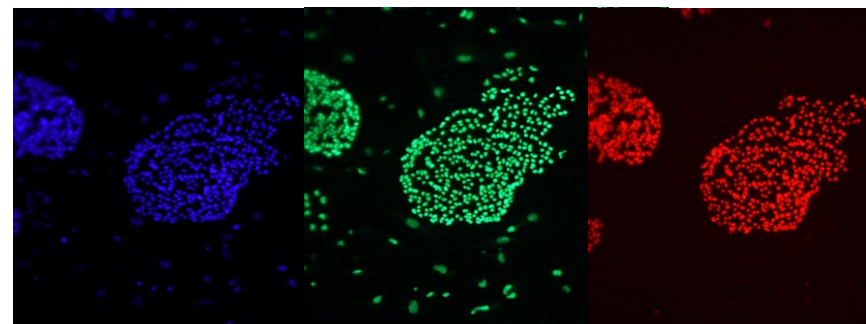


diferencovaná buňka

epigenetický reset
Yamanakovým „koktejlem“

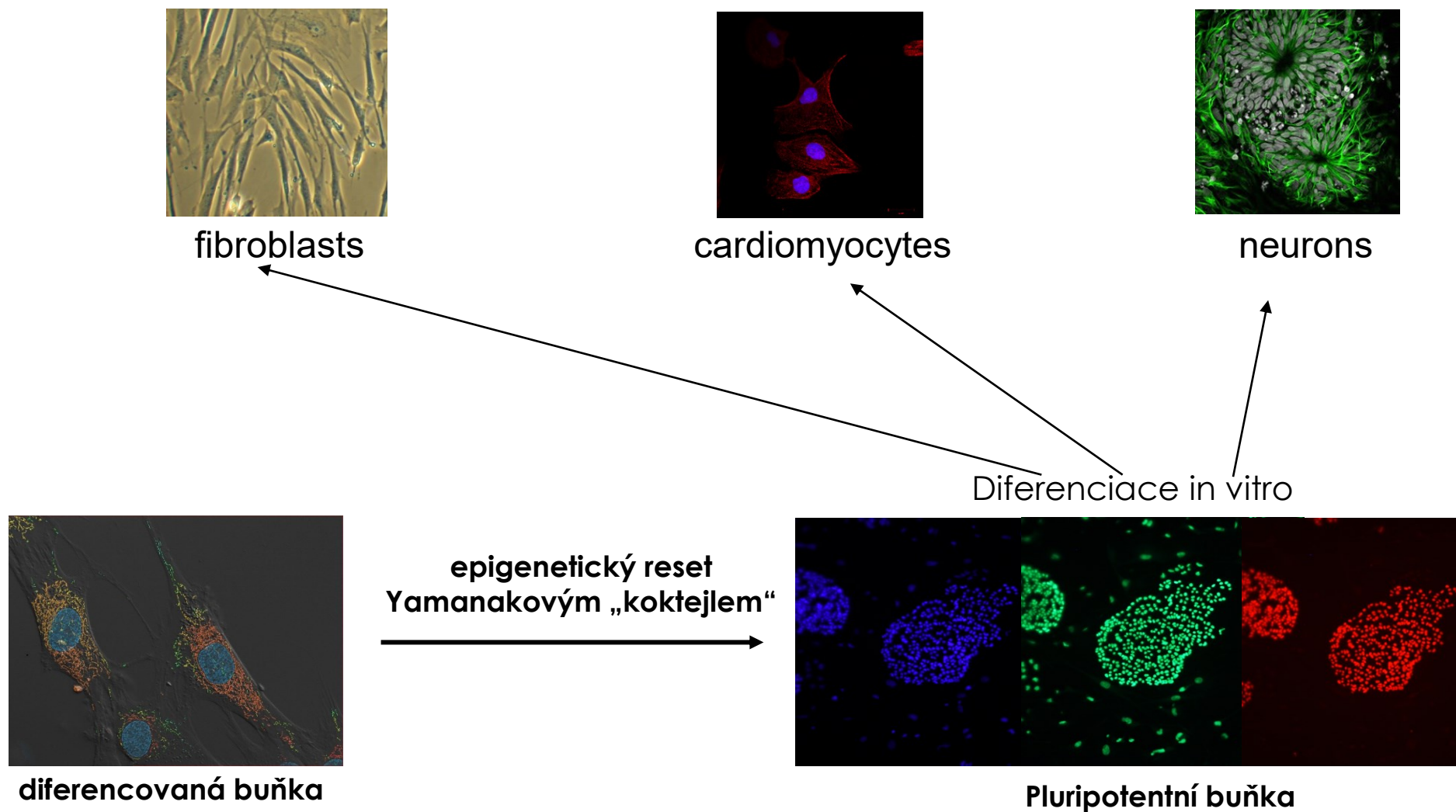


Oct4
Sox2
Klf4
C-Myc



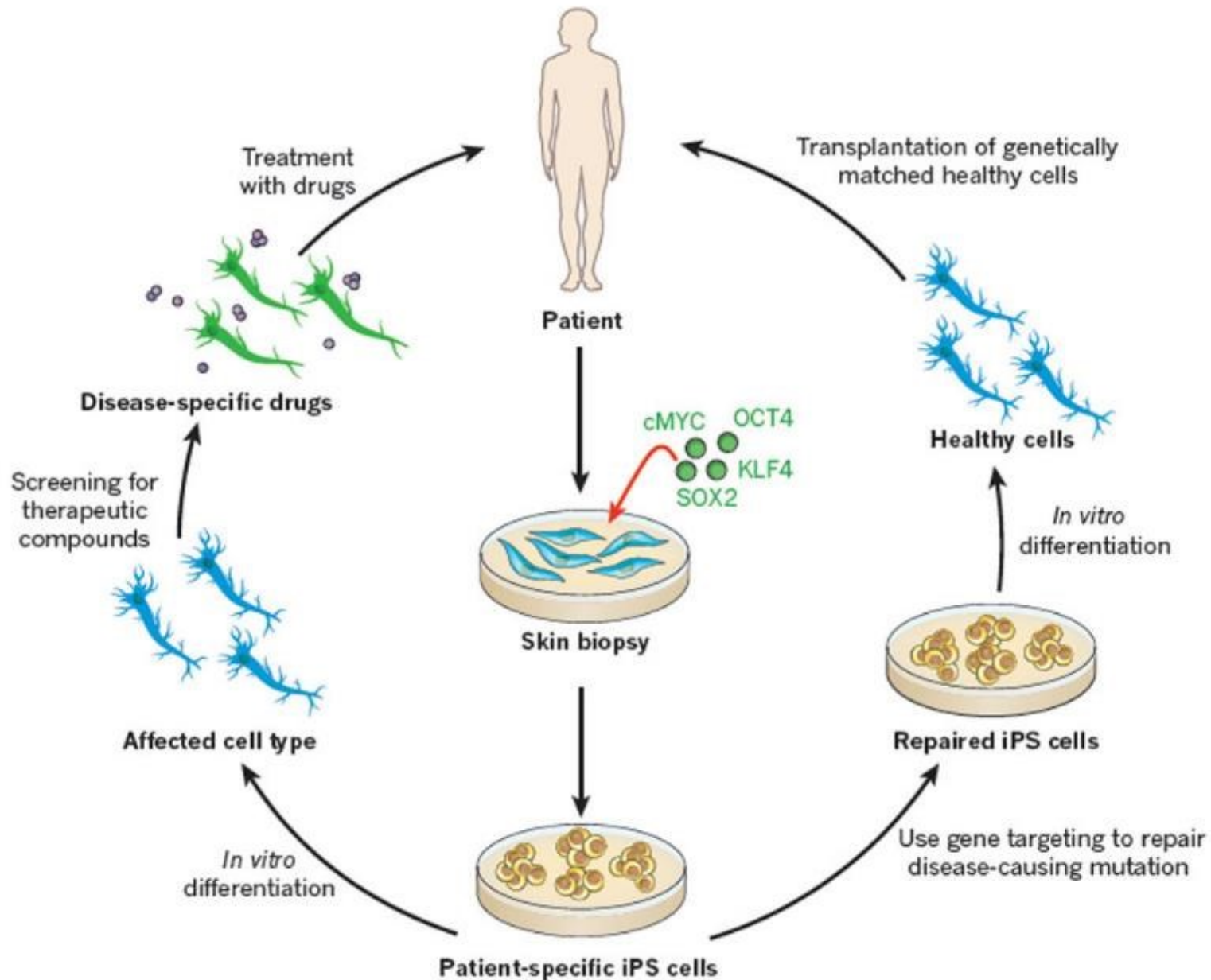
Pluripotentní buňka

Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky



Indukované pluripotentní kmenové buňky

