



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



9. gyakorlat: Rövid és hosszú távú sejtkultúrák, funkcionális tesztek

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Pécs, 2016.

Orvosi kutatások főbb lépcsőfokai



In vitro
kísérlet

Könnyen **standardizálható**
és reprodukálható



Nehéz belőle következtetni
az élőlényekben
végbemenő folyamatokról



In vivo
állatkísérlet

Élő szervezetben
modellezhető kórállapotok,
tesztelhetők gyógyszerek,
stb.



A nyert eredmények **nem**
feleltethetők meg az
emberi vizsgálatokkal



Humán vizsgálat

Orvosi szempontból a
leginkább releváns



Körülményes (pl. nehéz
mintát szerezni, etikai
megfontolások, stb.)

Sejt/szövet tenyésztés bevezető^[1.]

- Miért van rá szükség?
 - Kísérleti **állatok kímélése**, ha lehetséges.
 - Precízen **kontrollálható** kísérleti körülmények. (pl. sejtszám, médium, hőmérséklet, vizsgált anyag koncentrációja, inkubációs idők, stb.)

- Osztályozás:

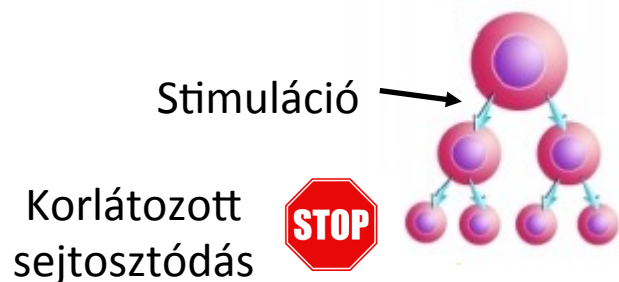


Sejtkultúra

vs.

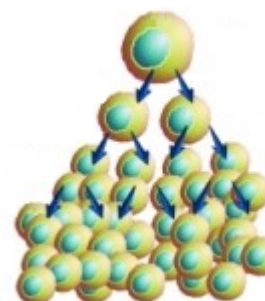


Szövet vagy szervkultúra



Rövid távú sejtkultúra (pl. normál sejtek biopsziából)

vs.



Korlátlan sejtosztódás

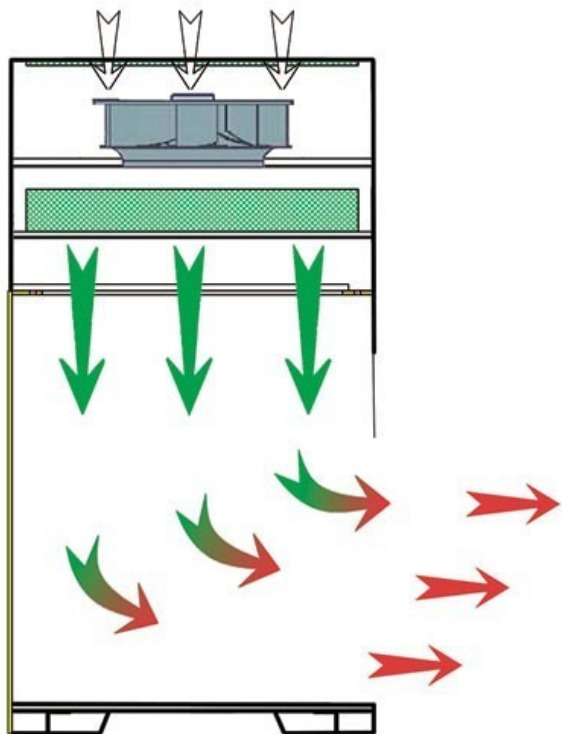
Hosszú távú sejtkultúra (pl. daganatos sejtvonal)

Sejttenyésztés

- A **teljes sterilitás** alapfeltétel! → Fertőzött sejtkultúra esetén kontrollálhatatlan a kísérlet.
 - Munka a sejttenyésztő fülke alatt
 - Steril eszközök használata (pl. pipettahegy, petri csésze, stb.)
 - Sejttenyésztő médiumok antibiotikus védelme
- A sejtek **sejttenyésztő médiumokban** tarthatók, melyek tartalmazzák a számukra szükséges **tápanyagokat** (szénhidrátok, aminosavak, nukleinsavak, vitaminok, hormonok, növekedési faktorok, stb.) és **optimális pH-val** rendelkeznek.
- A sejtek rövid távon **inkubátorokban** tárolhatók, ahol állandó a:
 - Hőmérséklet ($\approx 37\text{ °C}$)
 - Páratartalom ($\approx 90\%$)
 - CO₂ tartalom ($\approx 5\text{-}6\%$)
- Hosszú távú (évek, évtizedek) tárolás **folyékony nitrogénben** lehetséges. Klinikai felhasználás:
 - Ivarsejtek fagyasztása infertilitást okozó kemoterápiás kezelések előtt^[2.]
 - Köldökszínórvér fagyasztása (hemopoetikus őssejtekben gazdag, nem rutinszerű, jelenleg ellentmondásos módszer^[3, 4.])

Sejtenyésztő steril fülke

Lamináris áramlású fülkéknél a sterilitást a fülkén belül a steril levegő áramlása



A sémás ábrán látható fülke esetén a kintről beszívott levegő egy **HEPA szűrőn** (High Efficiency Particulate Air) halad át. A szűrt, steril levegő fentről lefelé áramlik, majd a fülke munkarésénél a fülkét használó személy irányába kifelé távozik. A pontos felépítés és elrendezés azonban gyártóként változik.

Gyakran használt médiumok



RPMI

(Roswell Park Memorial Institute)

Elsősorban **lymphoid sejtek** és **hybridómák** tenyésztésére használják.



DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

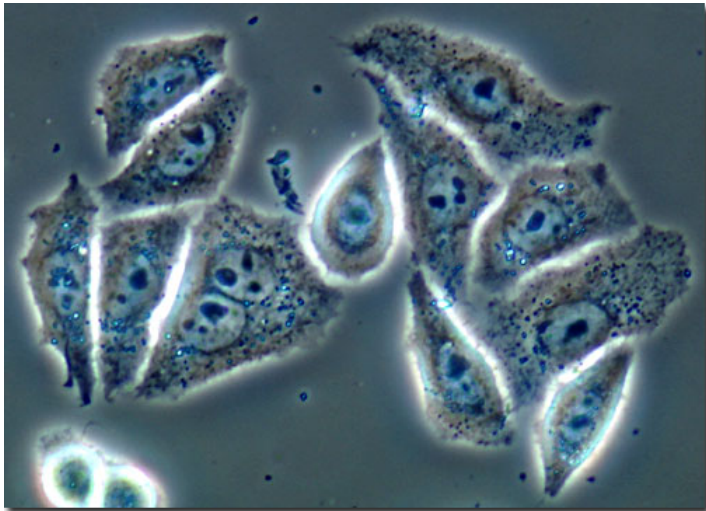
Általánosabban használt médium, **sokféle sejtípushoz** (fibroblast, izomsejt, gliasejt, neuron, stb.) használják.

Általában fenolvörös **indikátort** tartalmaznak → Elhasznált, savas médiumnál sárgára vált, alkalikus pH-n pedig lilás színű.

