



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

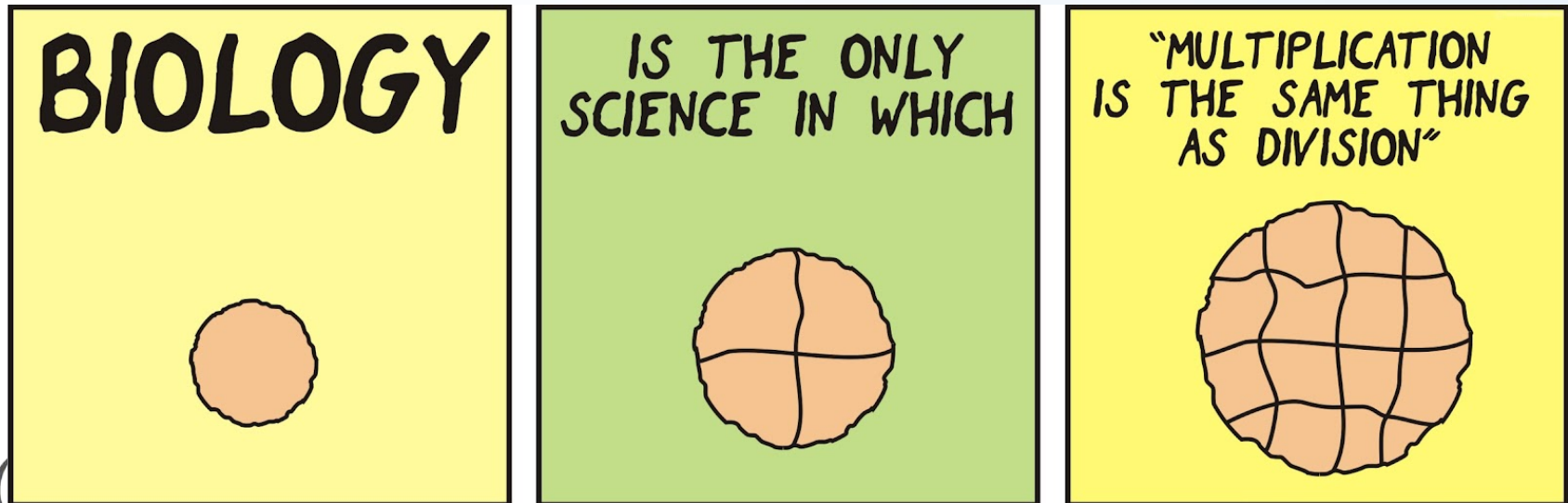
Studium buněk I kultivace

Jiří Novák
Podzim 2014



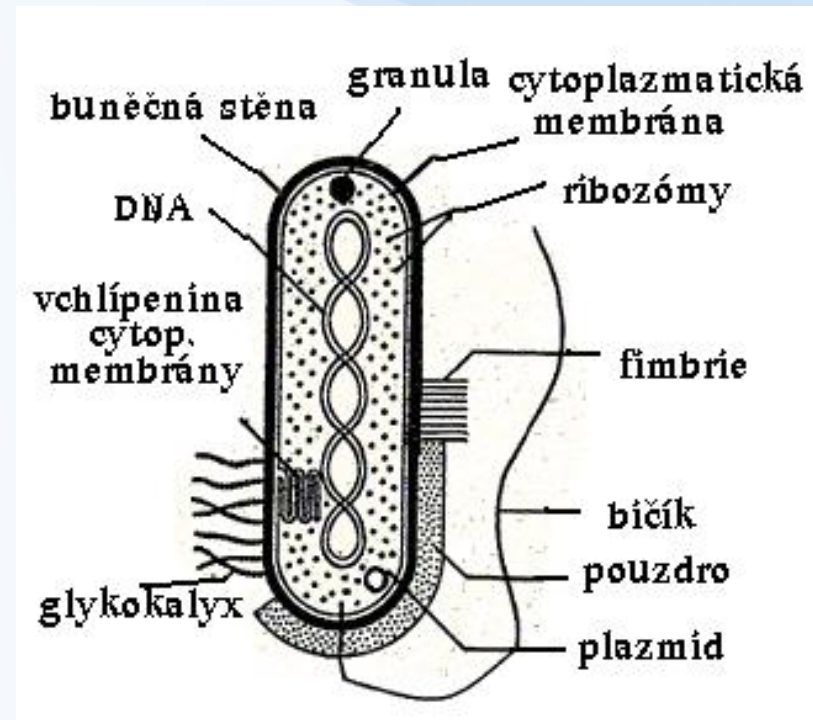
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- *In vitro* kultivace orgánů, tkání a buněk v definovaných podmínkách



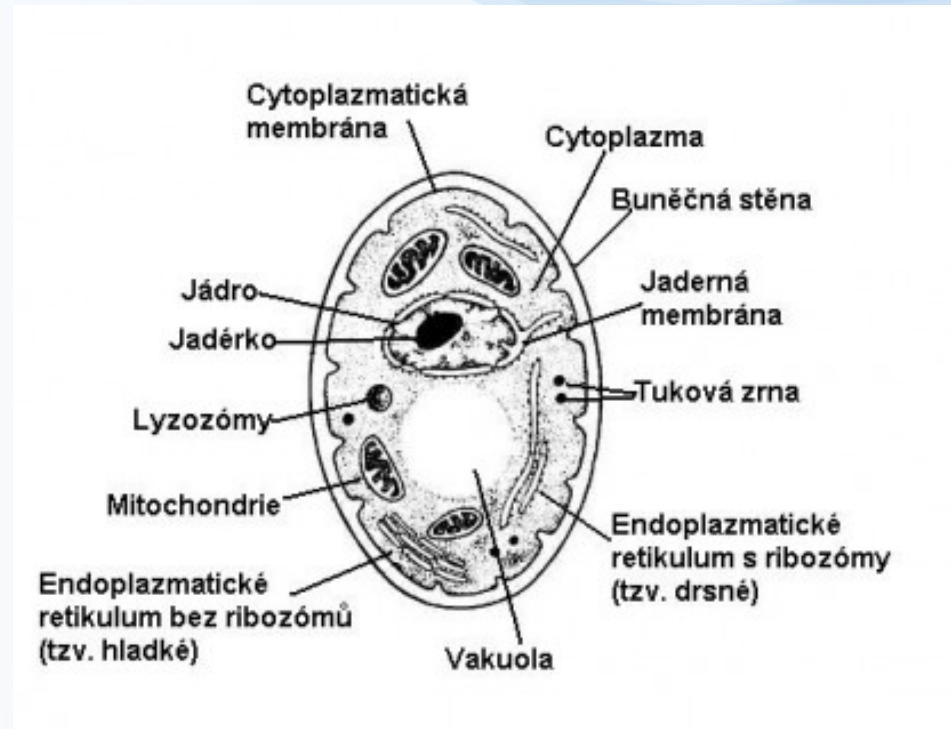
Mikroorganismy -bakterie

- Bakterie – prokaryontní stavba buňky
 - Jednobuněčné organismy
 - Jediný kruhový chromosom+ plasmidy
 - Odlišná proteosyntéza od vyšších organismů



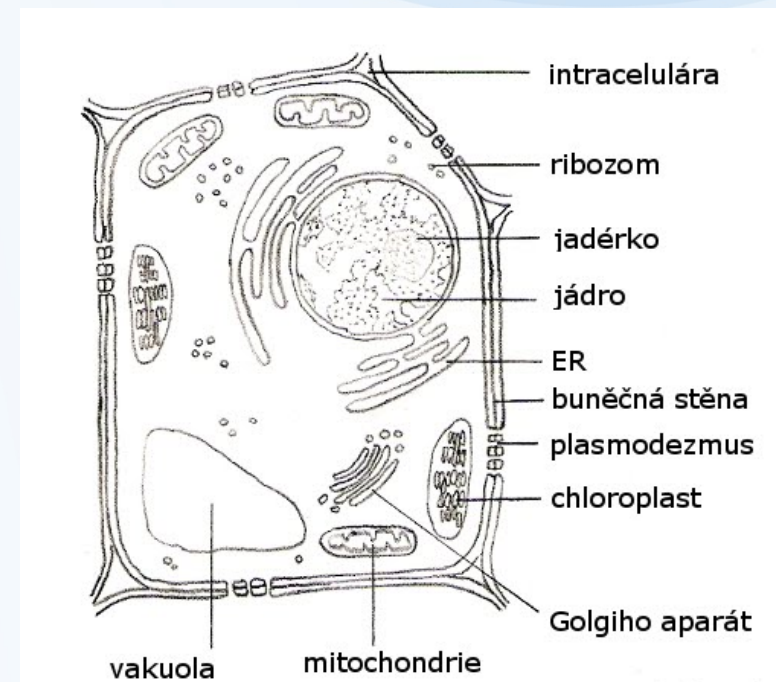
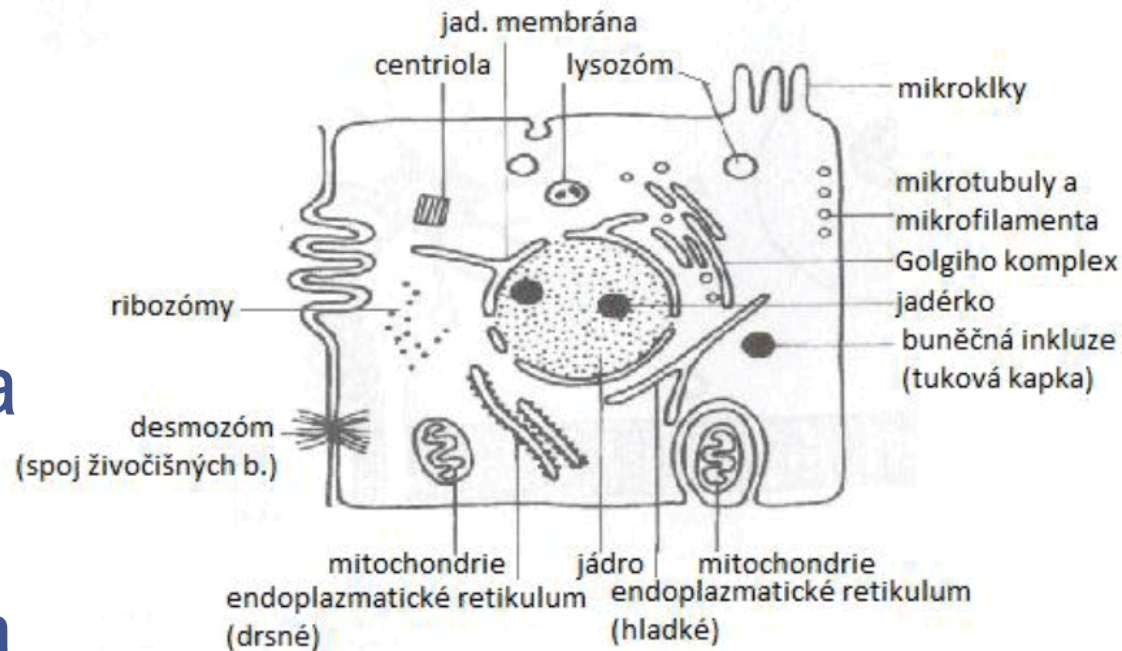
Mikroorganismy - kvasinky

- Kvasinky – eukaryontní stavba buňky
 - Jednobuněčné organismy
 - Buněčná stěna
 - Stejný typ proteosyntézy jako u vyšších organismů



Eukaryontní buňky

- Živočišná buňka
- Rostlinná buňka
 - Buněčná stěna
 - Vakuola
 - Plastidy
 - Plasmodesmata