mají obrovský potenciál pro medicínu - tzv. patient-specific cells

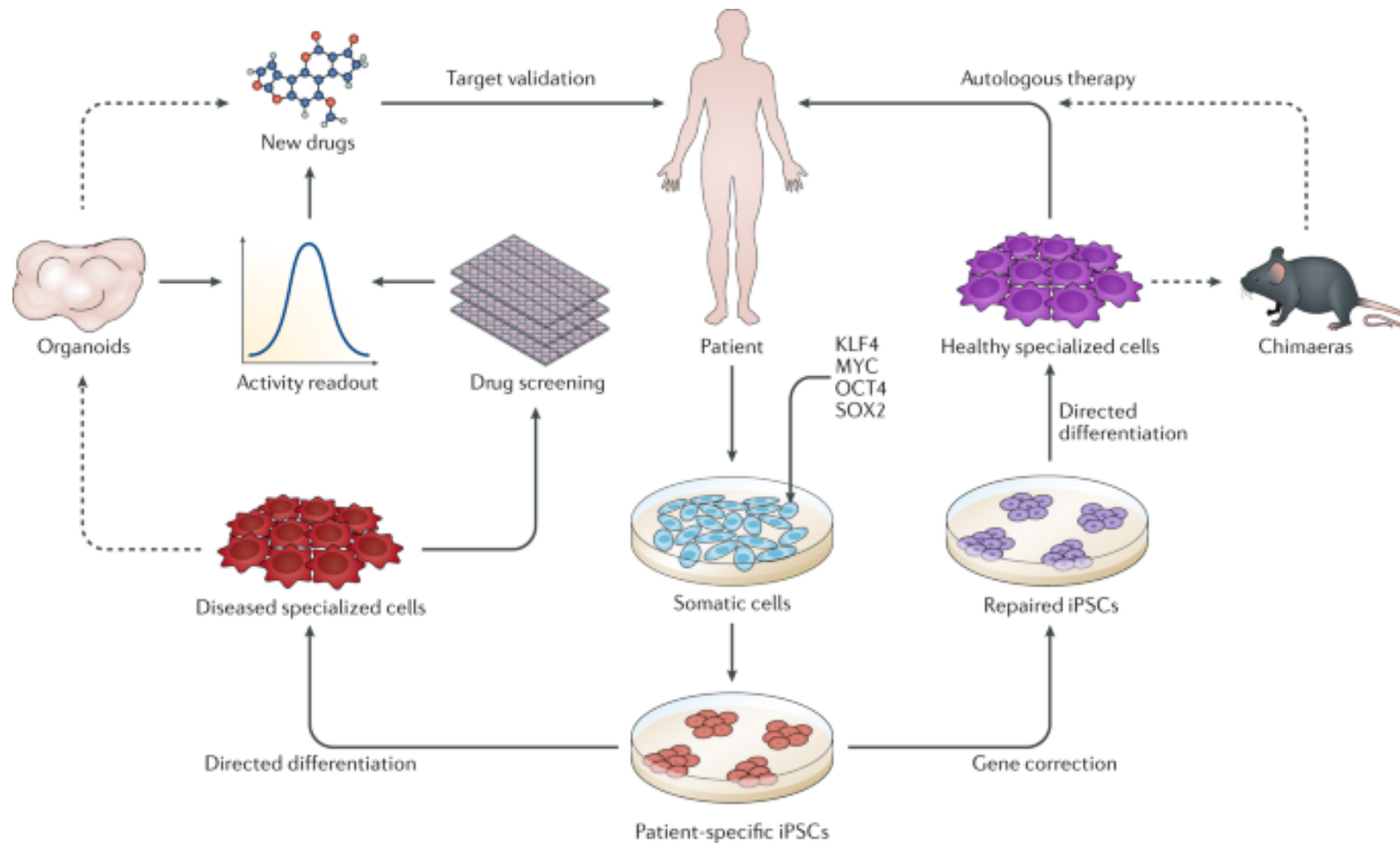


Využití tkáňových kultur odvozených diferenciací kmenových buněk:

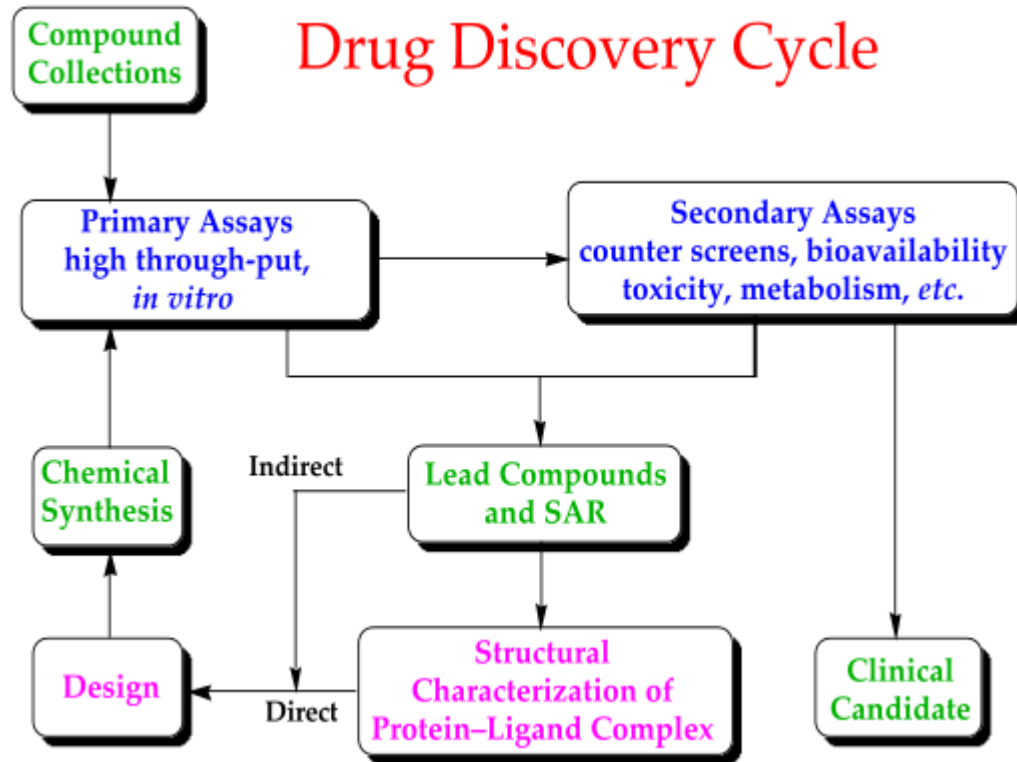
- Poznání mechanismů patologie v daném buněčném typu
- Screening možných léčiv na cílovém buněčném typu
- Buněčná transplantační medicína

Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky

- Skrínování léčiv



Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky



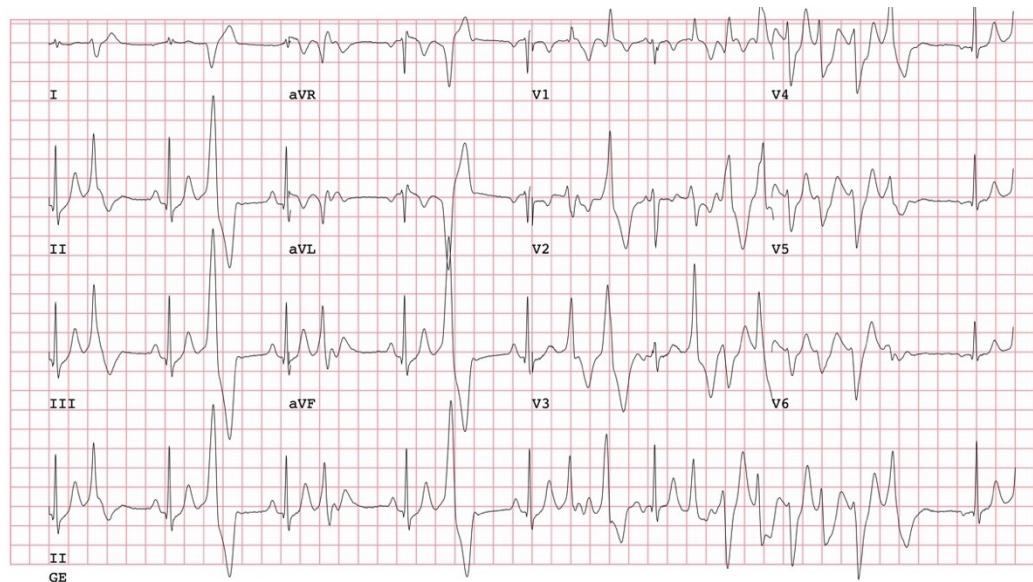
- **Skrínování léčiv**

- Robustní a rychlá skrínigová metoda k výběru „lead compound“
- Až klinický kandidát („target compound“) může být skrínován na primokultuře/organoidech/zvířatech...

Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky

Katecholinergní polymorfní ventrikulární tachykardie (CPVT)

Syndrom náhlé srdeční smrti (často u „zdravých sportovců“)



Elektrokardiogram pacientky s CPVT (40 let)

- Incidence: neznámá/odhad 1:10 000
- obtížně získatelná skupina pacientů
- Nemožný zisk biopsií
- Omezené možnosti diagnostiky
- Omezené možnosti post mortem analýzy

Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky

Katecholinergní polymorfni ventrikulární tachykardie (CPVT)

Syndrom náhlé srdeční smrti (často u „zdravých sportovců“)



Mutace RyR:
destabilizace
pomalý únik Ca^{2+}



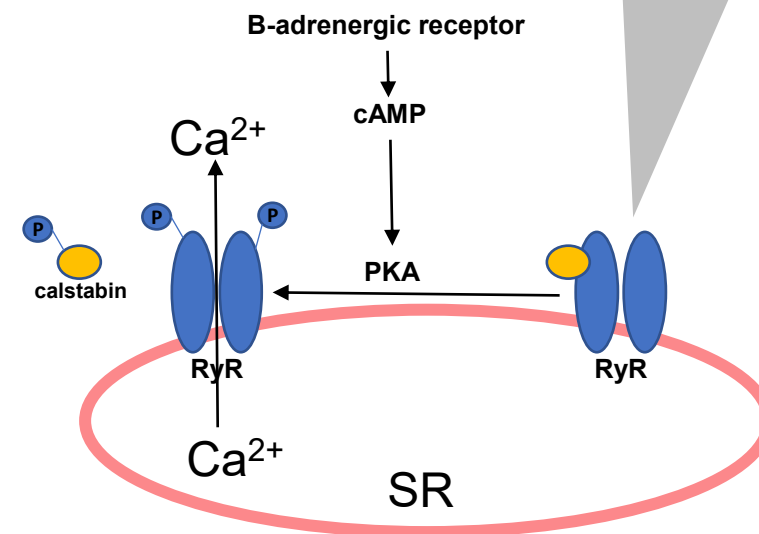
hiPSC



Srdeční buňky

- Předpoklad:
- nestabilní vazba RyR a calstabinu
- Únik kalcia ze sarkoplazmatického retikula
- Pomohly by stabilizátory RyR?

Chceme je testovat na srdečních buňkách!!!



Clinical candidate – S107 (Rycals)

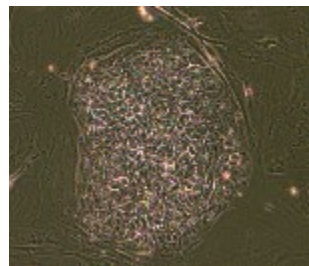
Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky

Katecholinergní polymorfní ventrikulární tachykardie (CPVT)

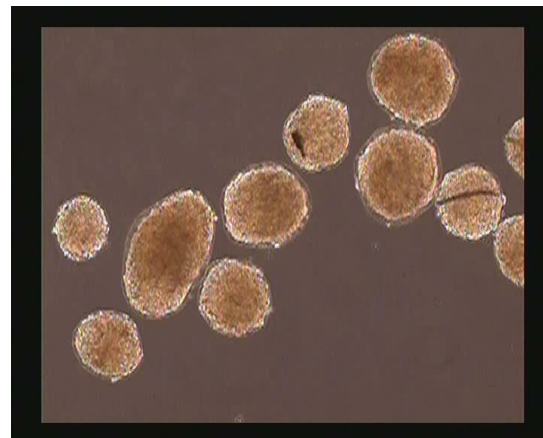
... aneb jak dostat srdeční buňky z pacienta, který nám je dát nemůže..



Biopsie kožních buněk

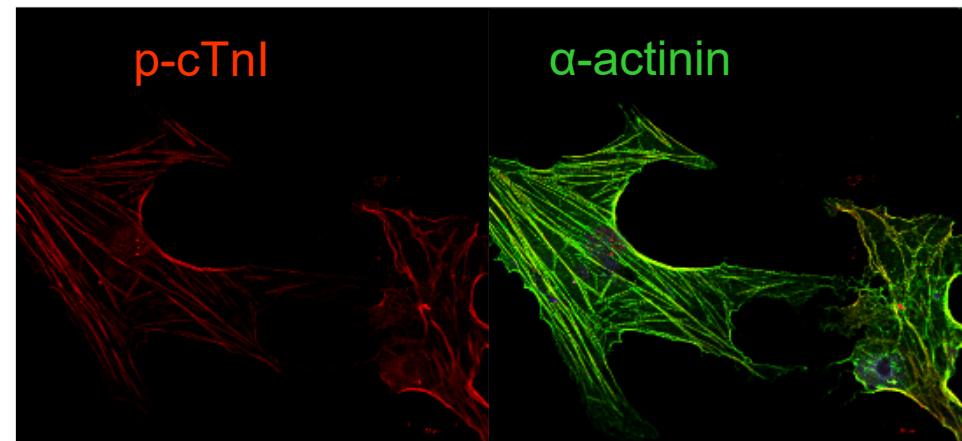


Indukované pluripotentní buňky



Embryonální tělíska

Model lidského srdce na kulturační misce



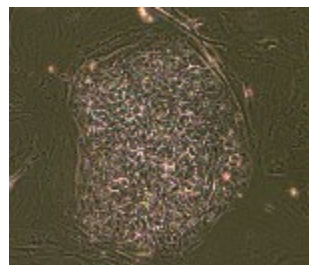
Srdeční buňky

Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky

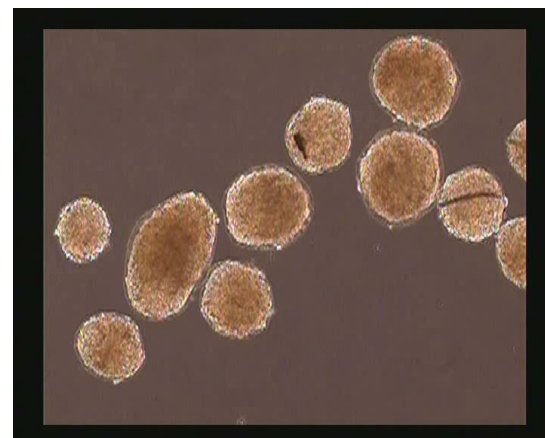
Katecholinergní polymorfní ventrikulární tachykardie (CPVT)