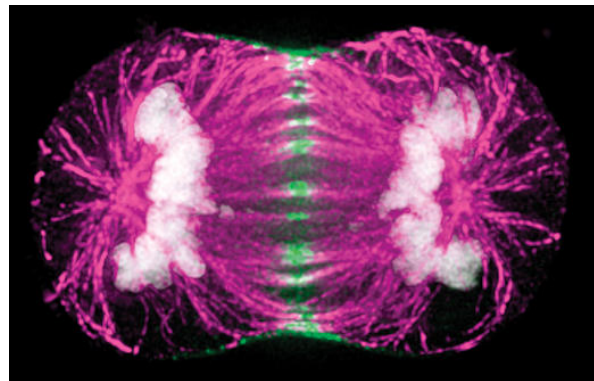
Sejtvonalak 1.

1. HeLA sejtvonal

- Az **első** daganatos sejtvonal 1951-ből.^[5.]
- Eredete: A 31 éves **Henrietta Lacks** méhnyakrákjából (cervix adenocarcinoma) izolálták, aki még abban az évben elhunyt.
- A sejtvonalat a tudta nélkül hozták létre, ez később etikai kérdéseket vetett fel, mikor a HeLa sejtek teljes genomját publikálták 2013-ban.^[6.]
- Mai napig az **egyik legelterjedtebb sejtvonal**, kiterjedten használják kutatásra.



HeLA sejtek



Osztódó HeLA sejt



Henrietta Lacks
(1920-1951)

Sejtvonalak 2.

2. Jurkat sejtek

- Tumoros T-sejtvonal, egy 14 éves akut lymphoblastos leukémiában (ALL) szenvedő beteg (JM) perifériás véréből izolálták a 70-es években.^[7.]
- T-sejt jelátvitel, a T-sejtes leukémia és a HIV fertőzés kutatására használják.

3. Raji sejtek

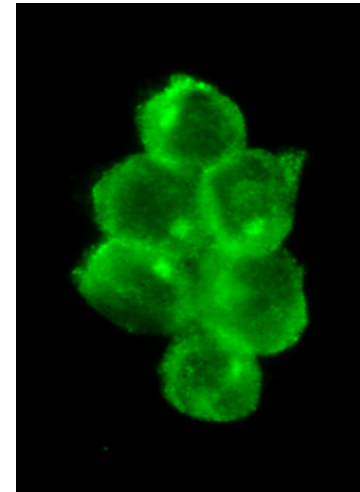
- Tumoros B-sejtvonal, egy 11 éves Burkitt-lymphomás betegből izolálták Nigériában 1963-ban.^[8.]
- EBV pozitív, a vírus integrálódott a genomba.^[9.]
- Transzfekciós kísérletek gyakori sejtvonala.

4. HepG2 sejtek

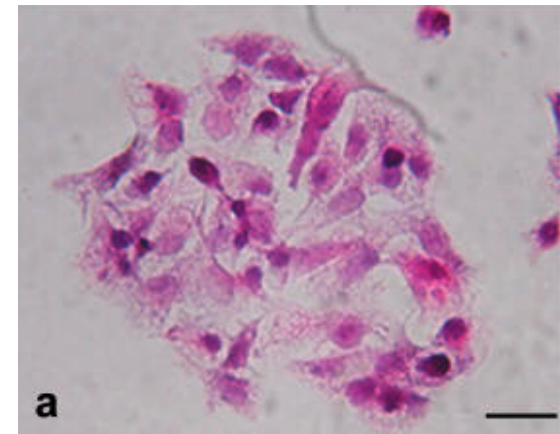
- Egy 15 éves beteg májrákjából (hepatocellularis carcinoma) származik.^[10.]

5. Sp2 sejtek

- Nem-szekretoros egér myeloma sejtvonal, hybridóma fúzióhoz használják.^[11.] → lásd 3. gyakorlat



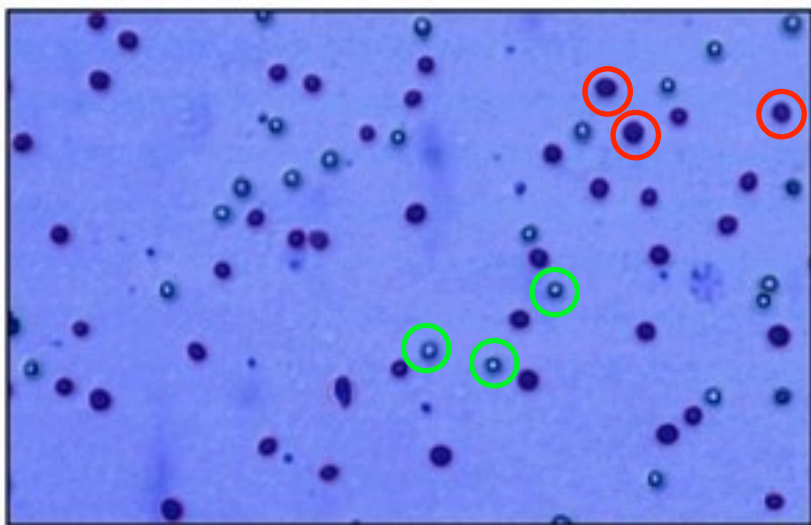
Összetapadt Jurkat sejtek



HepG2 sejtek

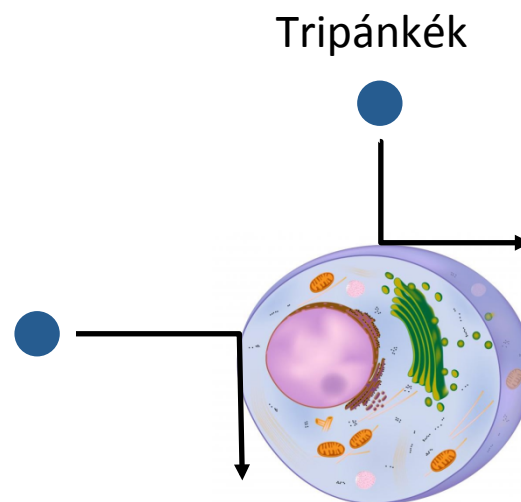
Sejt életképesség meghatározása

- A sejtek életképességét **festékkizárásos tesztekkel** szokták meghatározni, pl.:
 - **Tripánkék**
 - 7-amino-aktinomicin D
 - Propidium-jodid
- Lényeg: Az életképes sejtek aktív mechanizmusokkal igyekeznek kizárni ezeket a xenobiotikumokat. (pl. efflux)



Élő sejtek

Elpusztult sejtek

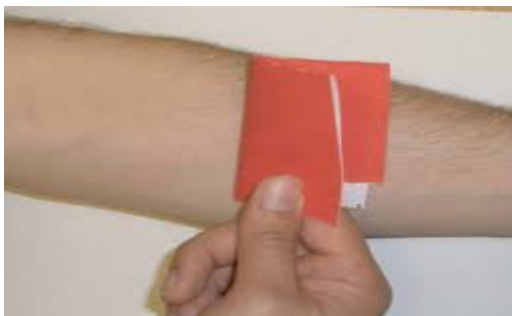


Élő sejt

Phagocyták funkcionális tesztjei

- **Izoláció:** Normálisan a sejtek kitapadnak az üveg vagy műanyag felületekhez.
- **Migráció:** Spontán vagy chemotaxissal irányított sejt migráció vizsgálata in vitro vagy in vivo. (pl. skin window teszt)
- **Phagocytosis** vizsgálata:
 - Nem-opszonizált
 - Opszonizált (pl. Fc receptoron vagy complement receptoron keresztül)
- **Oxidatív burst és phagocyta enzimek** vizsgálata:
 - Nitro-kék-tetrazólium (NBT) teszt, myeloperoxidáz (MPO) teszt, alkalikus foszfatáz teszt, lizozim teszt, stb.
- **Citokin termelés** vizsgálata:
 - ELISA, ELISPOT
 - CBA (Cytometric Bead Array): Multiplex áramlási citometriás mérés mikrogöngyök segítségével

Skin window teszt^[12.]