Srovnání buněčných kultur

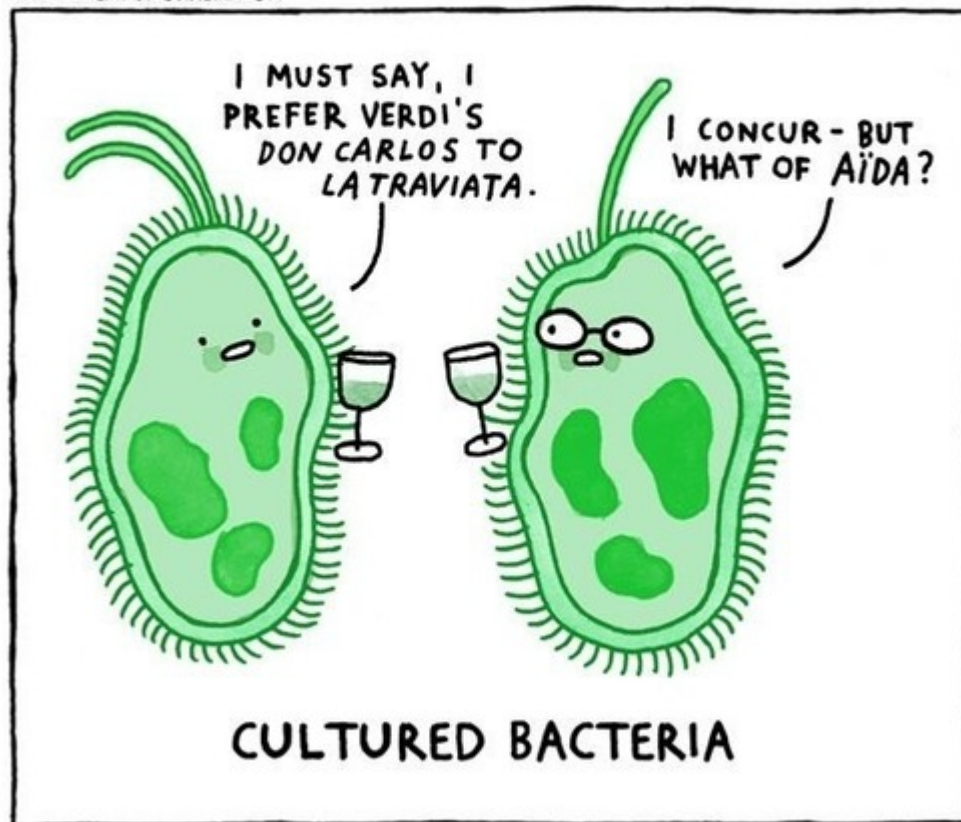
Buněčná linie	Výhody	Nevýhody
Bakteriální	<ul style="list-style-type: none">-jednoduchost buňky-rychlý růst/krátký generační čas-nízká náročnost na kultivaci	<ul style="list-style-type: none">-jednoduchost buňky-odlišná proteosyntéza-nízká relevance k vyšším organismům
Kvasinková	<ul style="list-style-type: none">-rychlý růst/krátký generační čas-nízká náročnost na kultivaci	<ul style="list-style-type: none">-odlišnost fyziologie od živočišné buňky- nižší relevance k vyšším organismům
Živočišná	<ul style="list-style-type: none">-vysoká relevance k vyšším organismům	<ul style="list-style-type: none">-složitost kultivace-relativně pomalý růst-náchylnost je kontaminaci



Mikroorganismy

MONDAY PUNDAY

BY GEMMA CORRELL
WWW.GEMMACORRELL.COM



© GEMMA CORRELL / www.gemmacorrell.com



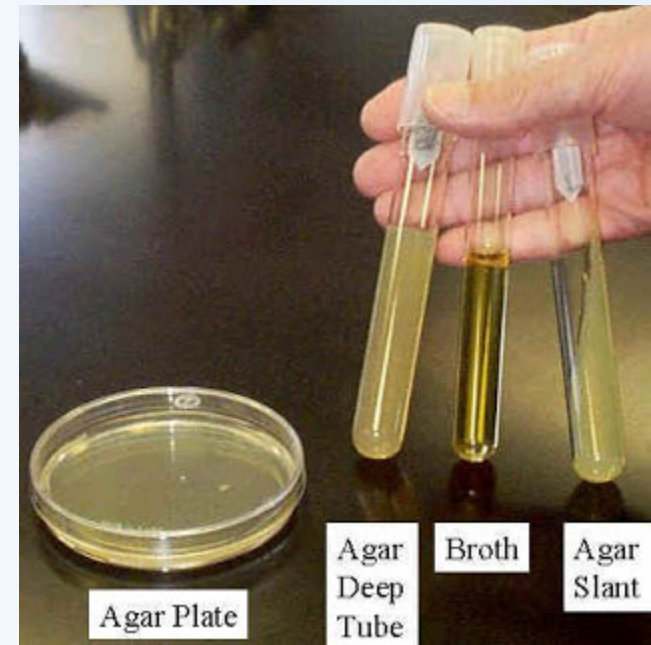
Mikroorganismy

- Bakterie + kvasinky
- Média:
 - Složení- např. hydrolyzát masa, kvasinek, slad, krev

Členění:

- Podle konzistence
 - **Tekutá média** (bujóny) – často stejnoměrný růst (zákal), nemožnost rozlišení různých druhů ve směsné kultuře, slouží k namnožení vzorku
 - **Pevná média** (agarové půdy, cca 3 % agaru)- možnost klonální selekce
 - **Polotuhá média** (0,5-2 % agaru)- motilita bakterií
 - **Dvojfázová média**
- Podle nutričních komponent
 - Jednoduchá
 - Komplexní
 - Syntetická (definovaná)
- Podle funkce
 - Bazální (pepton, ...)
 - Obohacená –doplňená o živiny
 - (krevní agar, čokoládový agar,...)
 - Selektivní –
 - např. antibiotika, pH, salinita, barviva,...

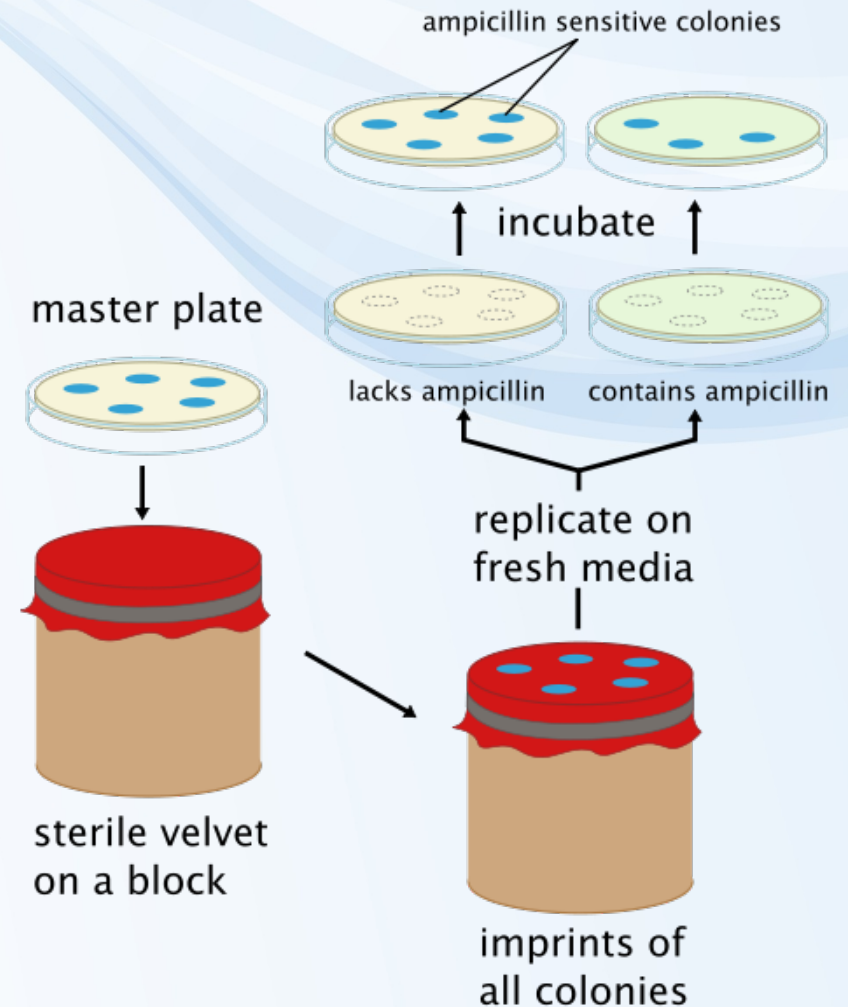
- **Diagnostická** (změna barvy, hemolýza,...)



- Snadná klonální selekce mutantních jedinců



Klonální selekce metodou razítka (replica plating)