Biopsie kožních buněk

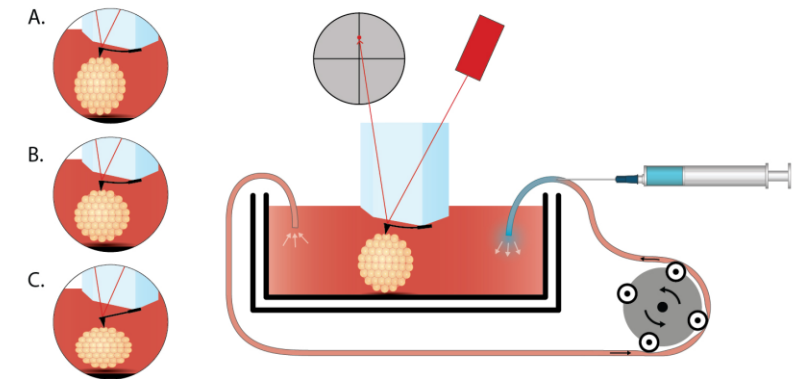


Indukované pluripotentní buňky

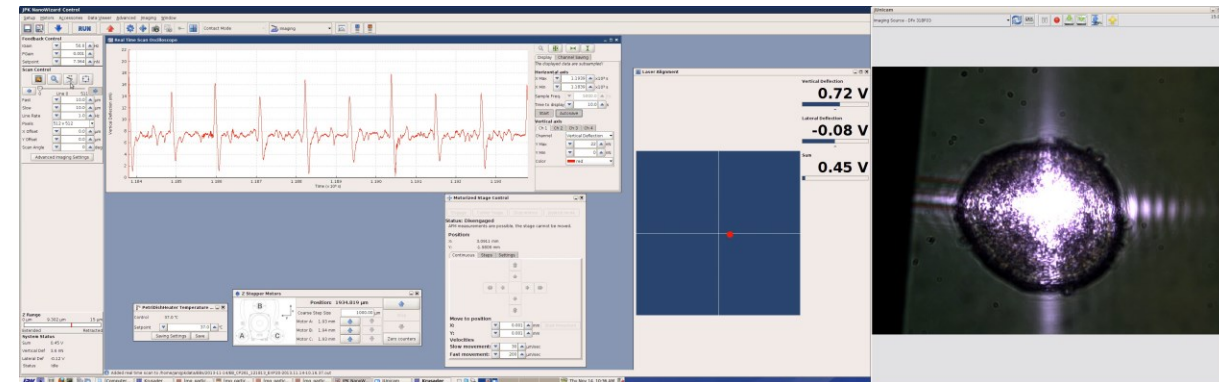


Embryonální tělíska

Biosenzor s 3D tkáňovou kulturou



Analýza pomocí mikroskopu atomárních sil

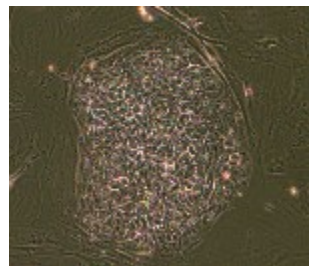


Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky

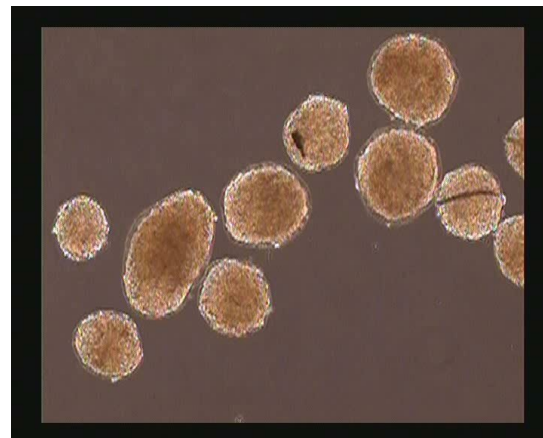
Katecholinergní polymorfní ventrikulární tachykardie (CPVT)



Biopsie kožních buněk



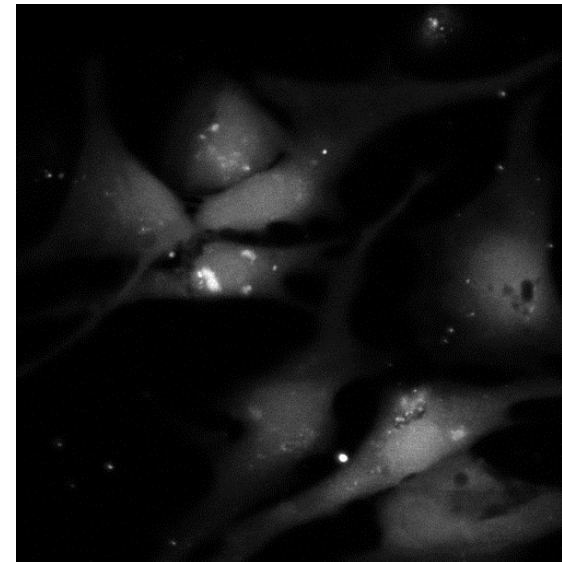
Indukované pluripotentní buňky



Embryonální tělíska



Fluorescenční mikroskopie

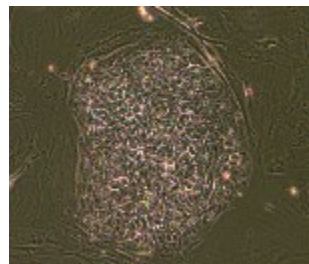


Modely chorob: Indukované pluripotentní kmenové buňky

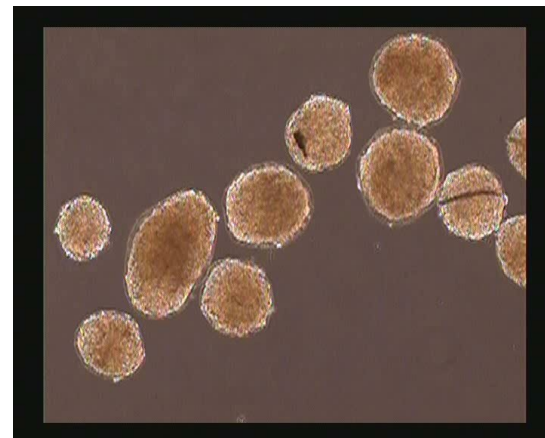
Katecholinergní polymorfní ventrikulární tachykardie (CPVT)