1. Az alkar voláris felszínén **eltávolítják a bőr felső rétegét.** (cél: látszódjanak a kapillárisok, de még ne vérezzen)



Skin window az alkaron

2. A képződött **sebre filter papírt tesznek**, a papír a vizsgálattól függően különböző anyagokat, **chemokineket** (pl. IL-8) tartalmazhat.
 3. A sérülés helyén a **sejtek kilépnek az érpályából** és a filter papírba vándorolnak.
 4. A papírt bizonyos idő elteltével eltávolítják, a sejteket üveglapra kenik és megvizsgálják a **sejtes összetételt.**
- Értelme: **Sejt migráció in vivo vizsgálata**, pl. egészséges önkéntesek összehasonlítása autoimmun betegekkel, stb.

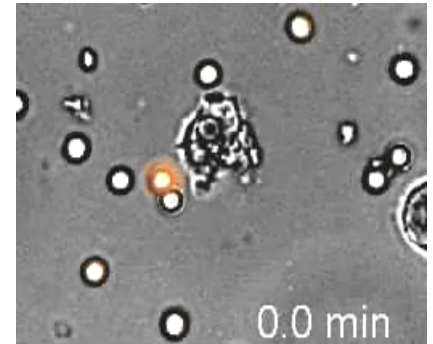


A beavatkozás nem hagy heget, a seb napokon belül gyógyul.

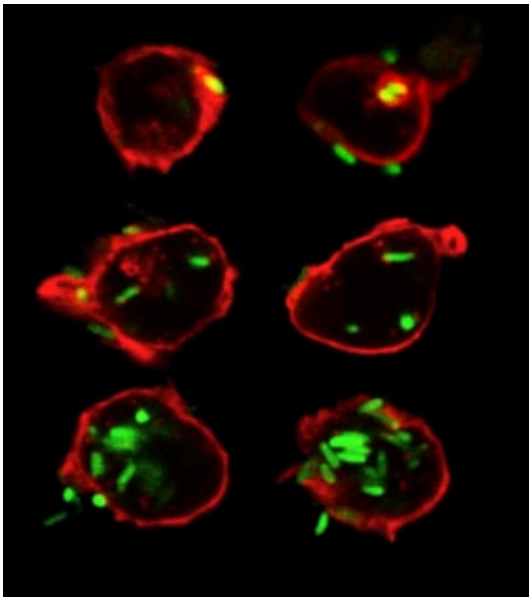
Phagocytosis teszt

Módszer:

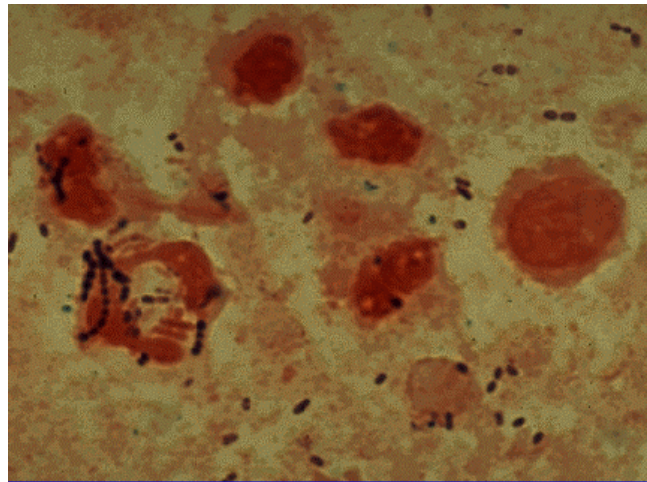
- **Jelölt partikulumokat** (pl. egész baktériumokat) inkubálnak együtt a phagocytáló sejtekkel.
- Értékelés **mikroszkóppal** vagy **áramlási citometriával** (utóbbi → 5. gyakorlat)



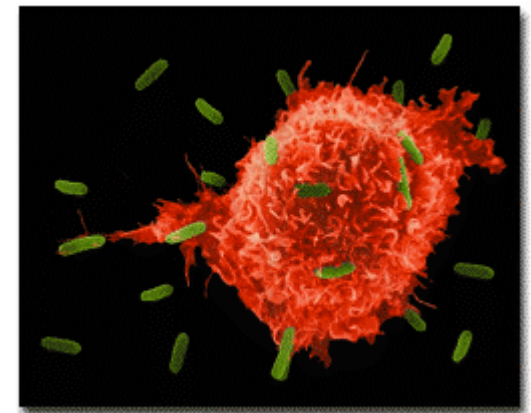
Videó: Egy neutrophil granulocyta phagocytál számos gomba konídiumot (=gomba spóra).



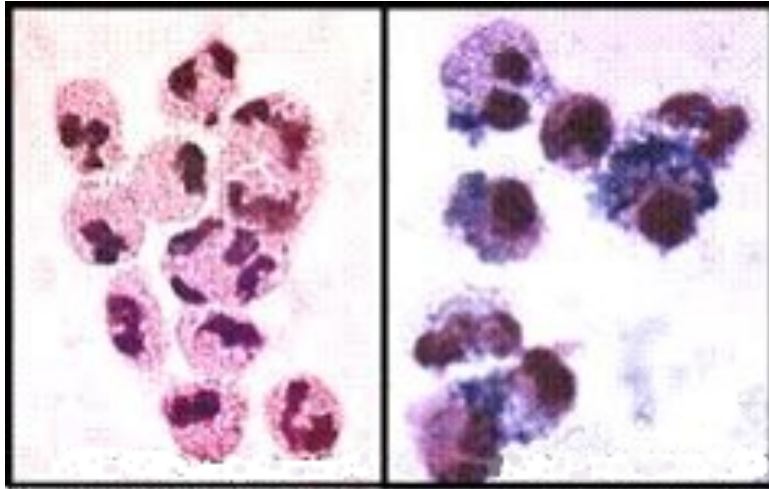
Phagocytosis fluoreszcens
mikroszkóppal vizsgálva



Phagocytosis
immunhisztokémiával vizsgálva

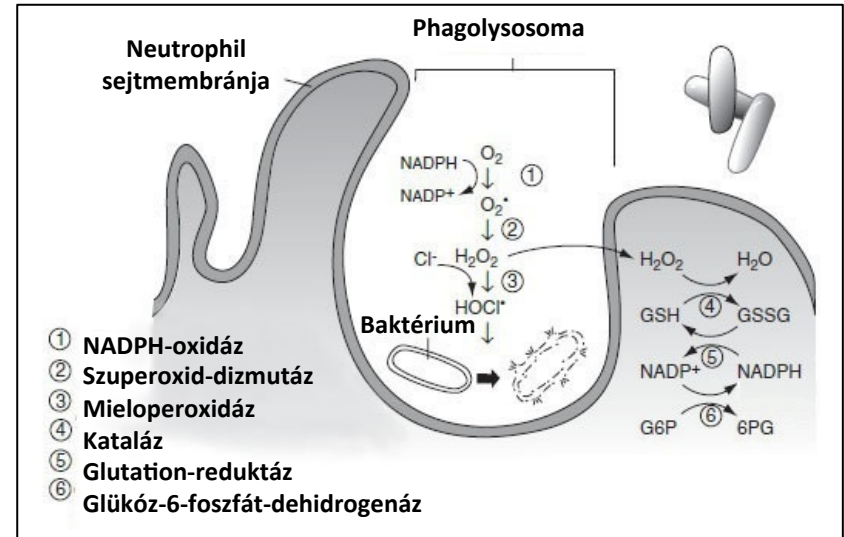


NBT teszt



CGD-s beteg

Normál kontroll



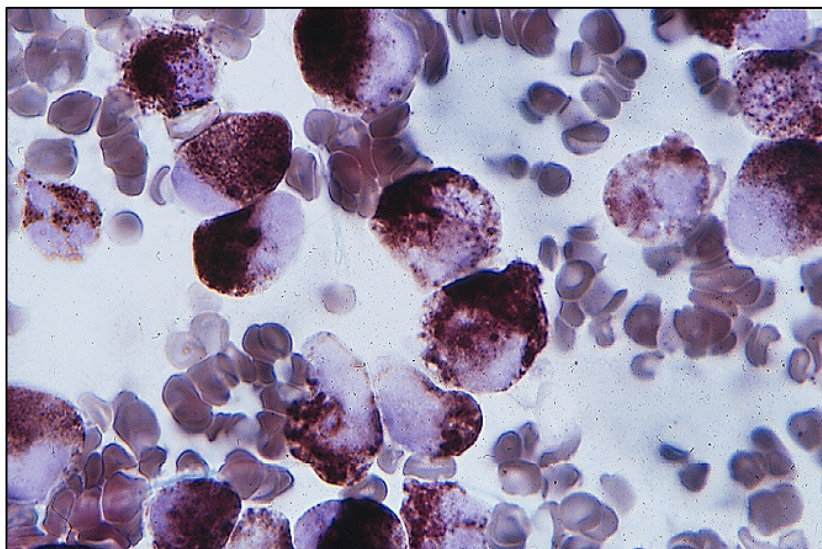
Lényege: A reaktív **szabadgyökök** redukálják a festéket, mely **kékes színt** ad.^[13.]

Krónikus granulomatózus betegség (CGD, chronic granulomatous disease)^[14.]:

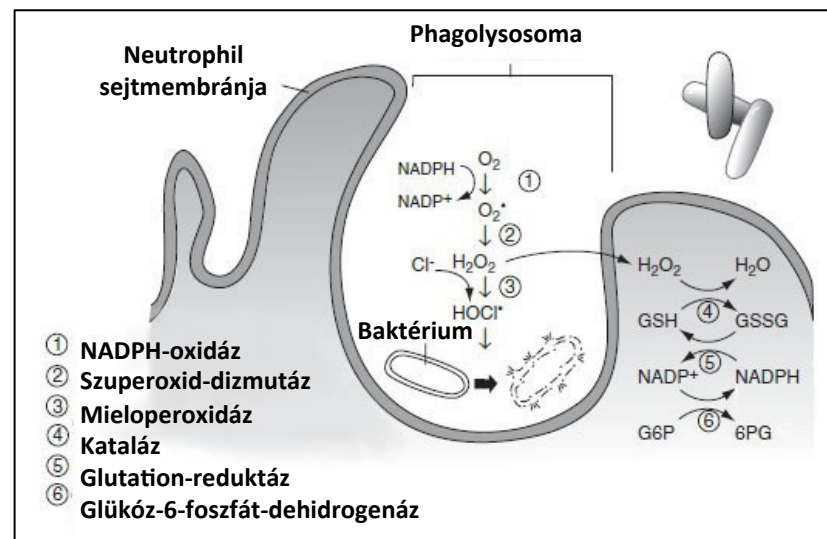
- Veleszületett **genetikai betegség**, leggyakrabban X-hez kötött recesszív.
- A veleszületett immunsejtek képtelenek reaktív oxigén szabadgyököket termelni. → Nem tudják elpusztítani a kórokozókat. → **Primer immunhiány**
- Visszatérő, elsősorban **bakteriális és gombás fertőzések** granulóma képződéssel gyermekkorban.

Myeloperoxidáz festés

- A myeloperoxidáz (MPO) a myeloid immunsejtek (főleg neutrophil granulocyták) egyik jellegzetes enzime, mely a szabadgyök termelésben játszik szerepet.
- Sejten belüli kimutatása **leukémiás betegségeken** lehet fontos, a sejtek myeloid eredetének igazolására használt marker.^[15, 16.]



Myeloperoxidáz kimutatása akut promyelocytás leukémiában (AML-M3 vagy APL)



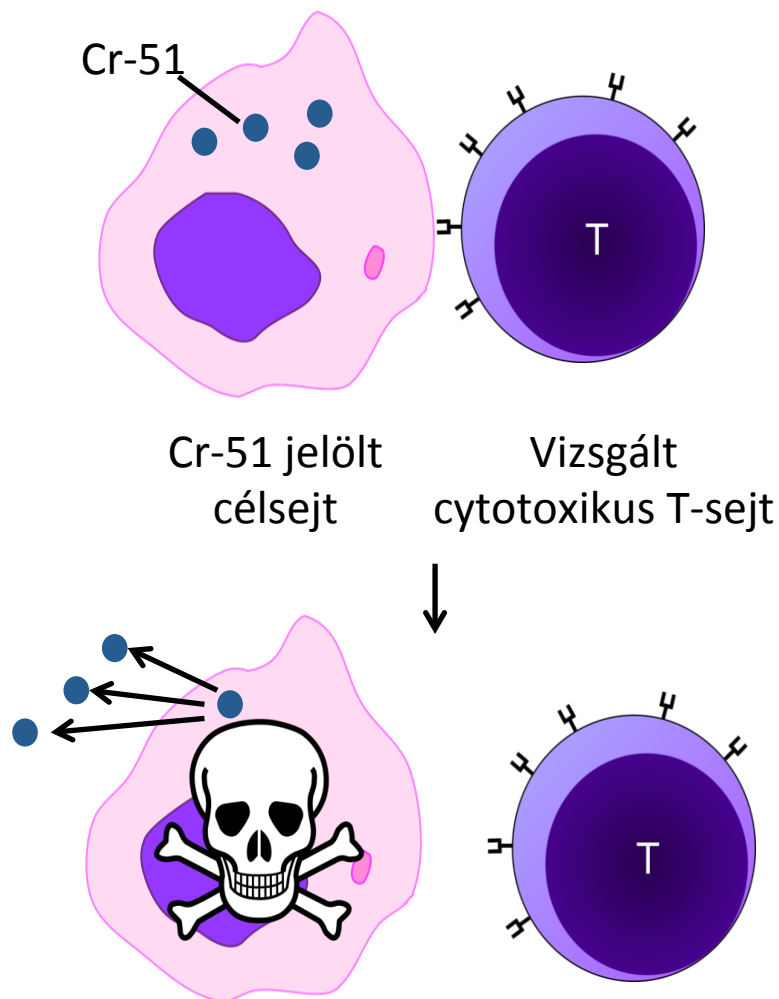
Lymphocyták funkcionális tesztjei

- **Lymphocyták polyclonalis aktivációja:**
 - Növényi lektinekkel, pl. fitohemagglutinin (PHA)
 - Bakteriális sejtfal komponensekkel, pl. lipopoliszacharid (LPS)
- **Cytotoxicitásának vizsgálata (T és NK sejtek):**
 - Cr-51 felszabadulás vizsgálata izotóp-jelölt célsejtek segítségével
 - Elpusztult célsejtek arányának áramlási citometriás meghatározása, pl. Annexin V vagy propidium-jodid festéssel^[17.]
- **B-sejtek funkcionális tesztjei:**
 - Immunglobulin termelés detektálása (immuncitokémia, ELISA)
 - Immunglobulin génátrendeződés vizsgálata PCR-al
 - Plaque forming cell assay (PFC) → Immunotoxicitás vizsgálatára használják
 - Passzív cutan anaphylaxia teszt
- **Kevert lymphocyta kultúra:**
 - Transzplantációk előtt az inkompatibilitás kizárására
- **Citokin termelés mérése:**
 - ELISA, ELISPOT
 - CBA (Cytometric Bead Array)

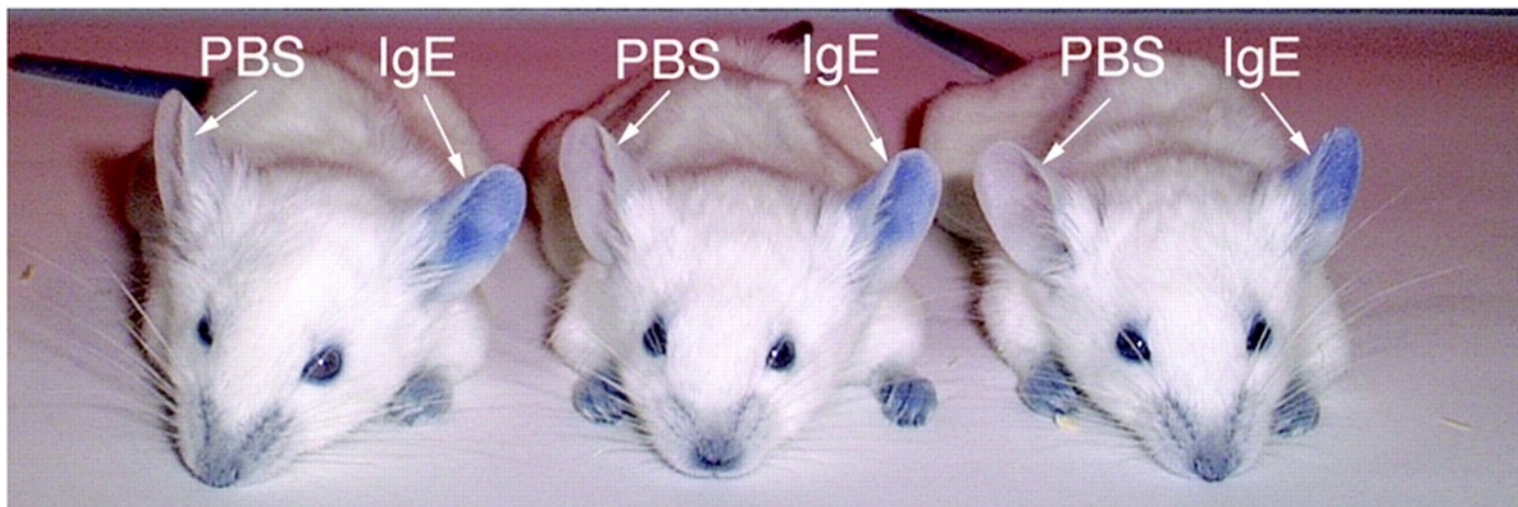
Króm-51 felszabadulás vizsgálata

Cytotoxikus sejtek (T, NK) **sejtpusztító képességének**^[18.] és az **ADCC**-nek^[19.] (antitest-dependens celluláris cytotoxicitás, lásd előadáson) a vizsgálatára alkalmas in vitro módszer, pl.:
Tumoros betegek cytotoxikus sejtjeinek vizsgálata tumorsejtek ellen.

1. Cr-51 jelölt célsejtekkel együtt inkubált Tc sejtek
2. Célsejt elpusztul, a króm felszabadul
3. Centrifugálás, a Tc-k és a sejttörmelék leülepednek a cső aljára
4. A felülúszó króm tartalmának mérése

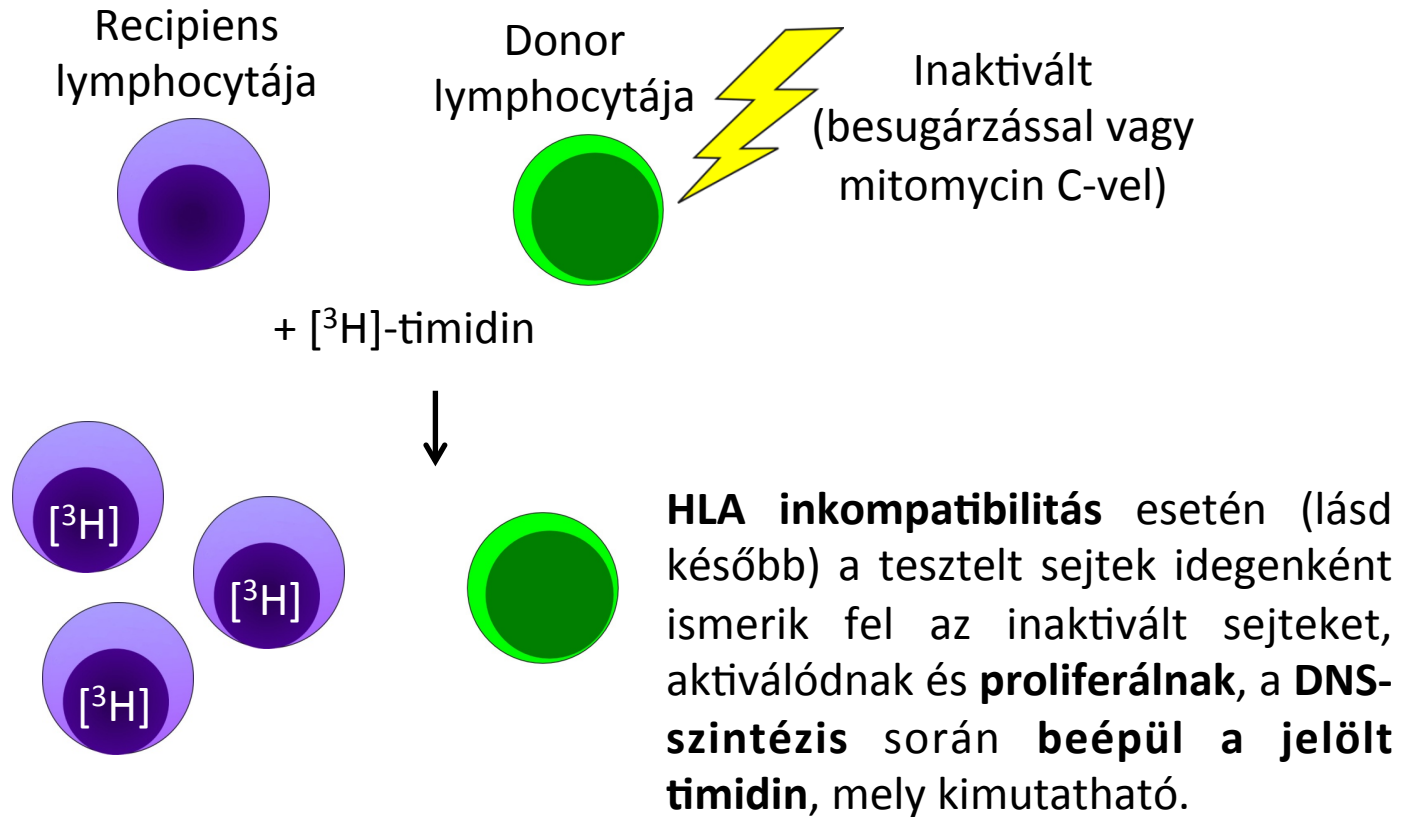


Passzív cutan anaphylaxia teszt (PCA)



A kísérleti állatba **intradermálisan antitestet** (általában IgE-t) injektálnak (pl. vizsgált alany szérumát). 24-48 órával később **antigén keveréket** adnak be **intravénásan** Evans kék **festékkel** együtt. Antigén-antitest kapcsolódás esetén a reakció helyén **fokozódik az érfal permeabilitása** és felhalmozódik a festék.^[20.]

Kevert lymphocyta kultúra (MLC)



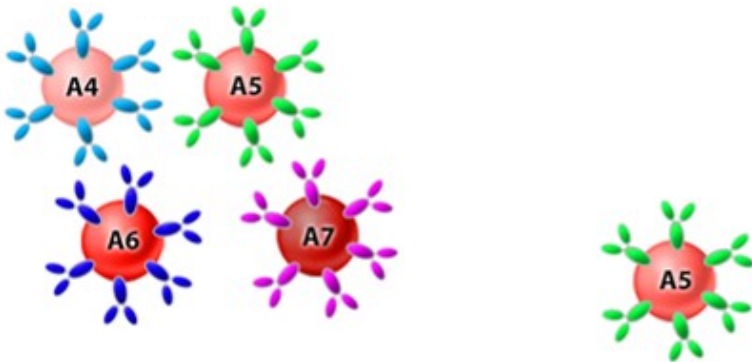
Felhasználás:

Transzplantációk előtt a donor és a recipiens immunológai inkompatibilitásának vizsgálata.^[21, 22.]

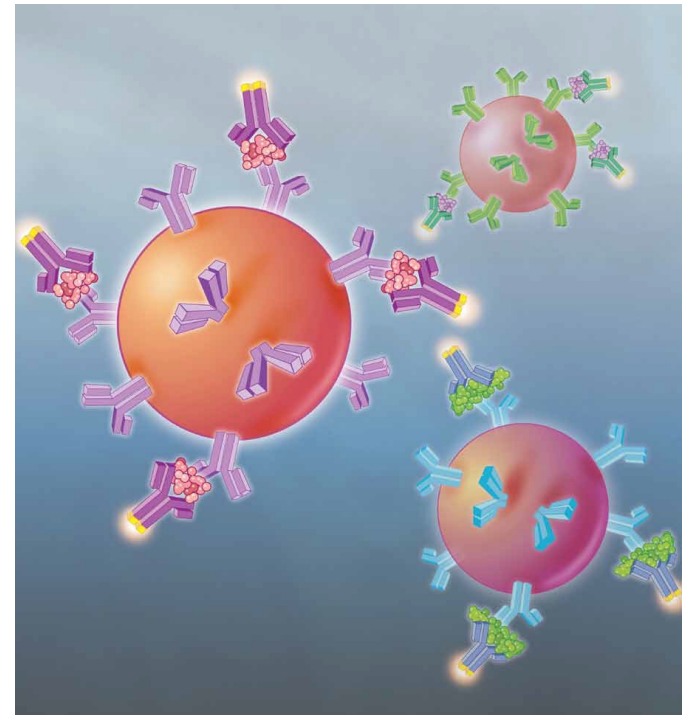
CBA (Cytometric Bead Array^[23.])

- **Áramlási citometriás** módszer → lásd 5. gyakorlat
- Lényege: Különböző, valamilyen paraméter (pl. méret, fluoreszcens festék) alapján megkülönböztethető **mikrogyöngyök** („bead” = gyöngy) felszínére célzottan köthetők ki molekulák (pl. DNS, fehérjék, köztük antitestek is)
- Haszna: **Több molekula vizsgálható egyetlen mintában** („multiplex mérés”), a vizsgálat pedig **kvantitatív!**

Gyöngy keverék:

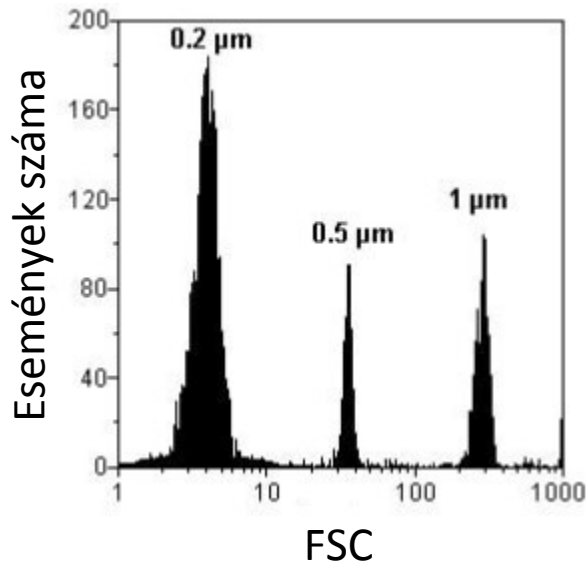


Méret vagy fluoreszcencia alapján
kiválasztott gyöngy vizsgálata
(kérdés: kötődött-e hozzá antigén?)

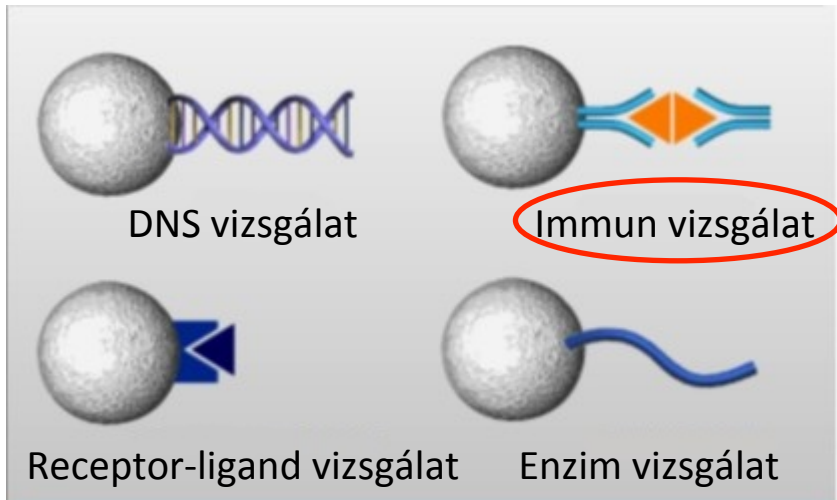
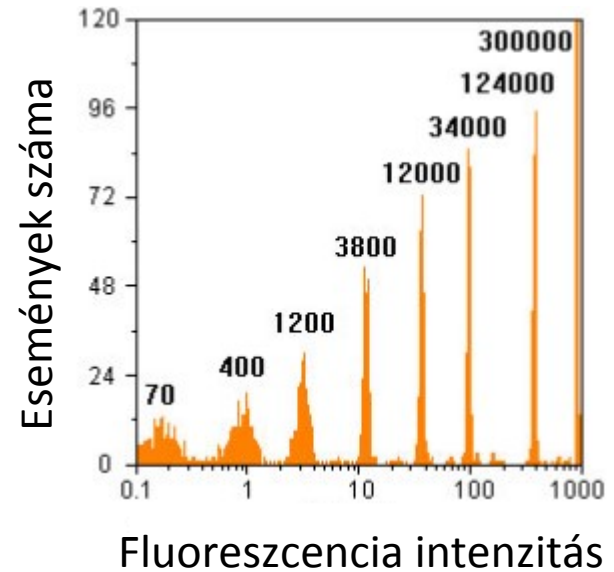


Gyöngyök jellemzői

Méret szerinti csoportosítás:

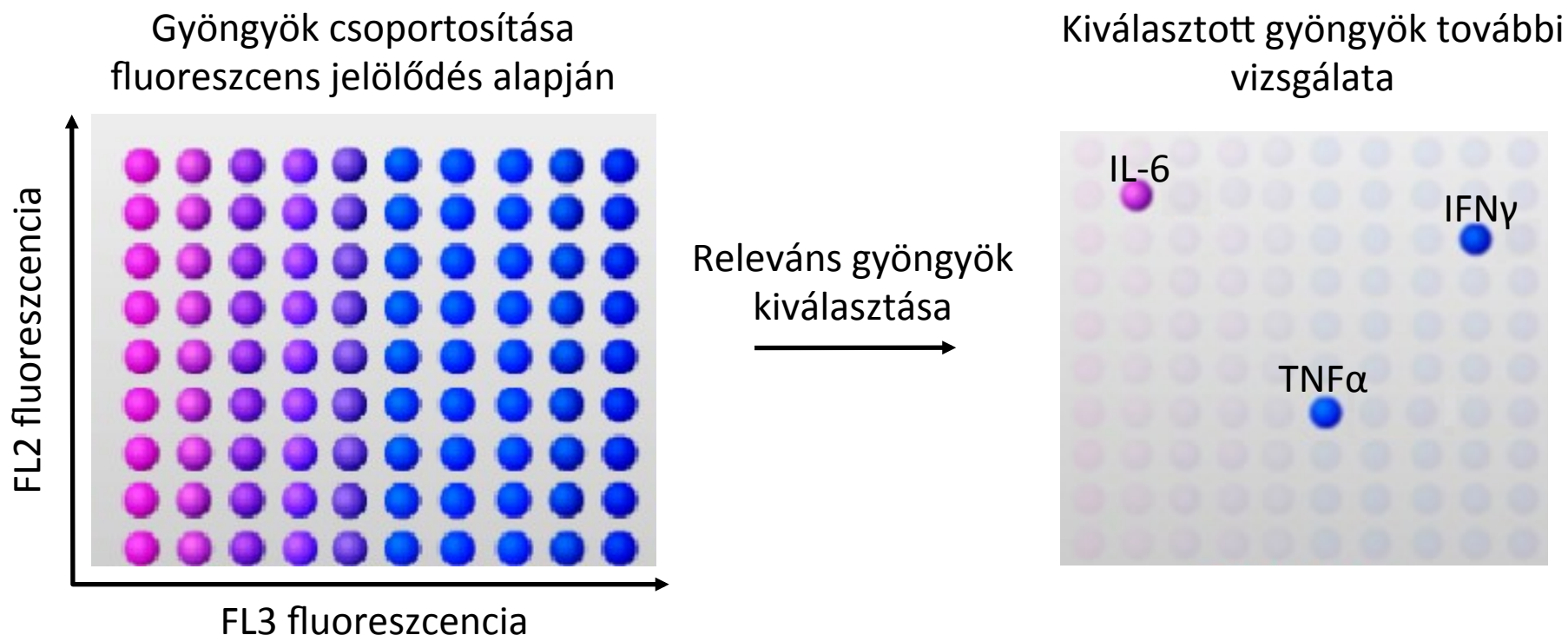


Fluoreszcencia szerinti csoportosítás:



Leggyakrabban különböző citokinek koncentrációinak meghatározására használják. [23, 24]

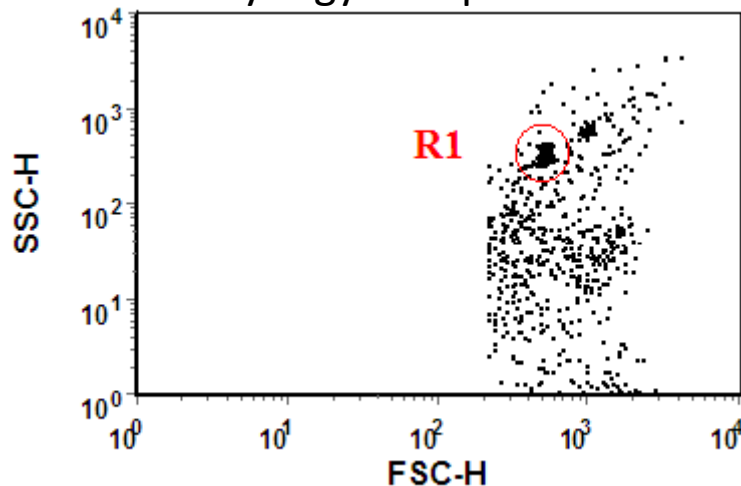
Luminex xMAP technológia^[25.]



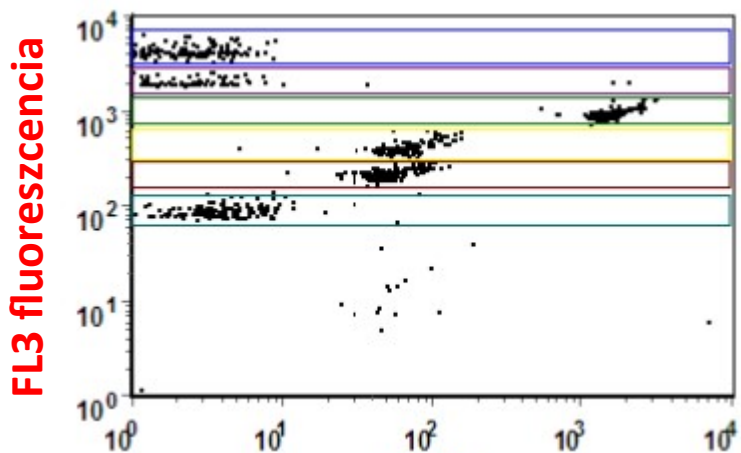
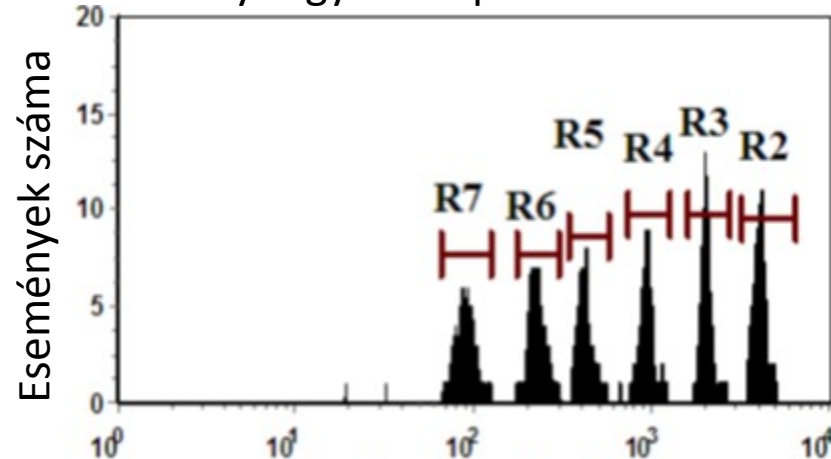
Lényeg: A gyöngyök mindegyike 2 festék kombinációját tartalmazza, azonban a kettő aránya mindegyik gyöngytípusban eltérő. Pl. az anti-IFN γ antitesttel konjugáltban több az FL3 jelet adó festék, mint az anti-IL-6 antitesttel konjugáltban. Ezzel a módszerrel elméletileg akár 100 különböző féle gyöngy is vizsgálható egyetlen mintában.

CBA analízis példa (citokin mérés)

Gyöngyök kapuzása:



Gyöngyök csoportosítása:



- | | | |
|-------------------|---|-----------------------|
| R2 = IL-8 | → | Negatív |
| R3 = IL-1 β | → | Negatív |
| R4 = IL-6 | → | Erősen pozitív |
| R5 = IL-10 | → | Pozitív |
| R6 = TNF α | → | Pozitív |
| R7 = IL-12p40 | → | Negatív |

Kvantitatív vizsgálat:

A pozitivitás mértéke is meghatározható!

Hivatkozások 1.

1. ThermoFischer Scientific: **Introduction to Cell Culture** (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>)
2. Jensen JR¹, Morbeck DE, Coddington CC 3rd: **Fertility preservation**. *Mayo Clin Proc*. 2011 Jan;86(1):45-9. doi: 10.4065/mcp.2010.0564.
3. Gluckman E¹: **Family-directed umbilical cord blood banking**. *Haematologica*. 2011 Nov;96(11):1700-7. doi: 10.3324/haematol.2011.047050. Epub 2011 Jul 12.
4. Roura S¹, et al.: **The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review**. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 2;6:123. doi: 10.1186/s13287-015-0113-2.
5. Lucey BP¹, Nelson-Rees WA, Hutchins GM: **Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination**. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Sep;133(9):1463-7. doi: 10.1043/1543-2165-133.9.1463.
6. Hudson KL¹, Collins FS: **Biospecimen policy: Family matters**. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):141-2. doi: 10.1038/500141a.
7. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G: **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma**. *Int J Cancer*. 1977 May 15;19(5):621-6.
8. Drexler HG¹, Minowada J: **History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines**. *Leuk Lymphoma*. 1998 Oct;31(3-4):305-16.
9. Anvret M, Karlsson A, Bjursell G: **Evidence for integrated EBV genomes in Raji cellular DNA**. *Nucleic Acids Res*. 1984 Jan 25;12(2):1149-61.
10. Aden DP, et al.: **Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line**. *Nature*. 1979 Dec 6;282(5739):615-6.

Hivatkozások 2.

11. Melixetian MB¹, et al.: **Mouse myeloma cell line Sp2/0 multidrug-resistant variant as parental cell line for hybridoma construction.** *Hybrid Hybridomics*. 2003 Oct;22(5):321-7.
12. Marks DJ¹, et al.: **Modified skin window technique for the extended characterisation of acute inflammation in humans.** *Inflamm Res*. 2007 Apr;56(4):168-74.
13. Freeman R, King B: **Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test.** *J Clin Pathol*. 1972 Oct;25(10):912-4.
14. Song E¹, et al.: **Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications.** *Clin Mol Allergy*. 2011 May 31;9(1):10. doi: 10.1186/1476-7961-9-10.
15. Gluzman DF¹, et al.: **Immunocytochemical markers in acute leukaemias diagnosis.** *Exp Oncol*. 2010 Sep;32(3):195-9.
16. van den Ancker W¹, et al.: **A threshold of 10% for myeloperoxidase by flow cytometry is valid to classify acute leukemia of ambiguous and myeloid origin.** *Cytometry B Clin Cytom*. 2013 Mar;84(2):114-8. doi: 10.1002/cyto.b.21072. Epub 2013 Jan 16.
17. Zaritskaya L¹, et al.: **New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity.** *Expert Rev Vaccines*. 2010 Jun;9(6):601-16. doi: 10.1586/erv.10.49.
18. Brunner KT, et al.: **Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.** *Immunology*. 1968 Feb;14(2):181-96.
19. Nelson DL¹, Kurman CC, Serbousek DE: **51Cr release assay of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).** *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 7:Unit 7.27. doi: 10.1002/0471142735.im0727s08.
20. Poulsen OM, Hau J: **Murine passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) for the 'all or none' determination of allergenicity of bovine whey proteins and peptides.** *Clin Allergy*. 1987 Jan;17(1):75-83.

Hivatkozások 3.

21. Cerilli J, et al.: **The significance of mixed lymphocyte culture in related renal transplantation.** *Surgery*. 1980 Nov;88(5):631-5.
22. Mickelson EM¹, et al.: **Evaluation of the mixed lymphocyte culture (MLC) assay as a method for selecting unrelated donors for marrow transplantation.** *Tissue Antigens*. 1996 Jan;47(1):27-36.
23. Moncunill G¹, Campo JJ, Dobaño C: **Quantification of multiple cytokines and chemokines using cytometric bead arrays.** *Methods Mol Biol*. 2014;1172:65-86. doi: 10.1007/978-1-4939-0928-5_6.
24. Prabhakar U¹, et al.: **Multiplexed cytokine sandwich immunoassays: clinical applications.** *Methods Mol Med*. 2005;114:223-32.
25. Zhang Y¹, Birru R, Di YP: **Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system.** *Methods Mol Biol*. 2014;1105:43-57. doi: 10.1007/978-1-62703-739-6_4.