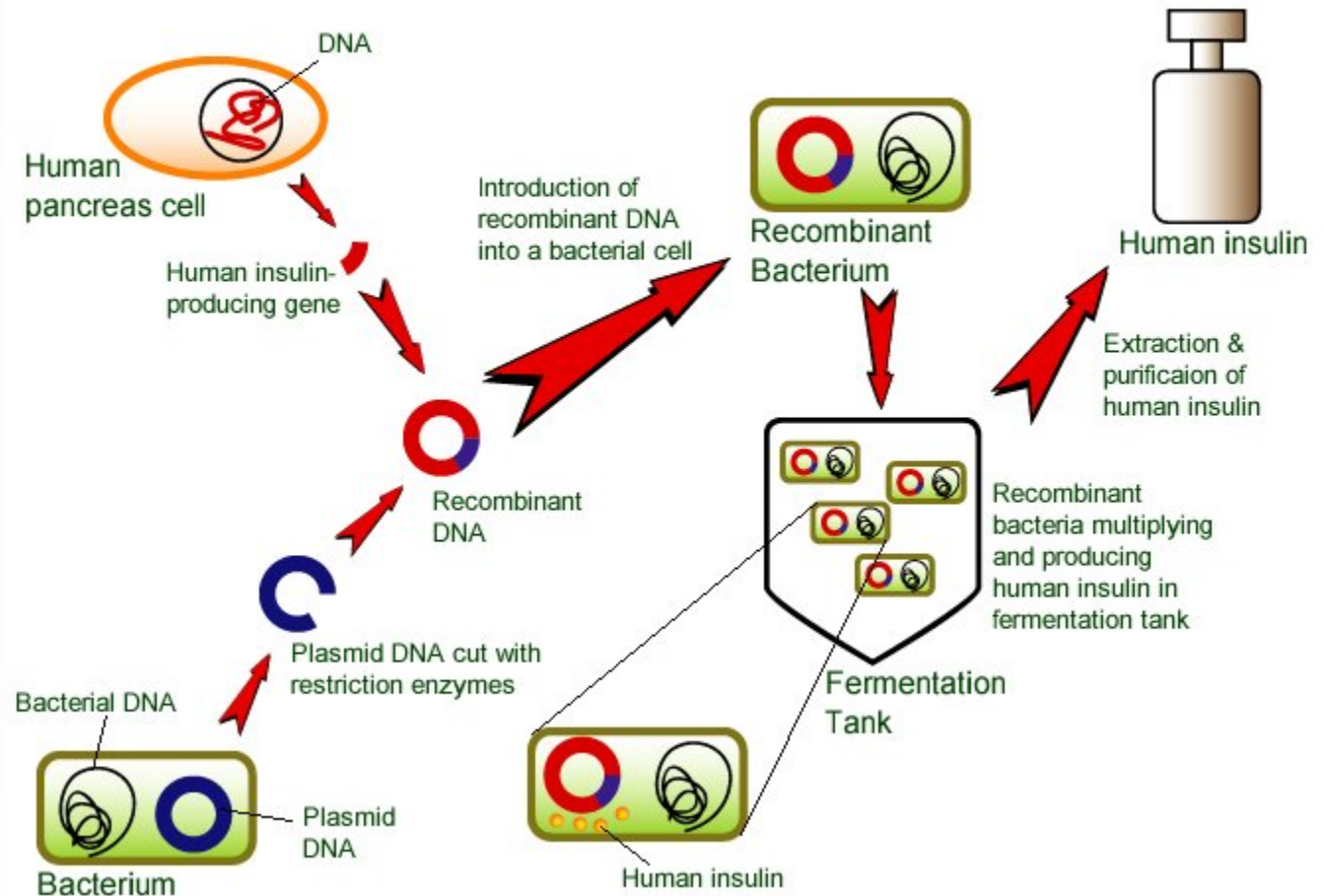


Mikroorganismy

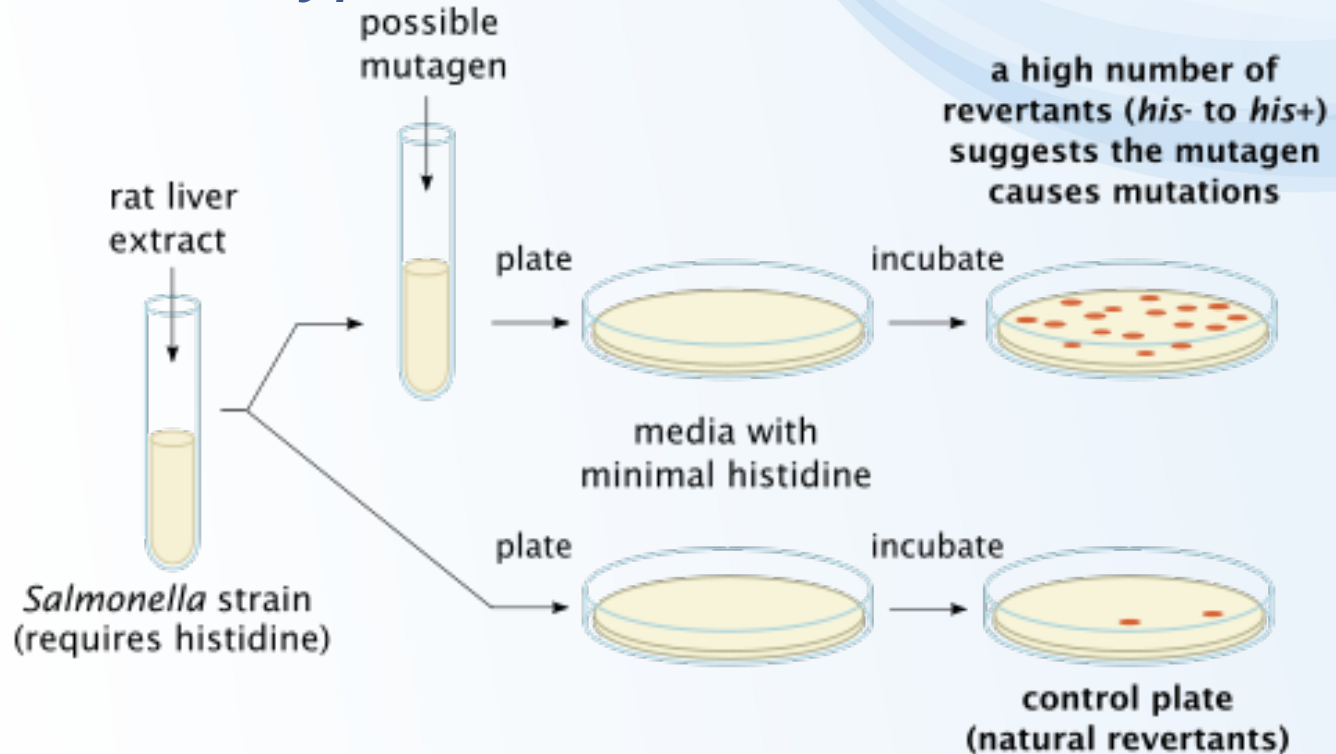
Využití ve vědě:

- Produkce látek (proteinů, antibiotik,...)

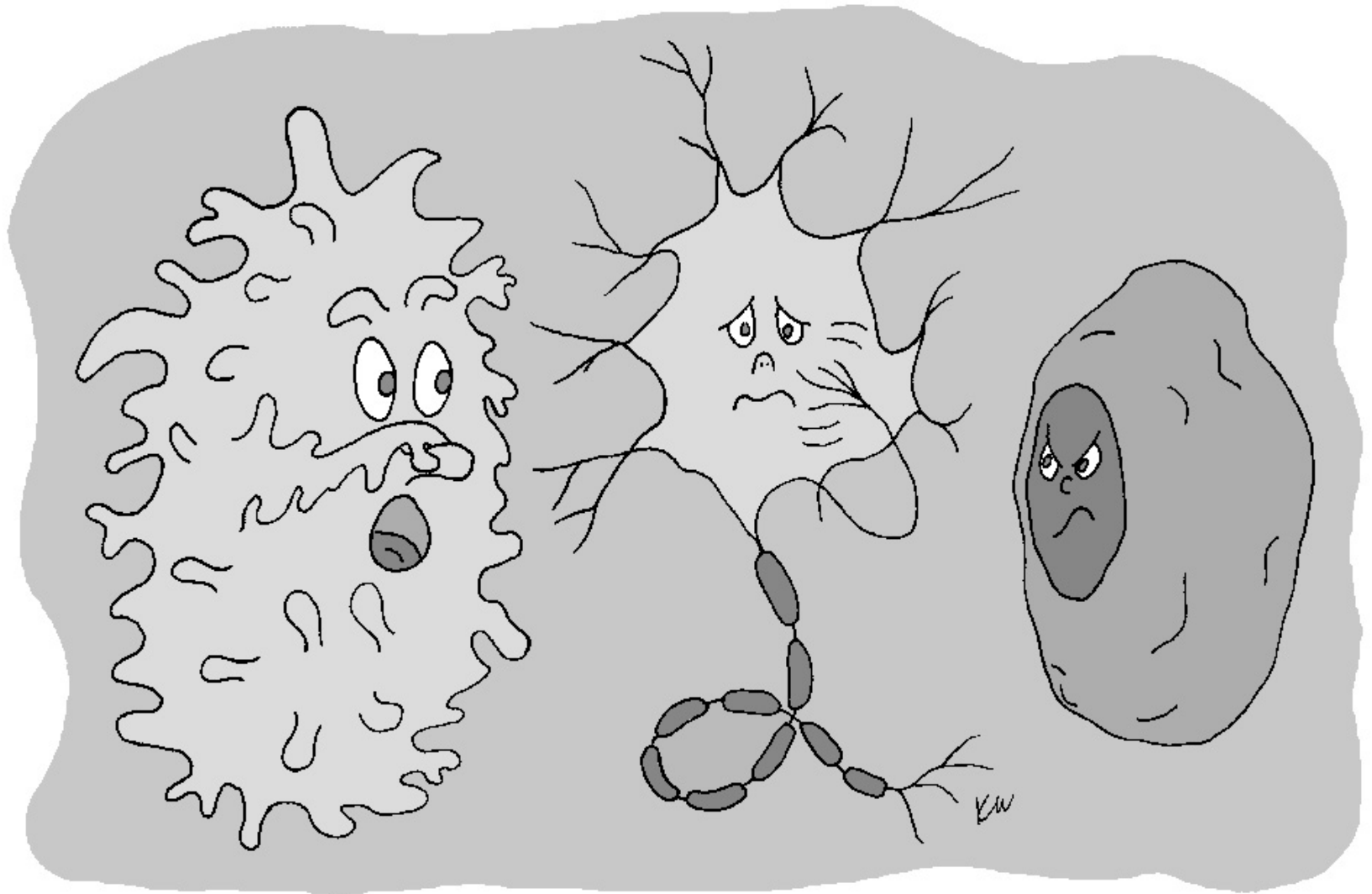
Human Insulin Production



- Amesův test mutagenity
 - *Salmonella typhimurium* TA 98, His-



Eukaryontní buňky



“Whew! Which one of you two released a vesicle?!?”



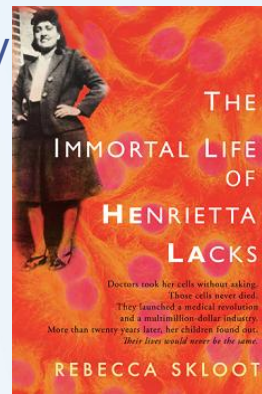
Proč kultivovat buňky *in vitro*

- Nástroj pro studium fyziologie organismu ve zjednodušené formě
 - Napodobení chování buněk v *in vivo* prostředí (rakovinné buňky)
 - Vysoce selektivní a **definované** prostředí umožňující ovlivňování většiny parametrů (optimalizace růstu, mezib. Komunikace...)
 - Studium homogenního materiálu (práce s klonální linií identických buněk)
- Testování toxicity *in vitro*
- Virologie- studium virů a produkce vakcín
- Genetické inženýrství- produkce komerčních proteinů, velkoprodukce vakcín,...
- Genová terapie – náhrada buněk s nefunkčním genem „opravenými“ buňkami



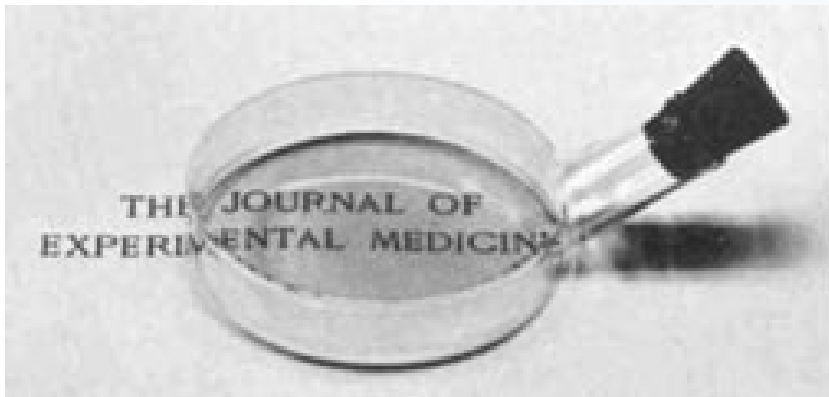
Historie buněčných kultur

- 1878: Claude Bernard navrhoval, že fyziologické systémy organismu je možné udržovat při životě i po smrti organismu.
- 1885: Roux choval buňky kuřecího embrya ve fyziologickém roztoku.
- 1897: Loeb ukázal, že krvinky mohou přežít v séru a plasmě
- 1903: Jolly pozoroval buněčné dělení mločích leukocytů *in vitro*
- 1907: Harrison kultivoval žabí neurony **metodou zavěšené kapky**. Neurony rostly několik týdnů..
- 1910: Burrows – dlouhodobá kultivace kuřecích embryonálních buněk – detailní pozorování mitózy.
- 1911: Lewis vytvořil první tekuté médium z mořské vody, séra embryového extraktu a peptonu. První kultivace buněk v monovrstvě.
- 1913: Carrel zavádí striktní **aseptickou techniku kultivace**, která umožňuje dlouhodobé udržování kultur.
- 1916: Rous a Jones začali používat trypsin pro pasážování přisedlých kultur.
- 1923: Carrel a Baker vyvinuli „**T-flask**“ **první speciální kultivační nádobu** na buněčné kultury umožňující kontrolu pod mikroskopem.
- 1927: Carrel a Rivera vyrobili první virovou vakcínu (vaccinia).
- 1933: Gey vyvinul **kultivaci v otáčející se trubici**
- 40. léta 20. stol : Pen-strep- **zavedení antibiotik** do kultivace.
- 1952 - George Gey: první kontinuální lidské b. HeLa (Henrietta Lacks, buňky z nádoru děložního čípku, 70-80 chromozómů, do té doby se předpokládalo, že nádorové buňky nelze kultivovat, ukázalo se však, že naopak rostou rychleji a jsou méně náročné na vnější podmínky).

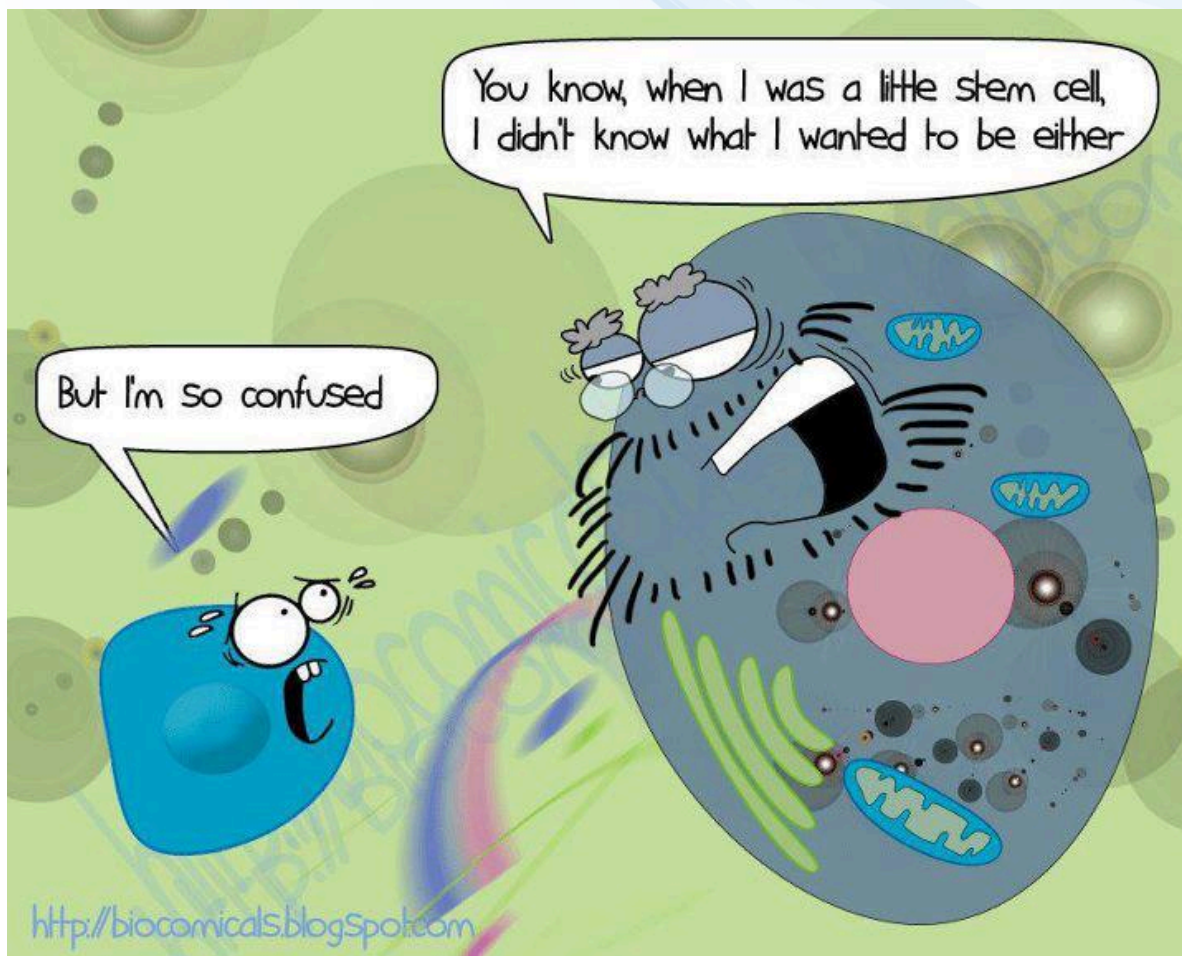


Zásadní objevy

- Antibiotika- inhibice růstu kontaminace
- Trypsin- proteolytický enzym umožňující pasážování adherentních kultur
- „Definované“ kultivační medium