Biopsie kožních buněk

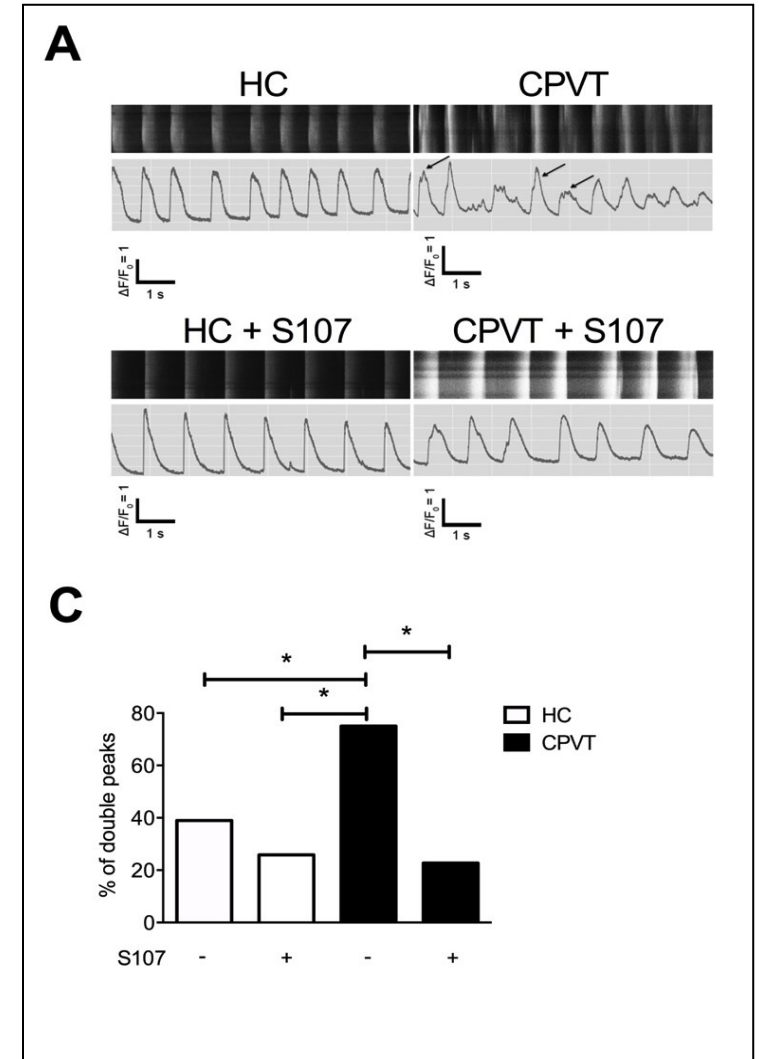


Indukované pluripotentní buňky



Embryonální tělíska

Sloučenina S107 stabilizovala vápníkový kanál – fenotyp podobný zdravým srdečním buňkám



Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

Možnosti: porovnání více iPSC z pacientů nesoucích stejnou mutaci se stejně širokou skupinou kontrolní

,nebo.....

Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

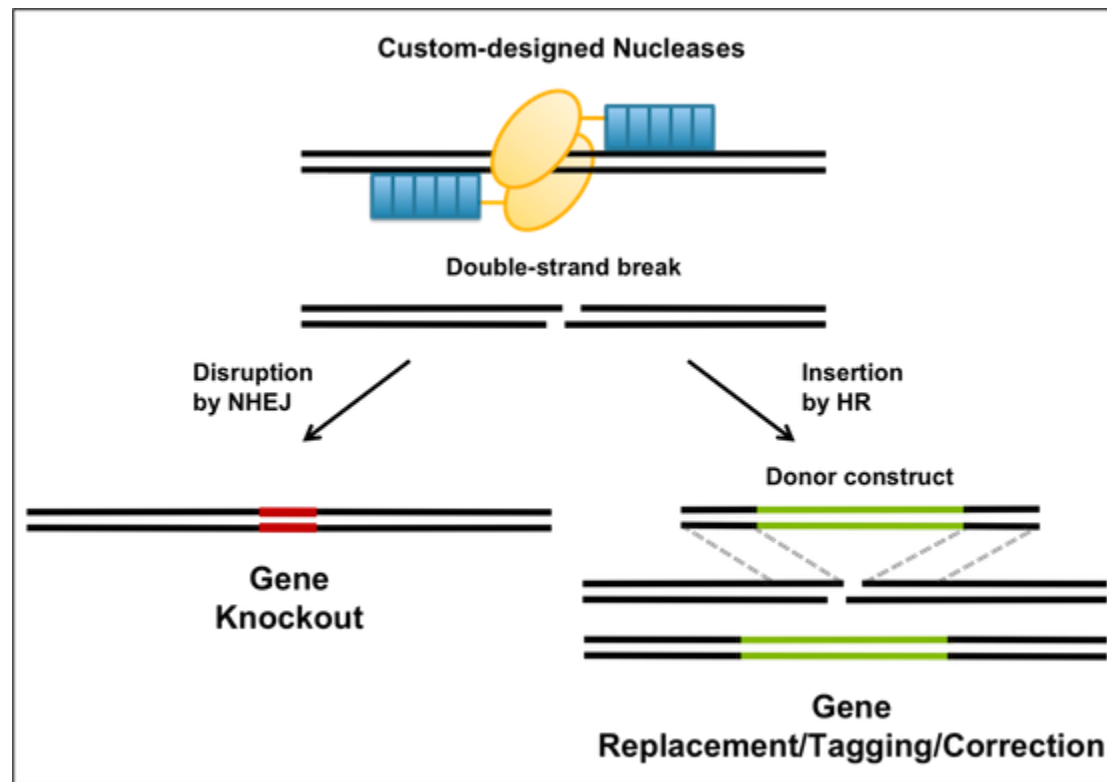
Cílená inverze mutace u iPSC z pacienta...

Modely chorob vyjma rakovin....

Nejčastěji využívané

Programovatelné místně
řízené nukleázy

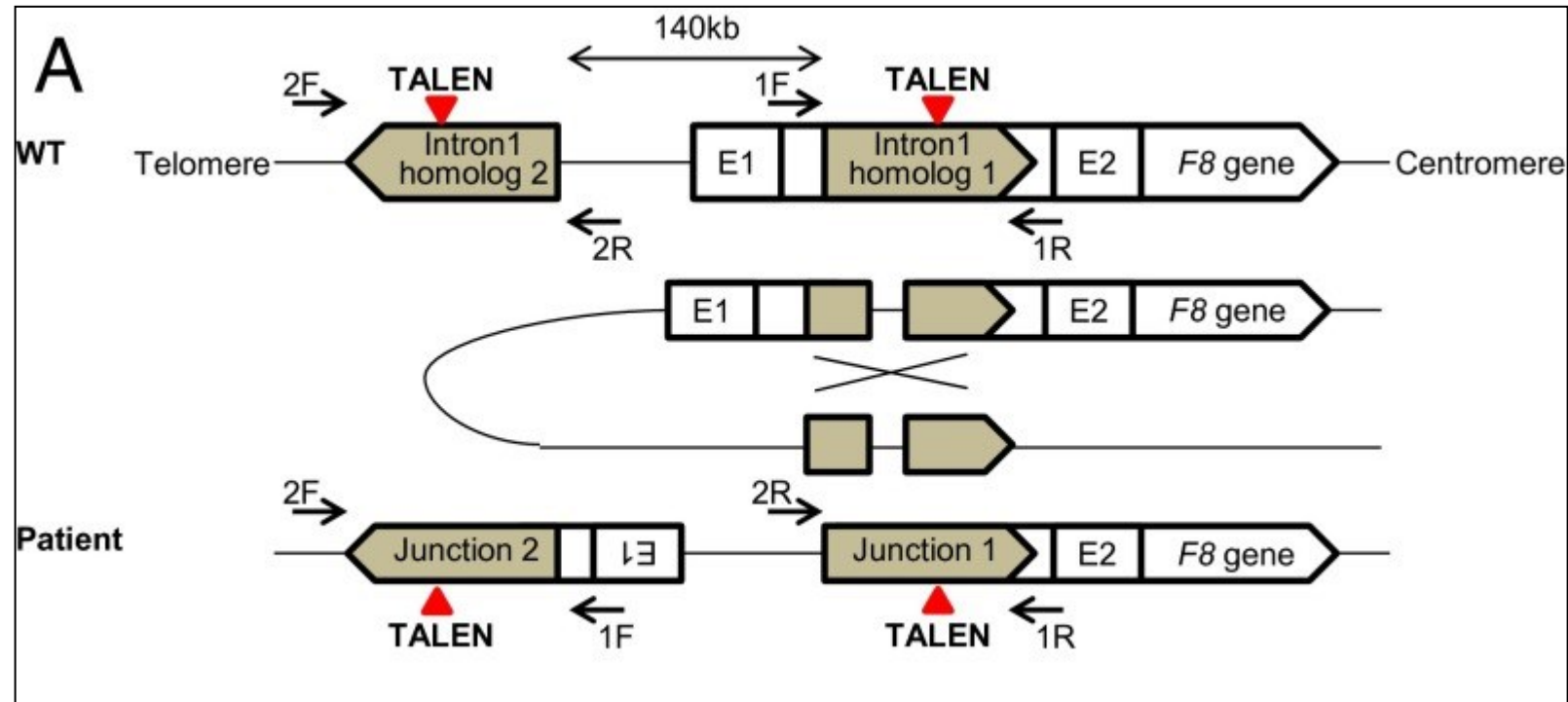
- Zinc-Finger nukleázy)
- Taleny
- CRISPR/Cas