Typy buněčných kultur



Typy buněčných kultur

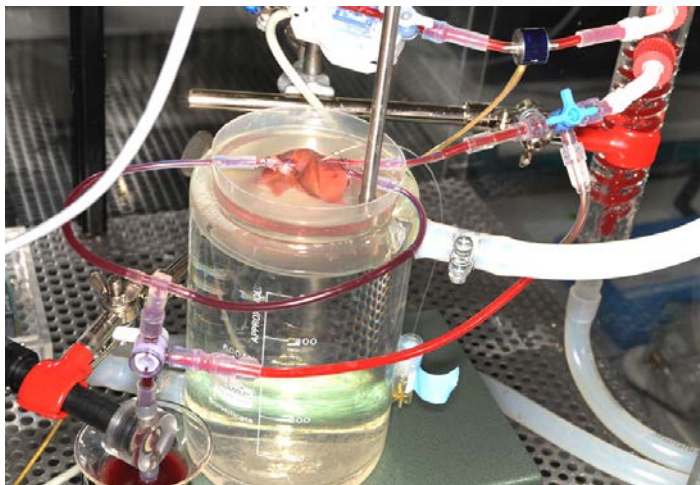
- Kultivace orgánů *ex vivo* (např. perfused heart)
 - životaschopnost 2-3 h
- Kultivace tkání *in vitro*
 - životaschopnost 4-6 h, zachována struktura tkáně
- Primární buňky/linie
- Kontinuální buněčné linie
- Subcelulární frakce (např. mikrosomální)
 - definované podmínky, nízká relevance k *in vivo*



míra
definovanosti

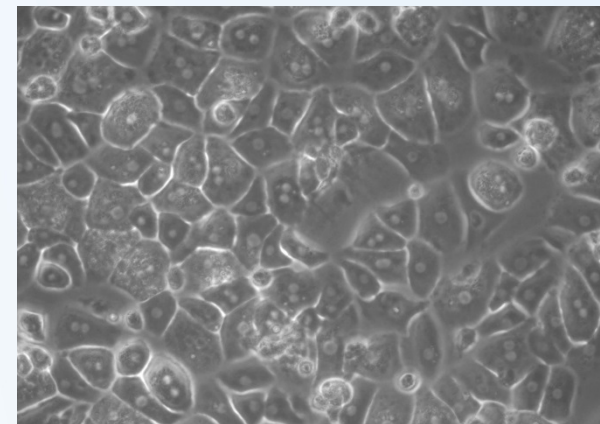


komplexita
relevance



Primární kultury

- Buňky chirurgicky a/nebo enzymaticky odebrané z organismu a přenesené do vhodného prostředí, které jsou schopné růstu
 - dvou kroková kolagenázová promývací technika
- Po odběru dochází k dediferenciaci
 - ztráta mezib. spojů → proliferace
 - ischemické poškození → zánět, spontánní apoptóza
- Rozkultivování primárních buněk vede ke vzniku buněčných linií
- Omezená životaschopnost- po několika děleních zestárnou a odumírají (hepatocyty cca 4 dny)



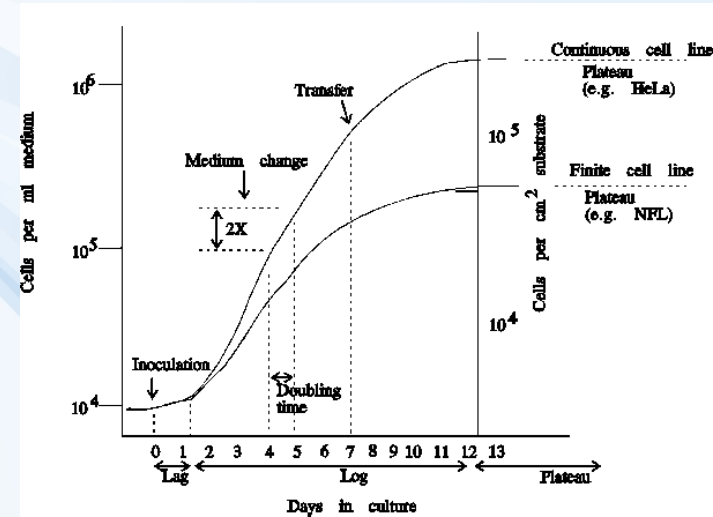
Kontinuální buněčné linie

- Většina primárních buněčných linií má omezenou životnost- po několika děleních se přestanou množit
- Kontinuální linie:
 - Rakovinné linie (nejběžnější)
 - Rychlý růst, nižší závislost na obsahu séra v médiu a potřebě zakotvení – rostou víc v suspenzi
 - Nestabilní genotyp
 - Schopnost růst do vysoké denzity
 - Odlišný fenotyp od buněk původní tkáně
 - Ztráta exprese tkáňově specifických genů
 - Imortalizované linie
 - Spontánně (někdy záměrná indukce mutageneze) výskyt záleží na druhu organismu
 - Pomocí transdukce virem deregulujícím b. cyklus (HPV, EBV, SV40 T ...)
 - Umělá exprese/inhibice klíčových molekul- (např. telomeráza, siRNA - Rb nebo p53)
 - Hybridoma –fúze buňky s požadovanou funkcí s rakovinnou buňkou (např. fúze B lymfocytu s myelomem ->produkce protilátek)
 - Relativně stabilní genotyp
 - Relativně vyšší podobnost s buňkami *in vivo*

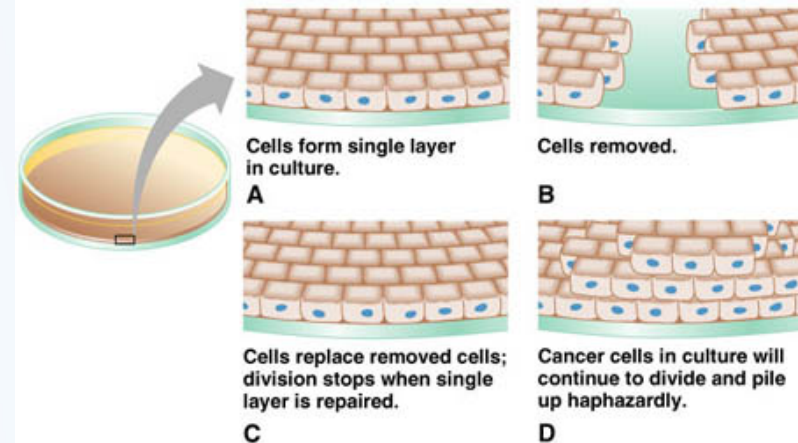


Vlastnosti buněčné linie

- **Adherentní, suspenzní**
- **Generační doba** - období mezi dvěma mitózami (tj. trvání buněčného cyklu).
- „**Doubling time**“ – čas zdvojení, čas potřebný ke zdvojnásobení počtu buněk v populaci.
- **Růstová křivka** - závislost počtu buněk na době kultivace.
- **Buněčný kmen** populace buněk selektovaná na základě určitých specifických vlastností.
- **Klon** je linie b. vzniklá z jediné buňky.
- **Linie transformované teplotně senzitivními onkogeny** - při nižší permissivní teplotě se chovají jako nádorové (32°C), při vyšší jako nenádorové
- **Kontaktní inhibice** - schopnost reagovat na hustotu buněk v okolí- rakovinné kultury ji většinou ztrácí

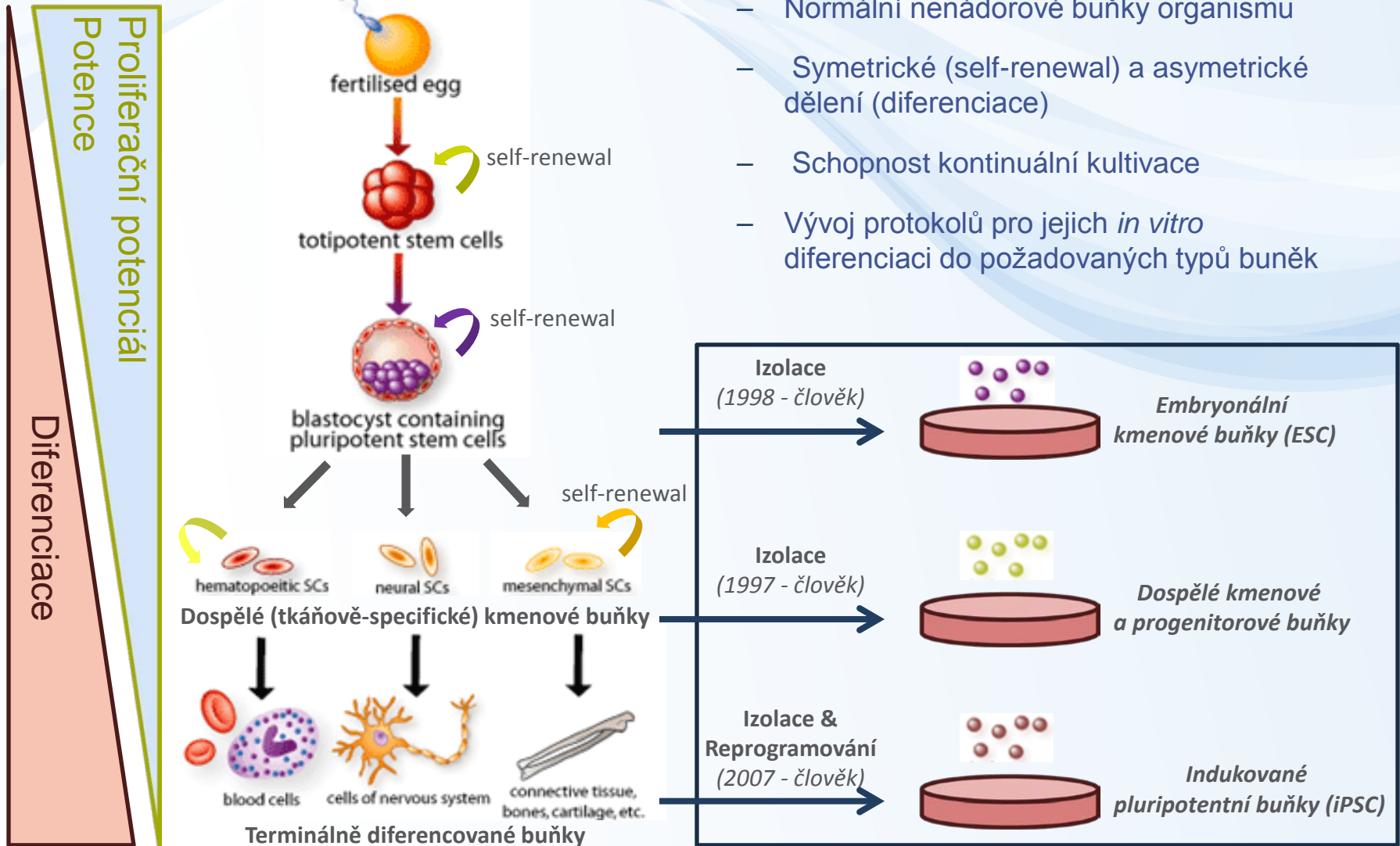


Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Kmenové buňky

- Normální nenádorové buňky organismu
- Symetrické (self-renewal) a asymetrické dělení (diferenciace)
- Schopnost kontinuální kultivace
- Vývoj protokolů pro jejich *in vitro* diferenciaci do požadovaných typů buněk



KMENOVÉ BUŇKY

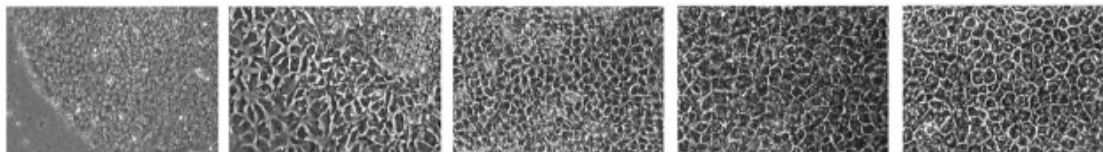
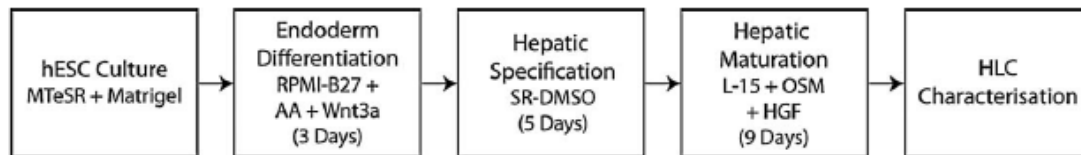
Příklad použití: Hepatotoxicita

- Játra – hlavní detoxikační orgán
- Biotransformace / bioaktivace toxických látek
- Permanentní jaterní linie (např. HepG2) – nízká aktivita detoxikačních enzymů – malá relevance

Gen	Genová exprese	
	Izol.hepatocyty	HepG2
CYP2B6	100	0.5
CYP2C9	100	0
CYP3A4	100	0
UTG1A1	100	5.2
AldB	100	0
Albumin	100	12.3

(Guillouzo 2010, Toxicology 270)

In vitro diferenciaci hESC do „hepatocyte-like cells“



Day 0

Day 3

Day 6

Day 11

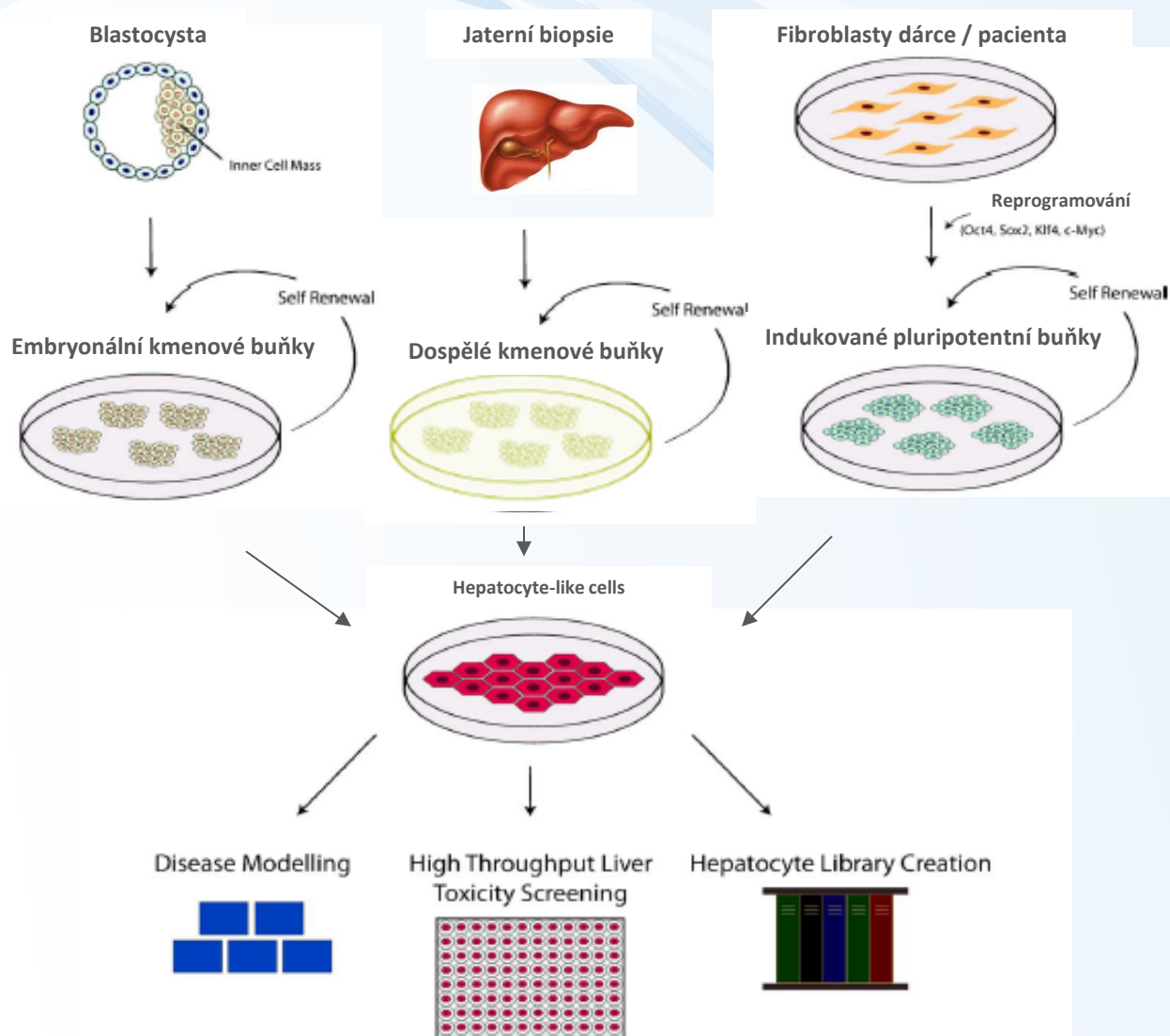
Day 17



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

(Greenhough 2010, Toxicology 278)

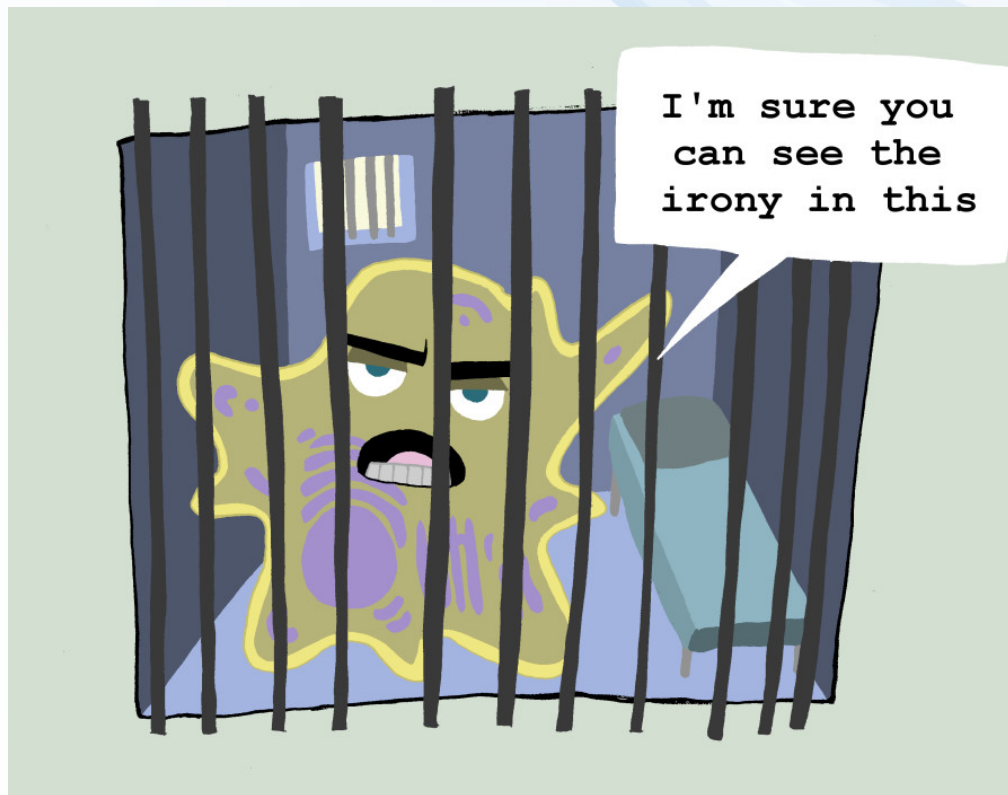
KMENOVÉ BUŇKY



*Upraveno dle
Greenhough
2010, Toxicology
278*

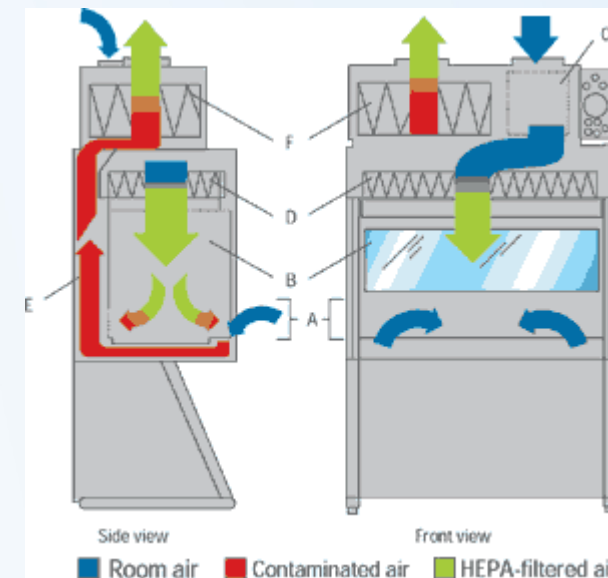


Kultivace



Potřebné vybavení

- Žádná imunita → náchylné ke kontaminaci
- Nutnost (semi-)sterilní práce
- Sterilizace materiálu a povrchů:
 - Zářením (UV, γ)
 - Teplem (suchým, vlhkým (autoklávování))
 - Filtrací (0,2- 0,1 μm filtr)
 - Sterilizační roztoky- 70% EtOH, SAVO
- Sterilní box- (flow box, laminární box)
- Inkubátor- teplota 25-30 °C pro hmyz, 20 °C pro ryby, 37 °C savčí buňky, CO₂ 2-5% & 95% vzduchu při 99% relativní vlhkosti
- Chladnička/mraznička- uchovávání roztoků (média, trypsin) 4 °C, séru a součásti média -20 °C
- Invertovaný mikroskop
- Kultivační materiál – plastový/skleněný (lahve, pipety,...)



Růstová média

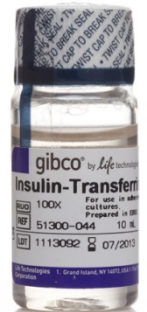
- Snaha vyvinout plně definované médium
- Běžná média (např. DMEM –Dulbeccovo modifikované Eaglovo medium)
 - Definovaná složka: 90-95 % -vodný pufr (pH 7,2-7,4) obsahující kombinaci solí, sacharidů, lipidů a aminokyselin (nejen esenciálních)
 - Nedefinovaná složka: 5-10 % fetální bovinní sérum (FBS)
 - směs růstových faktorů, hormonů atd. nutných pro růst
 - Někdy –antibiotika (pen-strep, gentamicin), pH indikátor



Náhrada séra:

ITS –inzulin, transferin, selen –umožňuje snížit množství séra v médiu

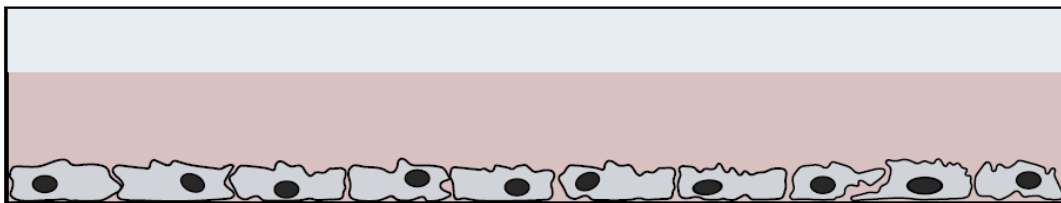
Definovaná kombinace růstových faktorů – většinou sérum plně nenahradí



Metody kultivace

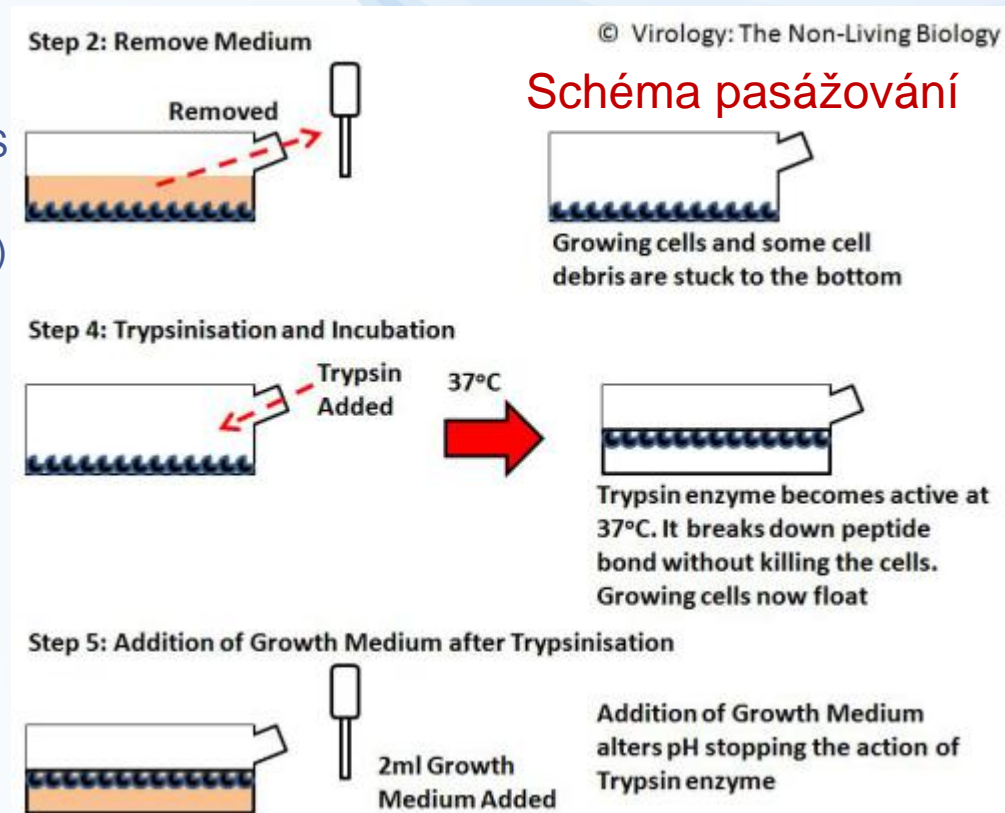
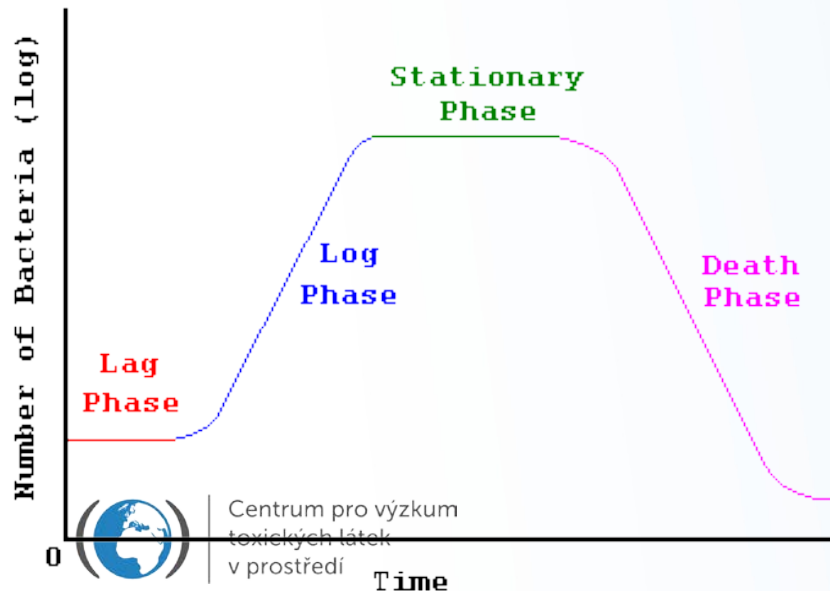
Klasický přístup 2D kultivace

- V Petriho miskách / kultivačních lahvích
 - Suspenzní
 - Adherentní
 - Na plastovém povrchu
 - Na „feeder layer“ - vrstva např. chemicky inaktivovaných buněk
 - Na vrstvičce želatiny, kolagenu
 - Na náhražce extracelulární matrix (např. Matrigel)



Zabezpečení konstantních podmínek kultivace

- semi-statická kultivace
- Periodická výměna média
- Většina linií vyžaduje neustálý růst
 - nutnost **pasážování**
 - Udržení stabilních vlastností kultury
- Pasáž
 - Oplach buněk PBS
 - Trypsinizace
 - Inhibice trypsinu přidávkem média s FBS
 - Resuspendace
 - Rozdělení v pasážovém poměru (1:1-20)

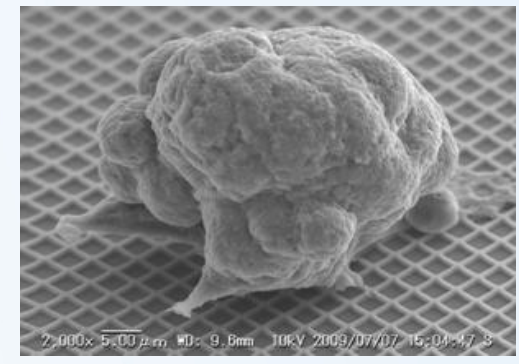
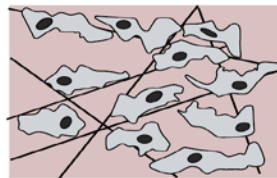
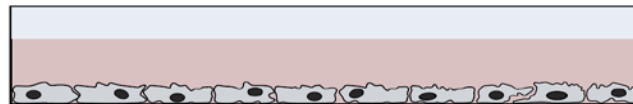
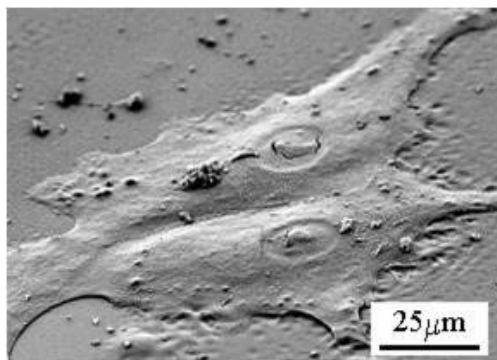


In vitro vs in vivo

In vitro	In vivo
Rychlá proliferace	Pomalá proliferace
Buněčná monokultura	Interakce různých typů buněk
Monovrstva buněk (2D)	3D struktura
Malý kontakt mezi buňkami/nepolarizované buňky	Silná interakce mezi buňkami/ funkční polarizace buněk
Semistatická kultivace	Průtoková kultivace
Umělý materiál	ECM
Vysoká koncentrace O ₂	Často hypoxické podmínky- gradienty

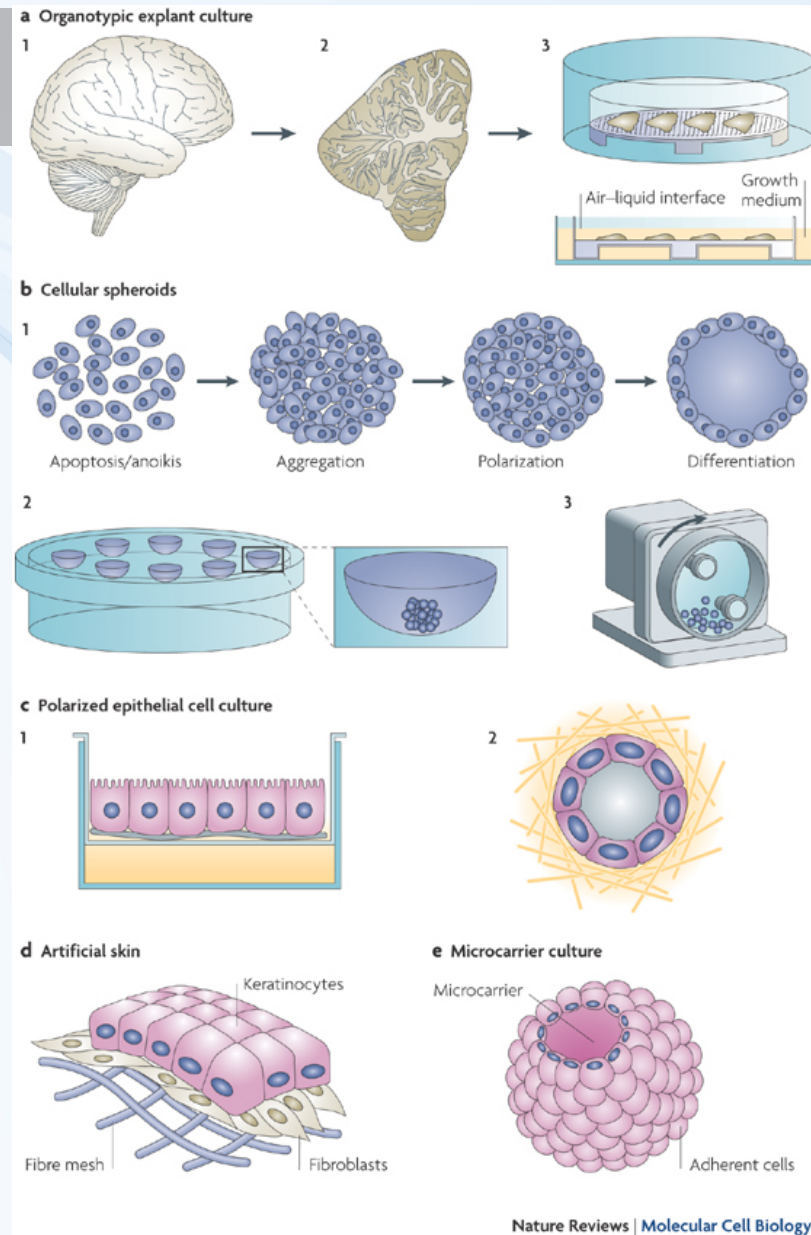
Vliv na fenotyp buněk :

změna diferenciacce, exprese genů, metabolismu, proliferace, viability



Moderní přístupy

- 3D kultivace
 - Kultivace v zavěšené kapce
 - Mikrogravitace
 - Funkční polarizace buněk
 - Různé druhy povrchů (kolagen, fibronectin, lamin, Matrigel)
 - Decelularizované orgány (srdce, játra)
 - Odmytí buněk detergentem, náhrada buněčnou kulturou
- Sferoidy/organoidy (shluky buněk)
 - Směs diferencovaných, progenitorových, dospělých kmenových buněk
 - Vliv gradientu kyslíku ve sferoidu
- Kultivace v hypoxických podmínkách
 - Inkubátory se řízenou hladinou kyslíku
- Mikrofluidní kultivace

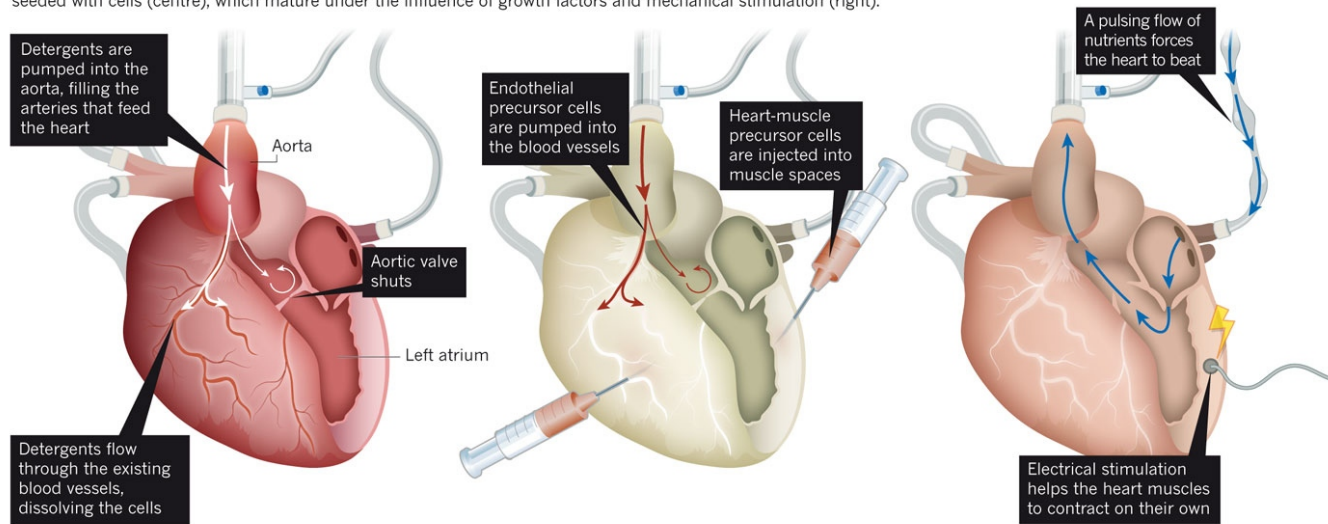


Decelularizace/recelularizace orgánů

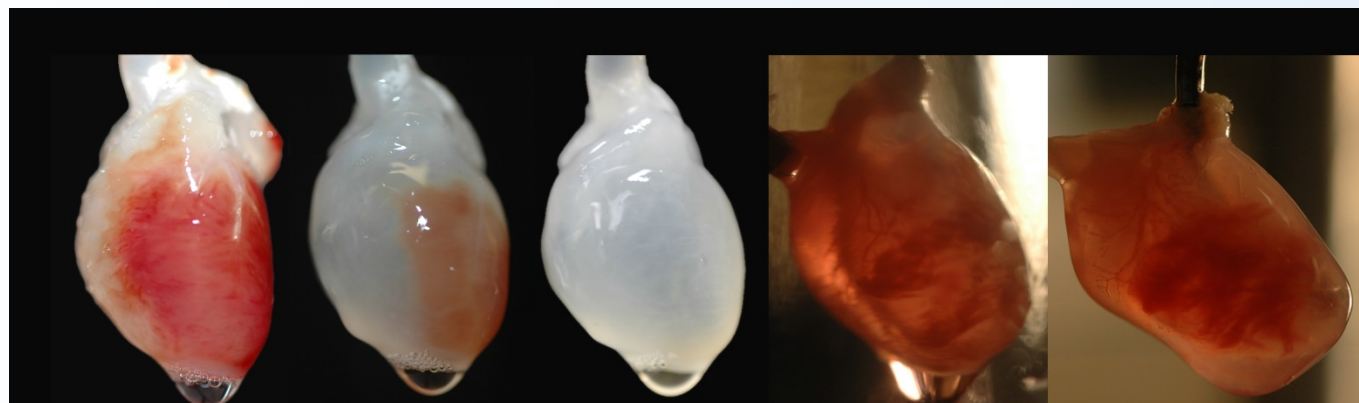
- Odmytí buněk detergentem
- „lešení“ orgánu
- Znovuosídlení lešení buněčnou kulturou (progenitory, kmenové buňky)
- Snaha vyvinout transplantovatelné orgány na míru

CUSTOMIZED ORGANS

To construct a new heart, researchers first remove all cells from a donor organ (left), leaving a protein scaffold. That is seeded with cells (centre), which mature under the influence of growth factors and mechanical stimulation (right).



Maher 2013 Nature

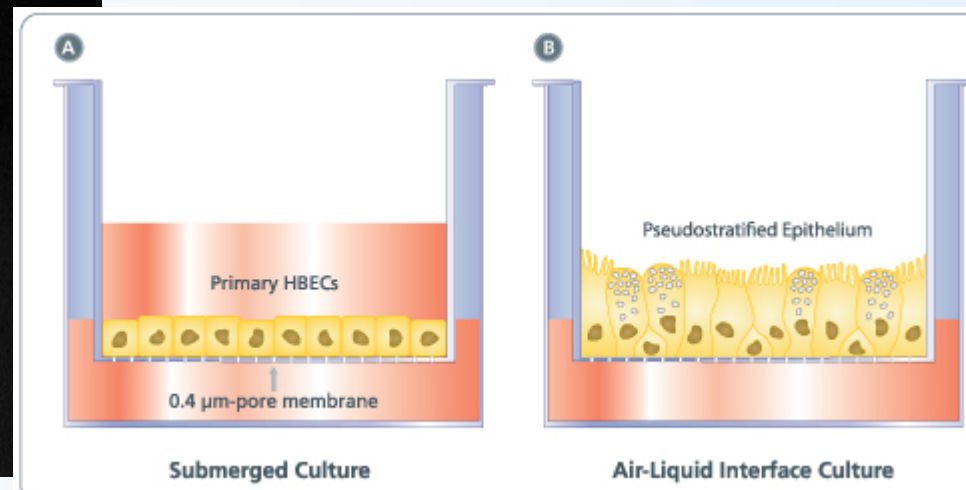
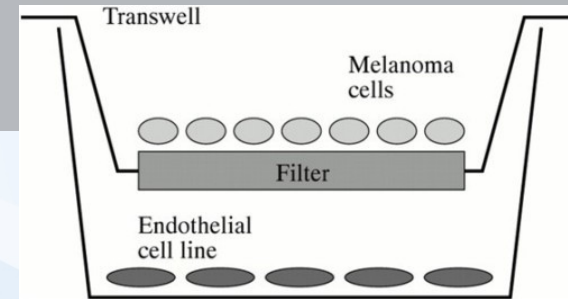


Rat Heart Decellularization (left three images), and during Recellularization (right).
Experiment and photos: November 2006. Thomas Matthiesen



Kultivační inzerty

- Plastové inzerty s propustnou membránou
- Směsná kultura více typů buněk
- nepřímý kontakt buněk
- Různá expozice shora a zdola → funkční polarizace buněk
- ALIC air-liquid interface cultivation (model plicní tkáně)



Uchovávání buněk

- V zamraženém stavu
 - $-70-80^{\circ}\text{C}$ – životnost týdny až měsíce
 - $<-150^{\circ}\text{C}$ v tekutém dusíku, životnost roky
- Kryoprotektans:
 - 5-10% sérum
 - 5-10% DMSO (koncentrace je pro buňky jedovatá!)



Kontaminace buněčné kultury

- Chemická- špatně detekovatelná, endotoxiny, plastifikátory, kovové ionty, zbytky desinfektans- často nenápadné účinky
- Biologická- infekce mykoplasmy, kvasinkami, bakteriemi, houbami, kros-kontaminace s jinou buněčnou linií

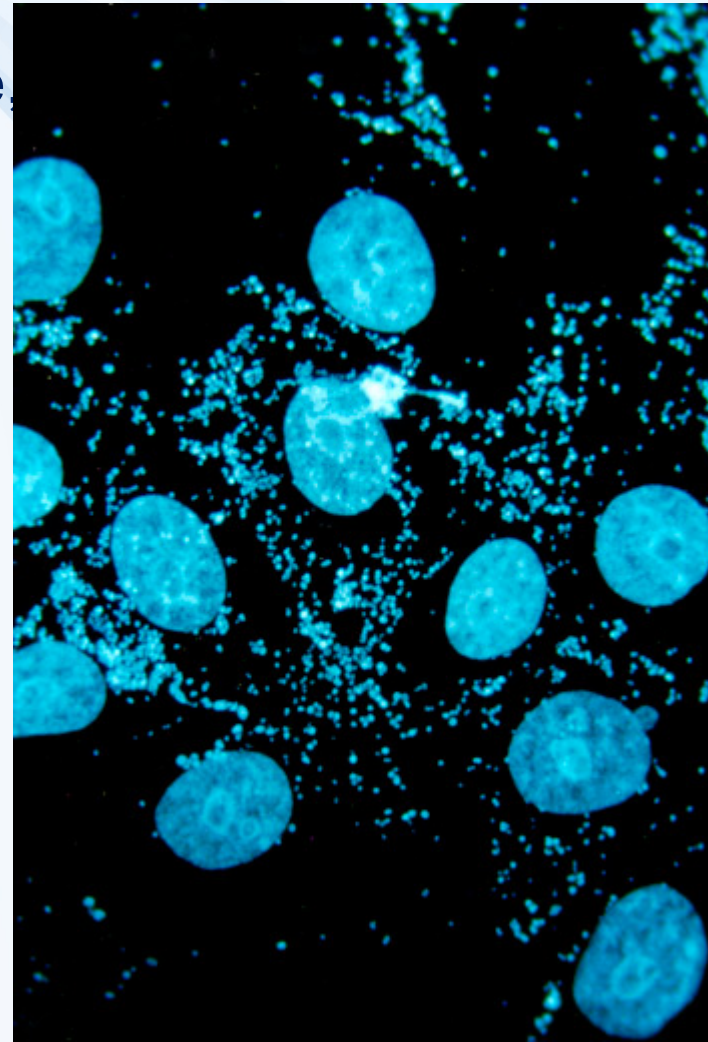
Účinky biologické kontaminace

- Kompetice o živiny
- pH- produkce kyselých nebo alkalických metabolitů
- Degradace argininu a purinu - ↓ syntéza histonů a DNA
- Produkce toxického peroxidu



Detekce kontaminace

- Většinou zakalení/změna barvy média
- Bakterie, kvasinky a houby jsou viditelné mikroskopem
- Změna charakteristik růstu (špatná adheze, pomalý růst, změna struktury cytoplasmy)
- Mycoplasmy- nitrobuněční paraziti
 - nejmenší živé organismy
 - proniknou běžnými ster. filtry
 - zdrojem kontaminace je člověk
 - detekce barvením DNA (DAPI, Hoechst 33258), EIA, PCR
- Nejlepší a nejstarší metoda je infikovanou kulturu vyhodit (pokud je za ni náhrada)



Použití antibiotik

Lépe kultivovat bez antibiotik (mohou ovlivnit fyziologii buněk) – náročné na sterilitu

- proti bakteriím, kvasinkám, plísním a mykoplazmatům

Vlastnosti vhodných antibiotik:

- nesmí inhibovat růst a ani ovlivňovat metabolismus b.
- musí ochraňovat po celou dobu experimentu
- netoxické a bezpečné pro uživatele
- kompatibilní s ostatními složkami média
- rozpustné v netoxických rozpouštědlech

Antibiotikum	likviduje
penicilin/streptomycin	G+, G-
Ampicilin	G+, G-
Amphotericin B	kvasinky, plísně
Gentamicin sulfát	G+, G-, mykoplazmy
Kanamycin sulfát	kvasinky, plísně
Tylosin sulfát	G+, mykoplazmy



Postup experimentu



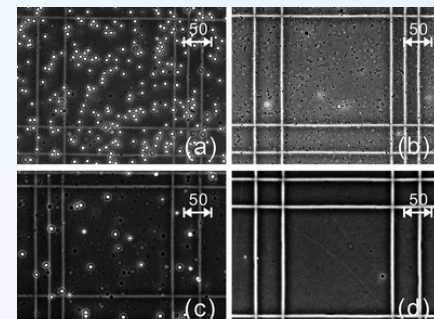
Kultivace — rutinní pasážování

Nasazení — příprava buněk na experimentální zásah, vysetí definovaného počtu b.

Expozice — experimentální zásah

Stanovení endpointu metody (detekce)

Vyhodnocení



Expozice

- Petriho misky – složité na manipulaci →
- Vícejamkové desky (6, 12, 24, 48, 96, 384, 864, 1536)
- **HTS – high throughput screening**
 - využíváné často ve farmakologii
 - Metody zvyšující efektivitu testování (až 100 000 látek denně)
 - Miniaturizace (mnohojamkové desky)
 - Robotizace/automatizace
 - Výsev desek
 - Příprava ředicích řad
 - Expozice
 - Měření
 - Metoda (assay)-
 - levná, miniaturizovatelná
 - nenáročná na manipulaci (přepipetování, oplachy)
 - Vysoký poměr signál/šum
 - Detekční koncovka
 - Fluorescence- vysoká citlivost, nízká cena, problém s autofluorescenčními vzorky
 - Luminiscence – vysoká citlivost, vyšší cena
 - Radiometody – extrémní citlivost, náročnost na vybavení a provedení, dlouhé měření. V HTS se moc nepoužívá pokud je alternativa



Microplates

Corning® 1536 Well Plates	Well Diameter (Bottom - mm)	Single Well Only			
		Approx. Growth Area (cm ²)	Average Cell Yield	Total Well Volume (μL)	Working Volume (μL)
Low volume	1.2	0.011	1.2 x 10 ³	2.3	1 – 1.5
Clear flat bottom	1.63 x 1.63*	0.025	2.5 x 10 ³	12.5	5 – 10
Solid flat bottom	1.53 x 1.53*	0.023	2.3 x 10 ³	12.5	5 – 10

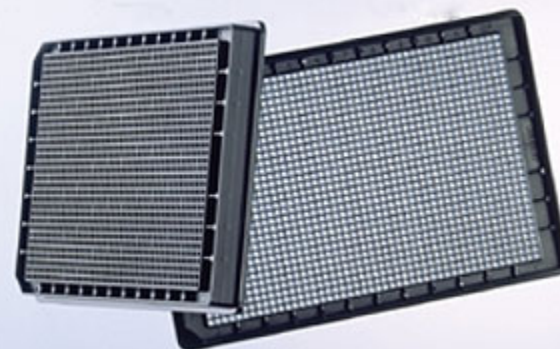
*These wells are square.

Corning 384 Well Plates	Well Diameter (Bottom - mm)	Single Well Only			
		Approx. Growth Area (cm ²)	Average Cell Yield	Total Well Volume (μL)	Working Volume (μL)
Standard	2.7 x 2.7*	0.056	5.6 x 10 ³	112	25 – 50
Low volume	2.0	0.031	3.1 x 10 ³	50	5 – 40

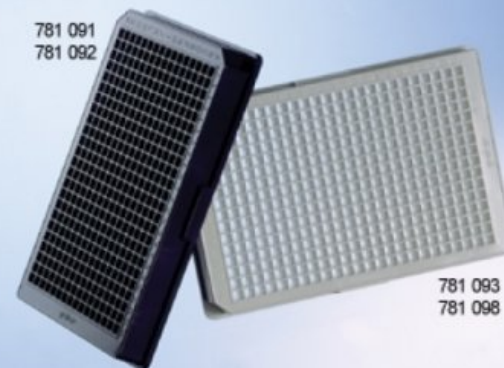
*These wells are square.

Corning 96 Well Plates	Well Diameter (Bottom - mm)	Single Well Only			
		Approx. Growth Area (cm ²)	Average Cell Yield	Total Well Volume (μL)	Working Volume (μL)
Flat bottom	6.4	0.32	3.2 x 10 ⁴	360	100 – 200
Round bottom	6.4	NA*	NA*	330	100 – 200
V bottom	6.4	0.38	3.8 x 10 ⁴	320	100 – 200
½ area	4.5	0.16	1.6 x 10 ⁴	190	50 – 100

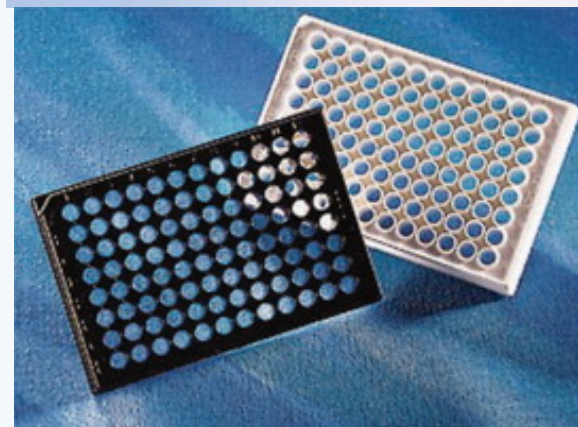
*Because these wells are round, the surface area available for cell attachment is dependent on the medium volume used.



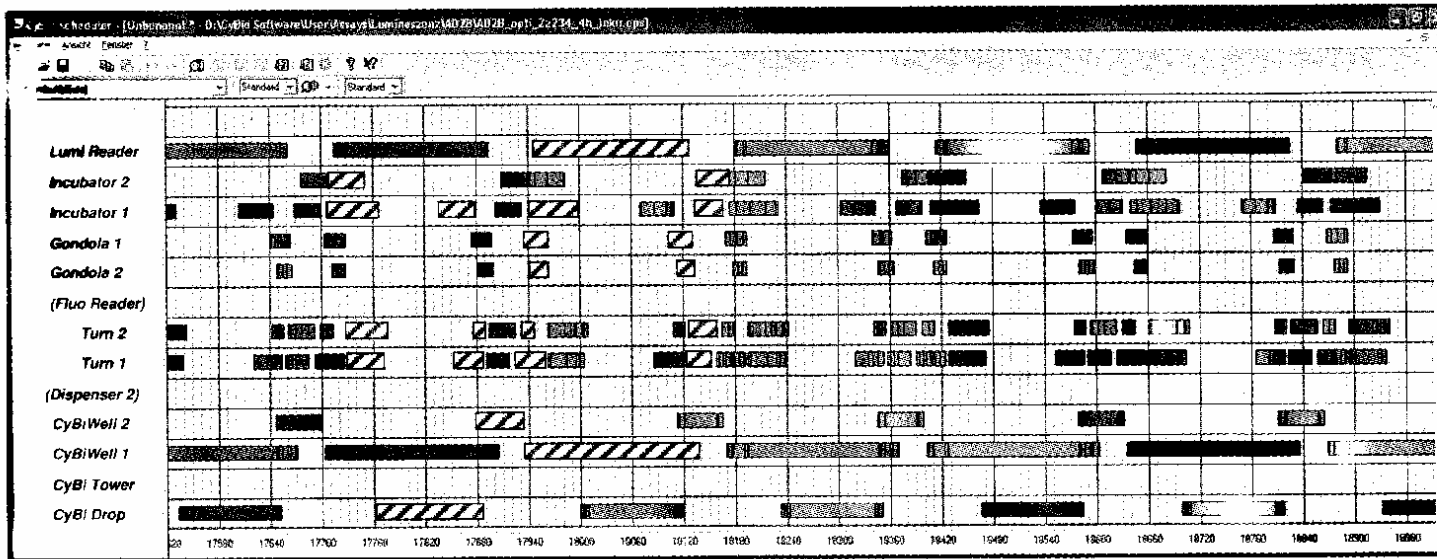
781 091
781 092



781 093
781 098



HTS



Compound Plate

- Get from Incubator 1
- Turn 1
- Fill w/ Buffer @ CyBi Drop
- Turn 1
- Transfer compounds @ CyBi Well 1
- Turn 1
- Store into Incubator 1

Test Plate

- Get from Incubator 2
- Turn 2
- Gondola 1
- Transfer compounds @ CyBi Well 1
- Gondola 1
- Turn 2
- Store into Incubator 2
- Get from Incubator 2
- Turn 2
- Aspirate Buffer @ CyBi Well 2
- Turn 2
- Gondola 2
- Measure Signal in Lumi Reader
- Discard Test Plate

1 cyklus -> 230s

Běh přes noc (16h):

-> 250 mikrodsek

-> 384 000 testů

Figure 2.5 Robotic realization of a reporter gene assay.

Mikrofluidní systém

Litograficky vytvořený miniaturizovaný bioreaktor

- fluidní kultivace/expozice

Materiál -poly-dimethylsiloxan (PDMS)

- Lab on chip / organ on chip
- organ on chip

Využitelný v HTS

<http://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/review-microfluidic-for-cell-biology>

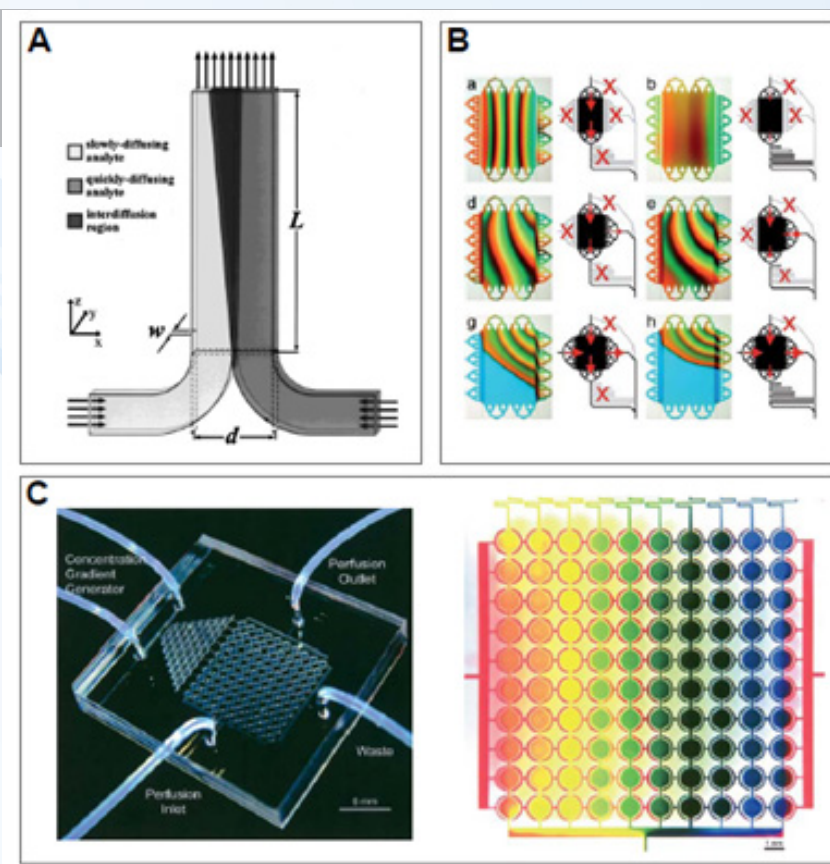


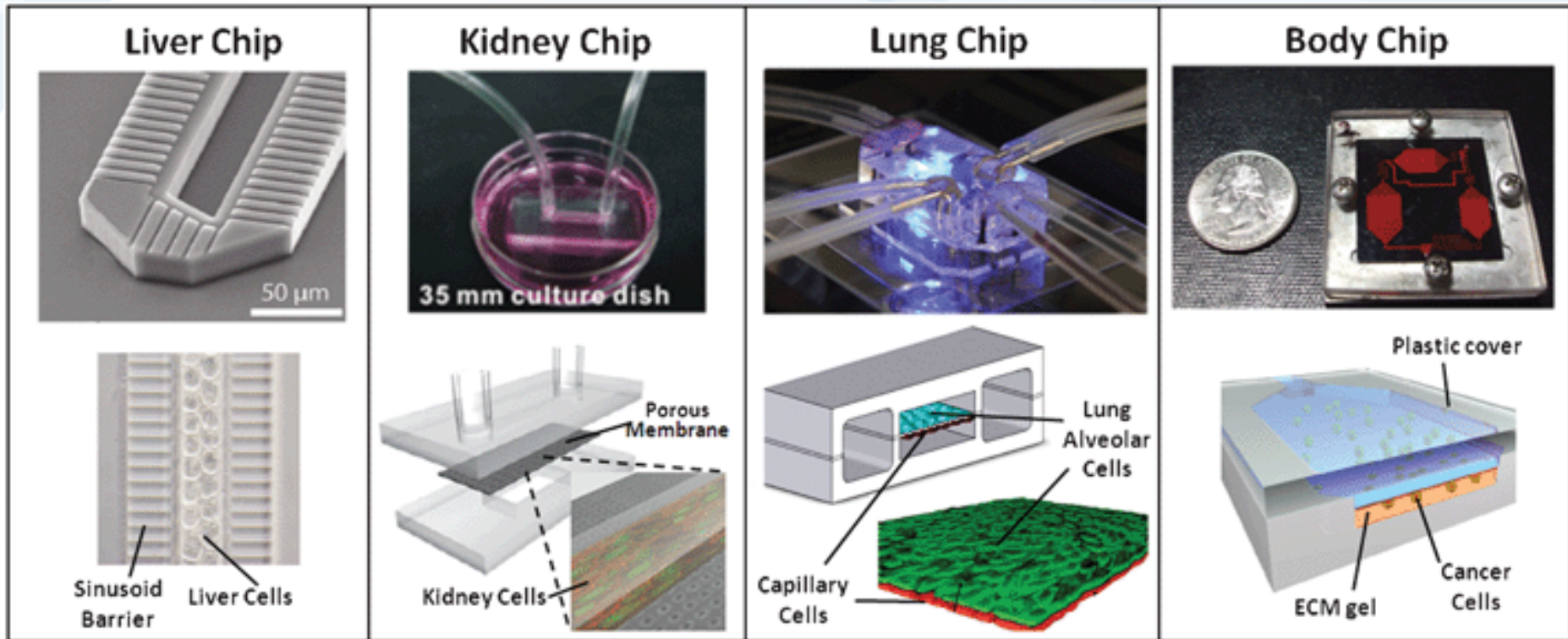
Table 1

Mehling and Tay 2014 Curr. Opin. Chem. Biol.

Basic requirements for cell culture, and improvements when microfluidic methods are used

Requirements	Conventional cell culture	Microfluidic cell culture
Control of temperature and gasses	Large fluid volumes prevent fast changes	Small volumes allow dynamic control
Addition of nutrients and removal of metabolites	Infrequent, manual exchange of large volumes	Precisely measured, continuous or transient exchange of media
Stimulation with drugs/proteins and simultaneous imaging	Mostly not feasible	Feasible
Parallelization of cellular assays	Not feasible	High capability for parallelization
Automation of cell culture tasks	Bulky, expensive fluid-handling robots must be used	High capability for automation in compact, inexpensive format
Single-cell manipulation and analysis	Manually involved, inaccurate, low throughput	Accurate and high-throughput

Mikrofluidní systém- organs on chip



(Huh et al. 2012 Lab Chip)



Mikrofluidní model člověka