<http://www.ctm-basel.ch/>

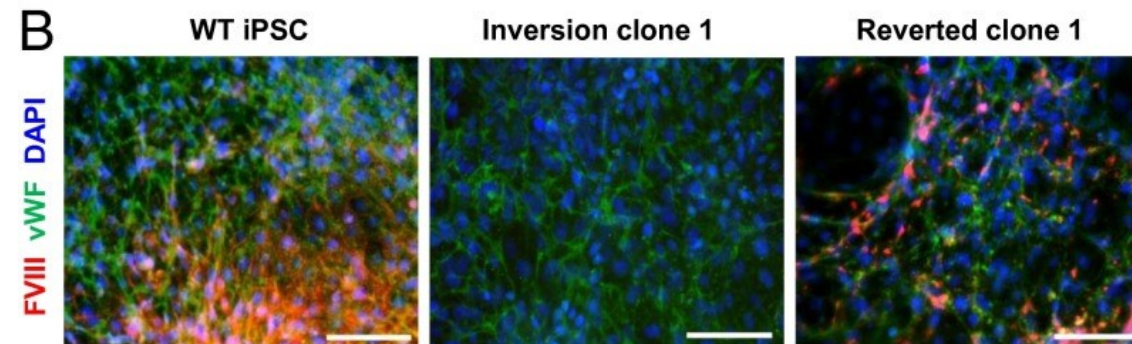
Cílená inverze mutace u iPSC z pacienta...

Hemofilie A – nejčastější příčina je inverze části genu koagulačního faktoru 8



Park, CY, PNAS, 2014

Bonus: Stejným párem TALENů lze opravit mutaci v iPSC z pacienta – otevírá cestu genové/buněčné terapii



Park, CY, PNAS, 2014

Modely chorob vyjma rakovin....

Indukované pluripotentní kmenové buňky

- + model přesně odpovídá pacientovi
- + přesně víme co se odehrává na úrovni organismu
- neustálený standard kontrol
- možný neznámý polygenní a epigenetický vliv

Embryonální kmenové buňky

- + konzistentní genetické pozadí
- + “čistota“ genetické manipulace
- nutnost použití řízené manipulace genomu
- absence polygenních faktorů

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním
 2. Monoklonální protilátky
 3. Rekombinantní glykoproteiny
 4. Hormony a růstové faktory
 5. Enzymy
-
6. Testování léčiv / **Toxikologické studie**
-
7. Buněčná transplantace
 8. Tkáňové inženýrství
 9. Výroba organoidů a orgánů

Toxikologické využití živočišných tkáňových kultur

Toxikologie léčiv – využívá tkáňové kultury podobné cílové tkáni/buněčnému typu k testování účinku/toxicity léku

Enviromentální toxikologie – často vyžaduje biotransformaci, proto využívá jaterní buňky

Primární kultury

Prasečí/kravská játra
Buňky z rybích žaber
atd.

Imortalizované linie

Buněčné linie odvozené
z hepatomu

např. HepG2

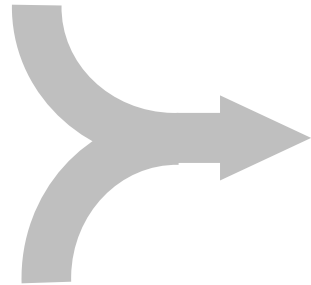
(Lidské) heaptocyty z kmenových buněk

Nutná diferenciacce, ale poskytují
informaci o vývojové toxicitě a
regeneraci jater

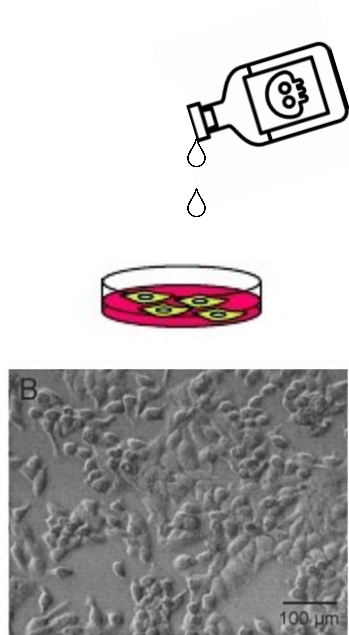
Toxikologické využití živočišných tkáňových kultur

Imortalizovaná linie

Např. odvozená z
hepatocelárního
karcinomu



Buněčné typy
diferencované z
kmenových buněk

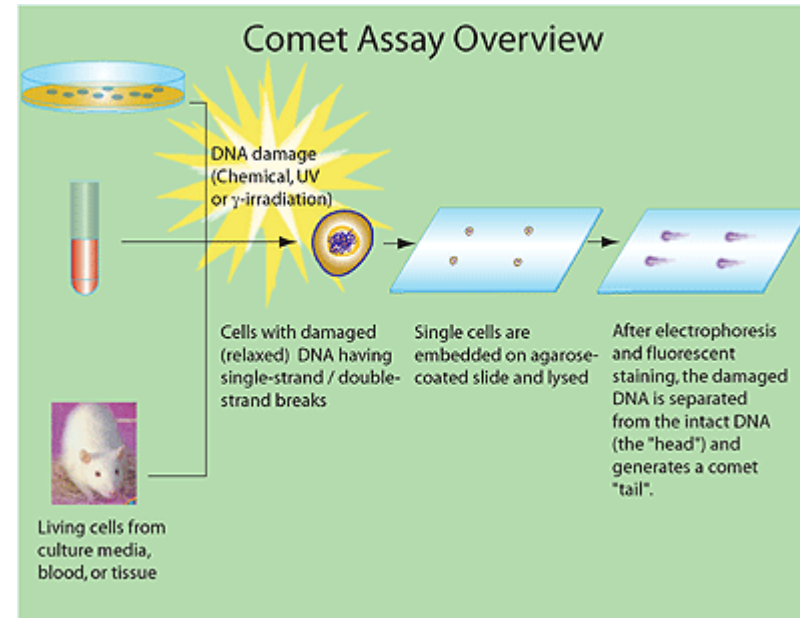


Např. HepG2

Funkční analýza toxicity:

např. analýza integrity DNA (genotoxické látky)

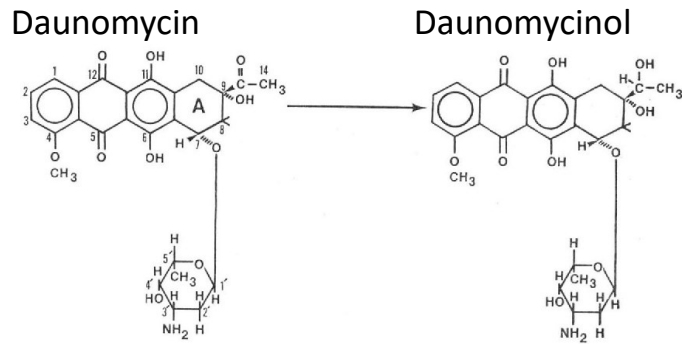
„analýza komet“:



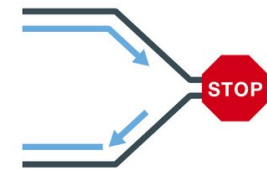
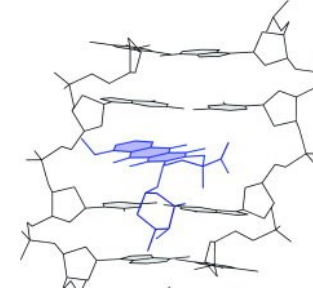
Toxikologické využití živočišných tkáňových kultur

Léčba
akutní
myeloidní
leukémie

Biotransformace v savčích/lidských buňkách



Klatrát s DNA

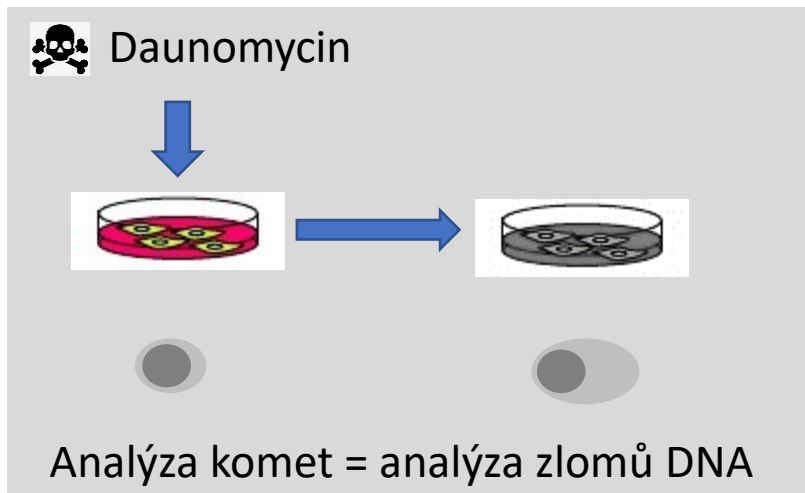


Zaražená replikační vidlice DNA



Dvojřetězcový zlom DNA

CYTOTOXIC!!!

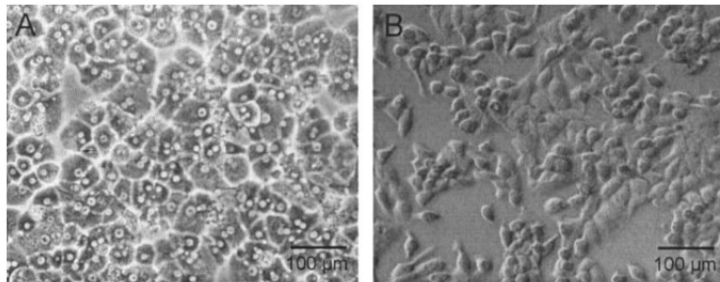


Toxikologické využití živočišných tkáňových kultur

Biotransformace v savčích/lidských buňkách

ALE né vždy se chová linie stejně, jako buňky v těle

Primokultura z jater Hepatomová linie HepG2

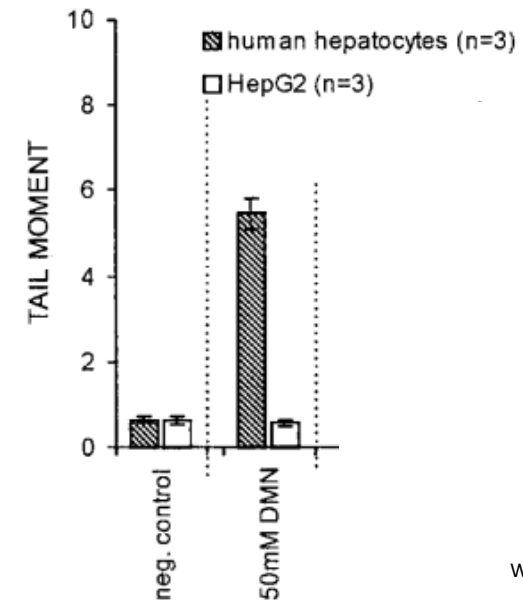
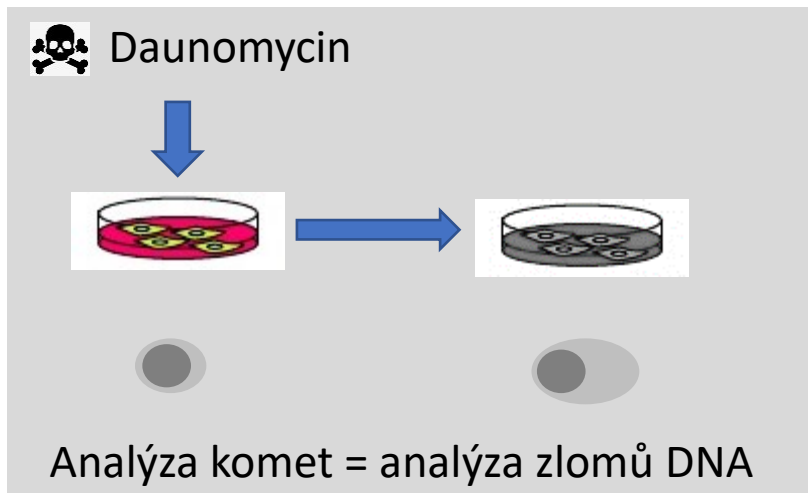
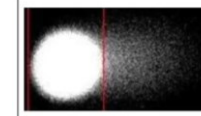


Analýza komet

Kontrolní jádro



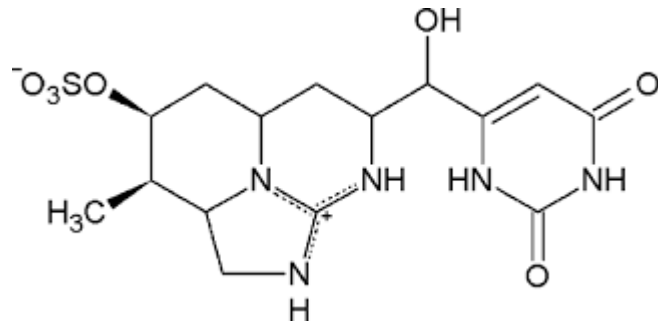
50mM DNM



Toxikologické využití živočišných tkáňových kultur

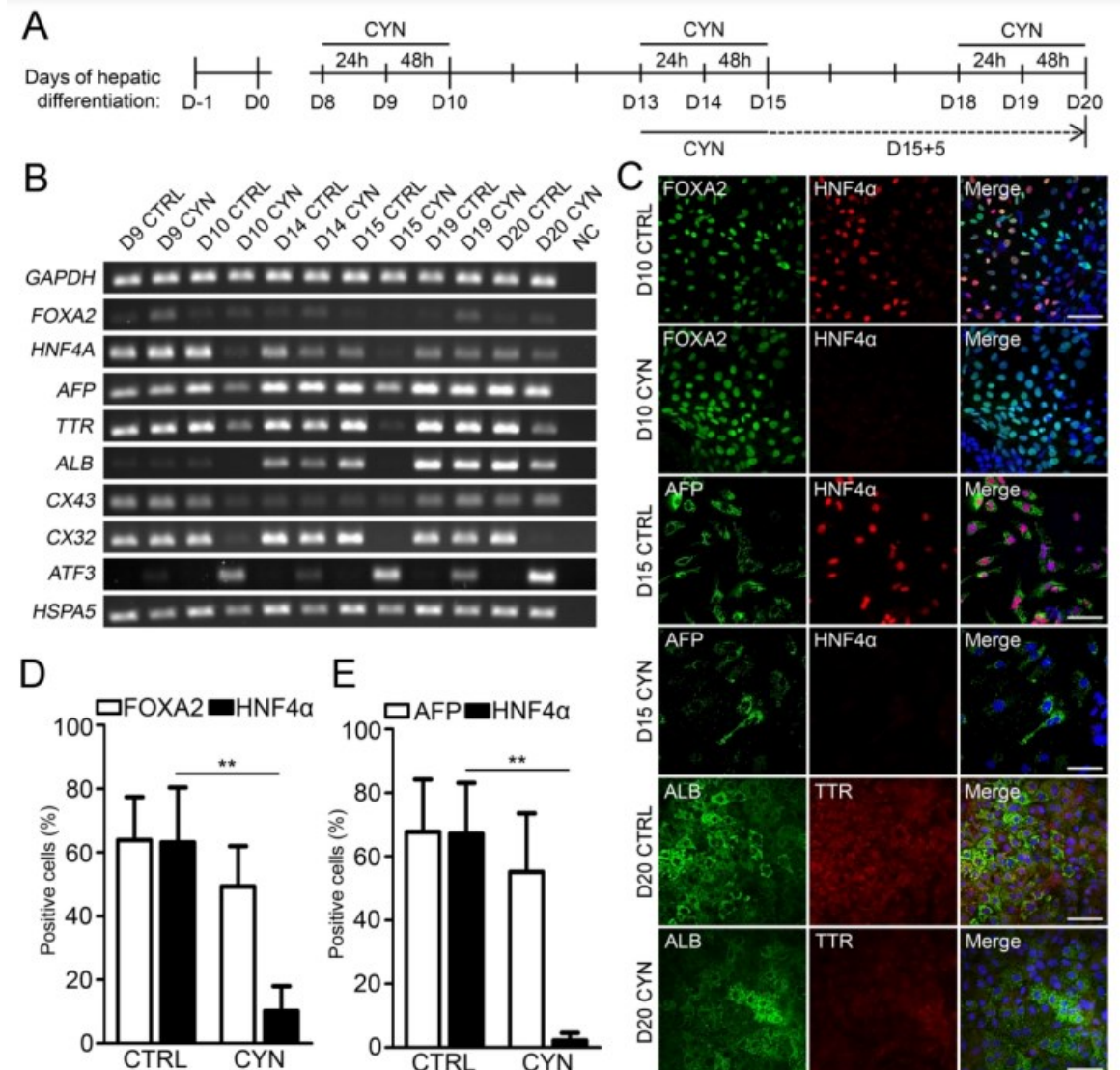
Vývojová toxikologie – užití hepatocytů diferencovaných z kmenových buněk

cylindrospermopsin



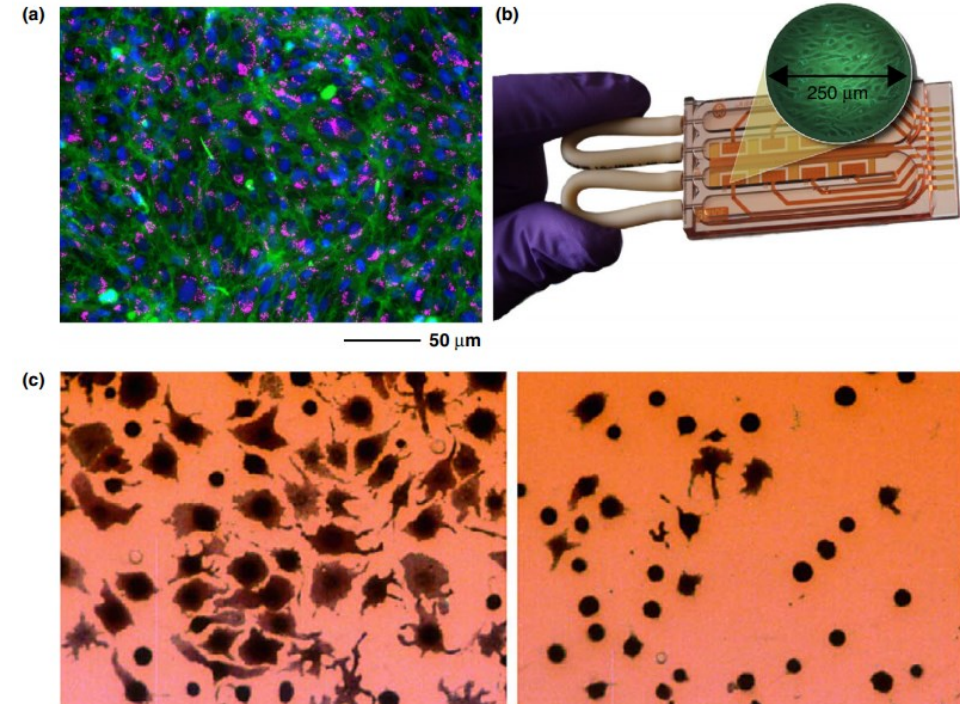
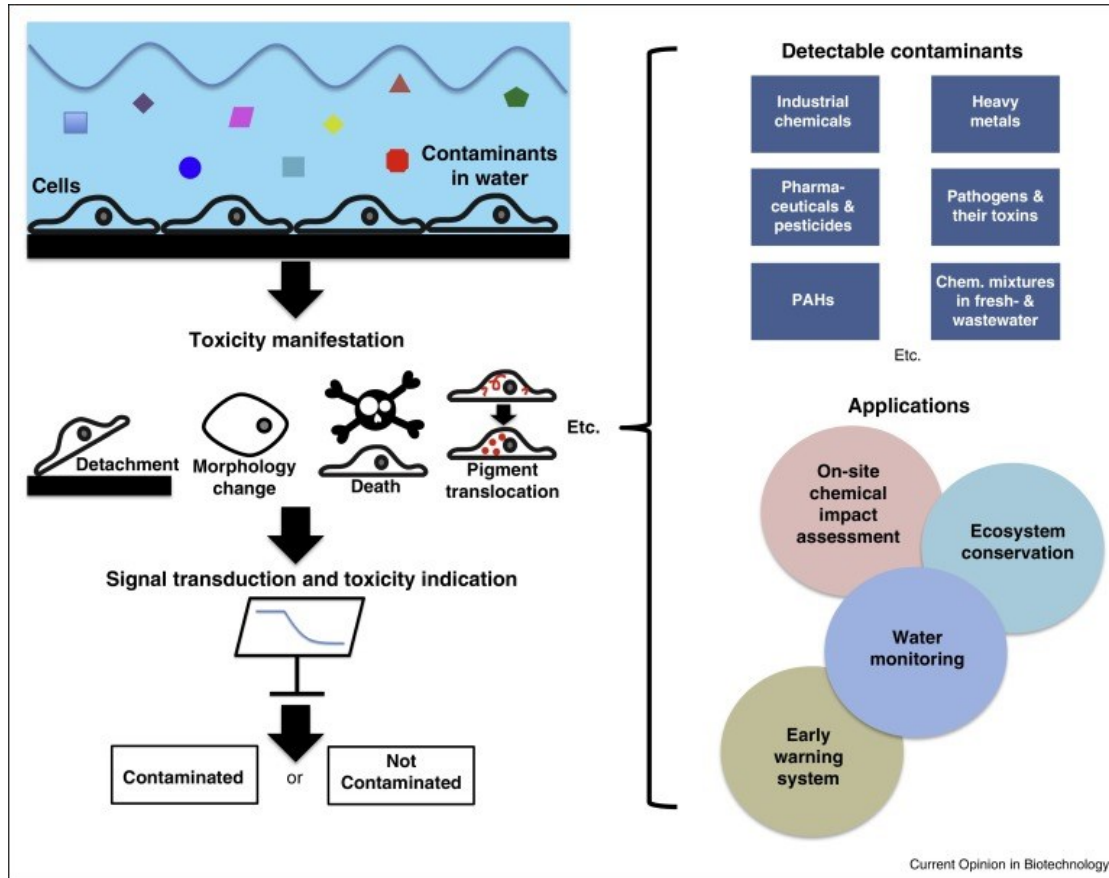
Toxin uvolňvaný sinicemi ve vodách v ČR

- Malý efekt na dospělou jaterní buňku
- Velký na jaterní progenitory – HNF4 α
 - vývoj plodu
 - regenerace jater



Toxikologické využití živočišných tkáňových kultur

Detekce kontaminantů ve vodě biosenzorem s buněčnou kulturou



+ Změna signálu v případě apoptózy, nekrózy, diferenciacie, anoikis či senescence
 - Omezená schopnost rozlišit jednotlivé kontaminanty

Biotechnologie zahrnující kultury živočišných buněk

Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním
 2. Monoklonální protilátky
 3. Rekombinantní glykoproteiny
 4. Hormony a růstové faktory
 5. Enzymy
 6. Testování léčiv / Toxikologické studie
-
7. Buněčná transplantace
 8. Tkáňové inženýrství
 9. Výroba organoidů a orgánů

Příště...



Děkuji za pozornost..

Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz