

«Клеточная инженерия»

Курс лекций кафедры фундаментальной медицины и биологии ВолгГМУ
для студентов медико-биологического факультета

Кость



Натуральный
киллер
НК клетка



T лимфоцит

Нейтрофил



Базофил

Прогениторная
клетка
лимфоидного



Тема лекции:

Введение в предмет «Клеточная инженерия».



Биотехнология

Биотехнология – использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток, и тканей растений и животных с заданными свойствами

Клеточная инженерия	Культивирование клеток и тканей высших организмов
Генная инженерия	Изменение генотипа путем встраивания/исключения определенных генов
Инженерная энзимология	Использование ферментов микробного, растительного и животного происхождения в биохимических процессах
Микробиологическая промышленность	Производство биологически активных веществ
Экологическая инженерия	Использование биофильтров на очистных сооружениях

Клеточная инженерия

Клеточная инженерия – методика конструирования клеток нового типа на основе культивирования, гибридизации и реконструкции.

Культивирование клеток – процесс, посредством которого отдельные клетки (или единственная клетка) прокариот и эукариот искусственно выращиваются в контролируемых условиях.

Основой клеточной инженерии является **гибридизация соматических клеток** – слияние неполовых клеток с образованием единого целого.

Задачи клеточной инженерии

Получение и применение культур клеток животных, человека, растений и бактерий для культивирования вирусов с целью создания вакцин, сывороток, диагностических препаратов.

Культивирование культур клеток для получения биологически активных веществ.

Получение моноклональных антител для использования в медицине и ветеринарии.

Генно-инженерные манипуляции с клетками для получения новых форм, новых культур клеток, биопрепаратов и др.

Методы клеточной инженерии

Культивирование и клонирование клеток на специально подобранных средах

Гибридизация клеток

Пересадка клеточных ядер

Манипуляции по «разборке» и «сборке» (реконструкции) жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов

**Основой клеточной инженерии является
*гибридизация соматических клеток***

- Слиянию клеток предшествует установление тесного контакта между плазматическими мембранами. Этому препятствует наличие поверхностного заряда на природных мембранах, обусловленного отрицательно заряженными группами белков и липидов.
- Деполяризация мембран переменным электрическим или магнитным полем, нейтрализация отрицательного заряда мембран с помощью катионов способствует слиянию клеток.
- На практике широко используются ионами Ca^{2+} , **хлорпромазион**. Эффективным «сливающим» (фузогенным) агентом служит **полиэтиленгликоль**.

По отношению к животным клеткам применяют также **вирус Сендай**, действие которого как сливающего агента связано с частичным гидролизом белков цитоплазматической мембраны.

Этапы получения гибридных клеток

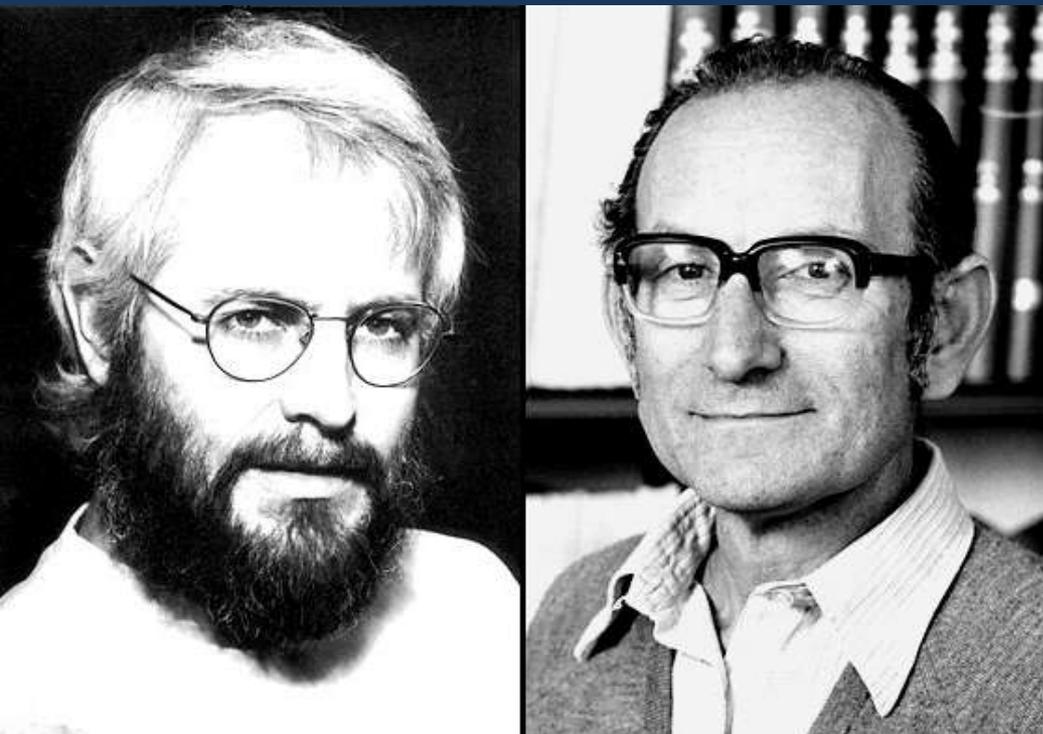
Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки, при этом получают **протопласты**.

Клеточную стенку подвергают ферментативному гидролизу, применяя:

- ✓ **лизоцим** (для бактериальных клеток),
- ✓ **зимолиазу** улитки (для клеток грибов),
- ✓ **комплекс циллюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ**, продуцируемый грибами (для клеток растений).

Набухание и последующее разрушение протопластов предотвращается созданием повышенной осмолярности среды.

Гибридная технология



Георг Кёлер и Сезар Мильштейн в 1975 году предложили **гибридную технологию**.

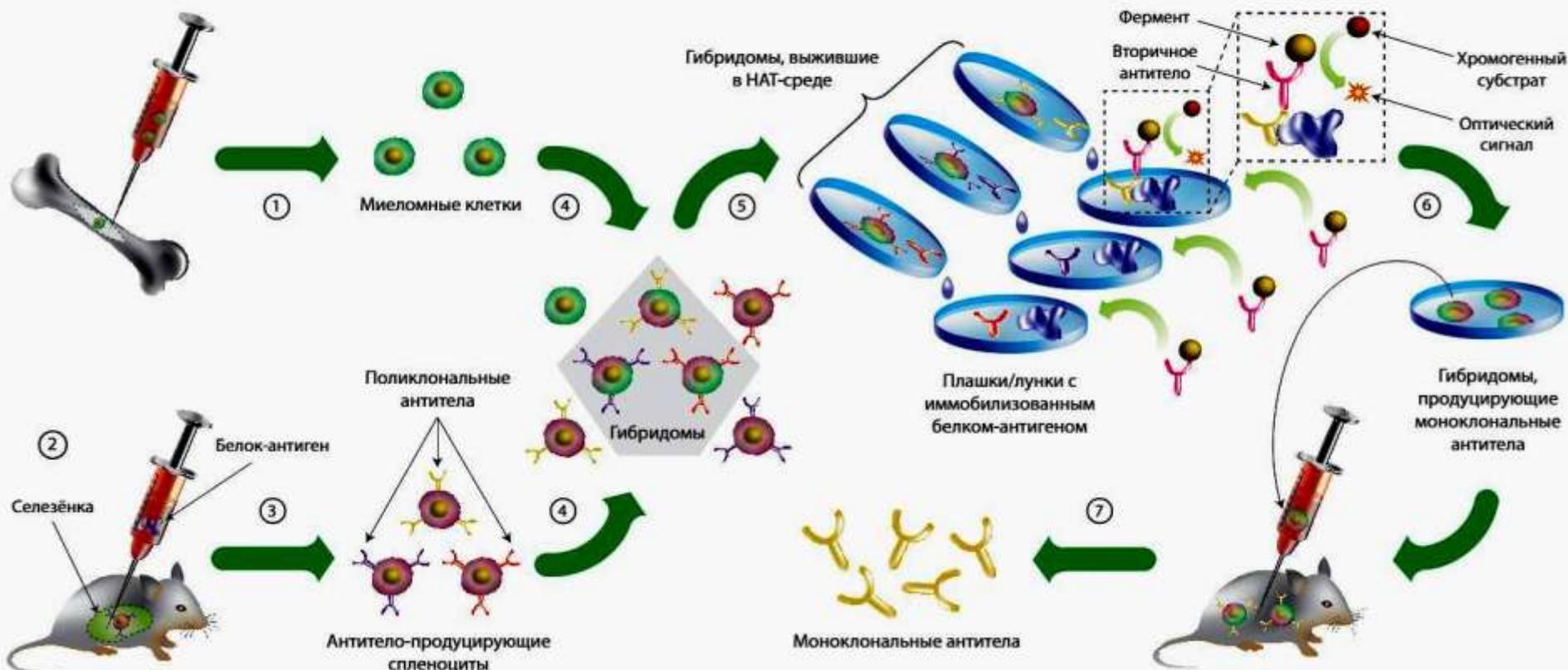
Эта методика впервые позволила получить антитела с заданной специфичностью и предсказуемым сродством к мишени — **моноклональные антитела (МкАТ)**

Предпосылками для создания гибридной технологии были ранее разработанные методы:

- получение миелом и адаптация их культивирования вне организма;
- соматическая гибридизация;
- получение селективных культуральных сред.

Гибридная технология

- | | | | |
|--|--|--|---|
| ① Культивирование клеток миеломы | ③ Выделение спленоцитов из селезёнки | ⑤ Культивирование гибридом в НАТ-среде | ⑦ Размножение гибридом <i>in vivo</i> и выделение антител |
| ② Иммунизация животного белком-антигеном | ④ Слияние спленоцитов с клетками миеломы | ⑥ Скрининг клеточных линий | |



Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

1. Селекция миеломных клеток

Клетки миеломы (плазмоцитомы) – это злокачественные трансформированные лимфоидные клетки костного мозга, представляющие собой клоны, образованные при делении единичных измененных опухолевых В-клеток, каждая из которых синтезирует моноклональные антитела неизвестной специфичности и обладает способностью к неограниченному размножению *in vivo* и *in vitro*.

✓ Плазмоциты должны иметь устойчивость к 8-азогуанину и бромдезоксиуридину – токсичным аналогам азотистых оснований, входящих в состав ДНК.

✓ Устойчивость обусловлена неспособностью клетки синтезировать ферменты гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (ГГФРТ) и тимидинкиназу (ТК), которые участвуют в процессах включения пуринов и пиримидинов в синтез нуклеиновых кислот по резервному пути биосинтеза в клетках млекопитающих.

✓ ГГФРТ участвует в синтезе пуринов, а ТК – пиримидинов при наличии соответствующих предшественников (гипоксантина и тимидина).

Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

1. Селекция миеломных клеток

Принципы культивирования миеломных линий:

1. Миеломная линия, предварительно проверенная на способность к слиянию, должна быть размножена и заморожена в достаточном количестве;
2. После разморозки клетки можно вести в культуре не более одного месяца;
3. Для слияния берут миеломные клетки в логарифмической фазе роста, для этого в культуру через день добавляют свежую среду; до момента слияния клетки должны находиться в этой фазе, по крайней мере, одну неделю;
4. Концентрация клеток в культуре не должна превышать 0,5 – 1,0 млн./мл;
5. Культуру клеток необходимо ввести в культуральную среду, к которой она адаптирована; перевод культуры в другую среду проводят постепенно;
6. Периодически целесообразно культивировать миелому в присутствии токсического аналога нуклеотидов, использованного для селекции данной линии, чтобы избежать перерастания ревертантов;
7. Если миеломная линия потеряла способность к слиянию, размораживают новые ампулы, хранящиеся в жидком азоте.

Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

2. Иммунизация мышей антигеном

Схемы иммунизации, применяемые разными исследователями, значительно варьируются и определяются имеющимся типом и количеством антигена. Иммунизация должна стимулировать формирование иммунного ответа и выраженное антителообразование.

Антиген вводят внутривенно, внутрибрюшно или подкожно с адъювантом (веществом, усиливающим иммуногенность антигенов) или без него в нарастающей дозе.

При иммунизации животных иммунный ответ вырабатывается на все антигенные детерминанты всех компонентов вводимого материала.

Назначение процесса **иммунизации** состоит в том, чтобы увеличить долю клеток, продуцирующих антитела заданной специфичности и перевести эти клетки в функциональное состояние, при котором они способны сливаться образовывать антителопродуцирующие гибридные клетки.

Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

3. Получение клеток селезенки (получение В-лимфоцитов).

- В гуморальном иммунитете участвует преимущественно лимфоидная ткань селезенки, обеспечивая накопление большого количества плазматических клеток, синтезирующих антитела.
- Через 4 дня после последней инъекции антигена мышей убивают, извлекают селезенку, измельчают ее
- Готовят суспензию в специальной среде для культивирования, в состав которой входят аминокислоты, витамины, углеводы и неорганические соли. Суспензию клеток селезенки готовят при комнатной температуре.
- Эту взвесь используют для слияния.

Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

4. Гибридизация (слияние) клеток миеломы и В-лимфоцитов селезенки.

Для проведения слияния используют *полиэтиленгликоль (ПЭГ)*, который вызывает перераспределение мембранных белков, обеспечивая контакт и слияние клеток. В ПЭГ должны присутствовать ионы кальция, которые способствуют сближению клеток и образованию между ними кальциевых каналов.

Лимфоциты селезенки и клетки миеломы смешивают, осаждают центрифугированием, готовят суспензию в среде для слияния, содержащей 50%-ный раствор ПЭГ и хлорид кальция, выдерживают 30–40 мин при 37°C, а затем опять центрифугируют. Слияние проводят либо в осадке в конической пробирке, либо в монослое.

Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

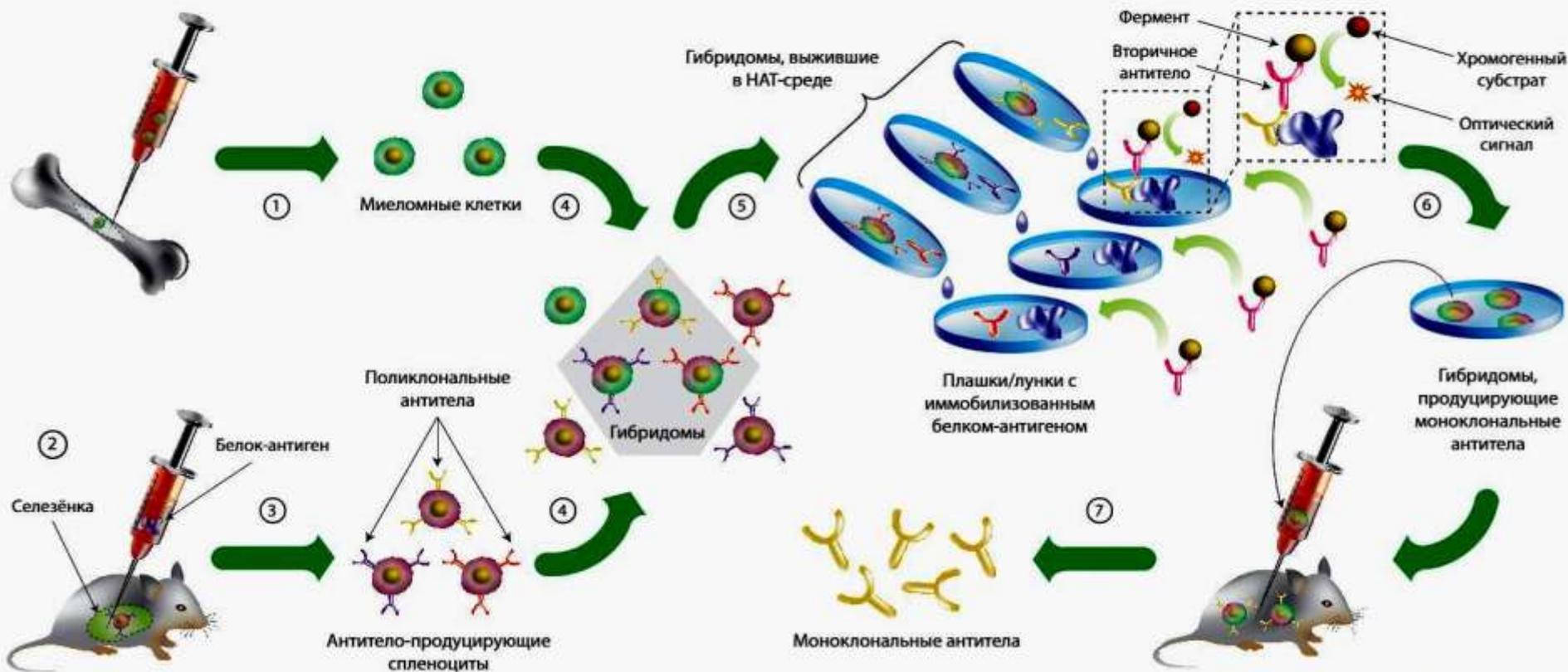
5. Селекция гибридом на среде НАТ.

Осадок клеток ресуспендируют в среде НАТ, содержащей *гипоксантин (H)*, *аминоптерин (A)*, *тимидин (T)*, разливают в лунки микропланшета и инкубируют при 37°C в атмосфере диоксида углерода в течение 10 – 16 дней. Через каждые 3 – 4 дня производят замену в лунках на новую среду того же состава.

- Миеломные клетки погибают на среде НАТ, т.к. из-за дефектности по ТК и ГГФРТ не способны использовать гипоксантин и тимидин для синтеза нуклеотидов.
- Неслившиеся лимфоциты отмирают через несколько дней после гибридизации, т.к. они не способны к длительному выживанию *in vitro*.
- Таким образом, на среде ГАТ должны выживать только непрерывно растущие клоны гибридных клеток.
- В гибридомах будут экспрессированы гены миеломных клеток и В-лимфоцитов. От миеломных партнеров наследуются способность к неограниченному росту в культуре или *in vivo*, а от В-лимфоцитов селезенки – способность к продукции антител известной специфичности и возможность использовать обходной путь синтеза нуклеотидов при участии ТК и ГГФРТ.

Гибридная технология

- | | | | |
|--|--|--|---|
| ① Культивирование клеток миеломы | ③ Выделение спленоцитов из селезёнки | ⑤ Культивирование гибридом в НАТ-среде | ⑦ Размножение гибридом <i>in vivo</i> и выделение антител |
| ② Иммунизация животного белком-антигеном | ④ Слияние спленоцитов с клетками миеломы | ⑥ Скрининг клеточных линий | |



Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

6. Определение антителообразующей способности гибридом.

Наличие антител определяется в надосадочных фракциях культуральной среды в лунках микропланшет, для чего отбирают по 50 мкл среды с помощью автоматических многоканальных пипеток. Концентрацию антител определяют высокочувствительными методами радиоиммуноанализа (РИА) или иммуноферментного анализа (ИФА).

7. Клонирование гибридом.

- Обнаруженные клоны должны быть реклонированы, т.к. после слияния во многих гибридах начинается «выброс» хромосом, продолжающийся до тех пор, пока число хромосом в клетке не будет равным приблизительно $2N$.
- В ходе этого процесса некоторые клетки могут потерять хромосомы, несущие гены иммуноглобулинов.
- Существует опасность, что такие клетки, не способные больше продуцировать иммуноглобулины, будут расти лучше клонов антителообразующих клеток.
- В каждой лунке не всегда образуется только один гибридный клон. В этом случае возникает необходимость отделить ненужные клоны от тех, которые представляют интерес для исследования.

Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

7. Клонирование гибридом.

Методы клонирования гибридом:

- 1. Клонирование методом предельных разведений.**
- 2. Клонирование в полужидком агаре.**
- 3. Клонирование с помощью проточного цитофлуориметра.**

Через несколько дней проверяют наличие антител только в тех лунках, в которых обнаружен лишь один клон. В том случае, если в лунках образуется больше одного клона, клонирование повторяется. На этом этапе также проводят контроль антителообразующей способности клонов.

Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

8. Накопление клеток, синтезирующих МкАТ

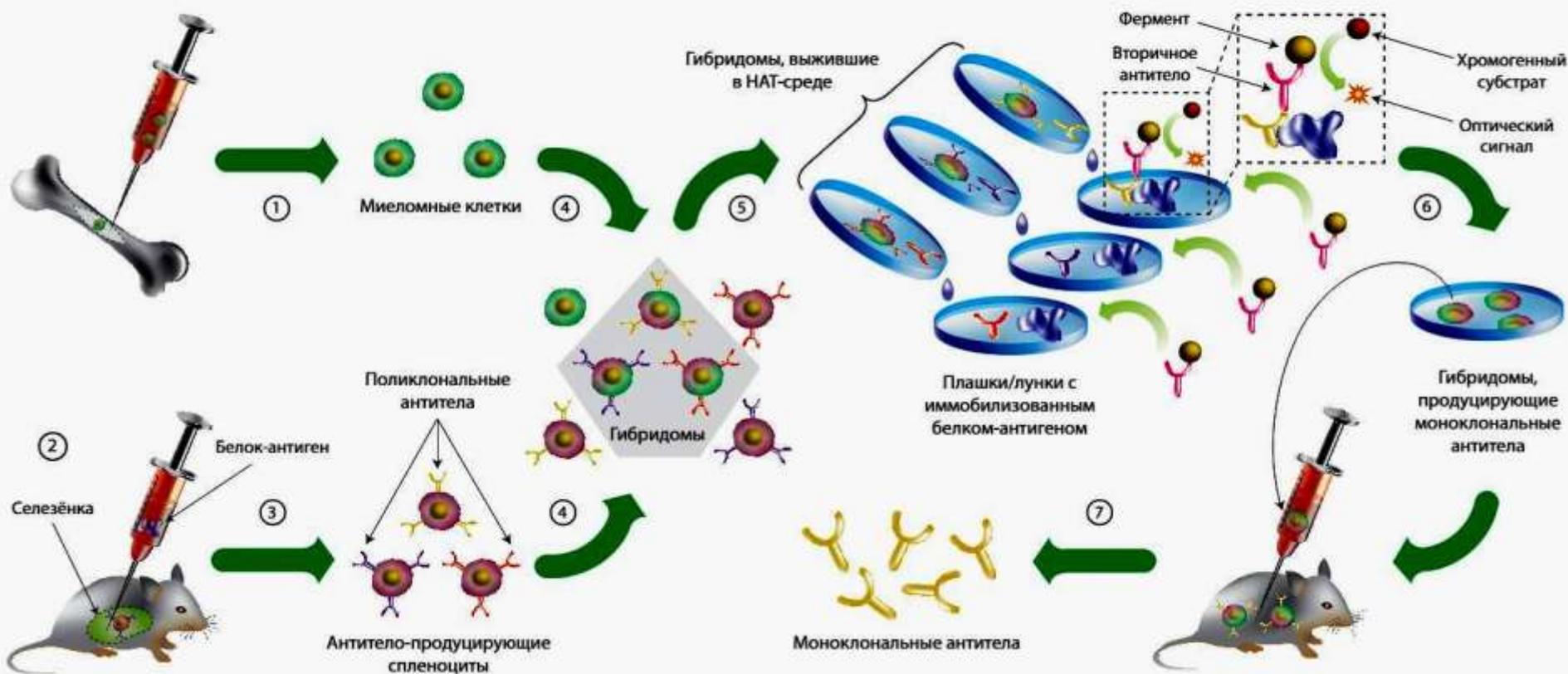
Когда количество гибридных клеток в лунках заметно увеличиться, их переносят в планшеты с лунками больших объемов и затем в культуральные сосуды объемом 25 – 50 мл. На этом этапе можно получить достаточное количество для культивирования *in vivo* или в специальных биореакторах *in vitro*.

Гибридомы легко культивируются после их хранения в замороженном состоянии в жидком азоте при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в среде, содержащей 20% сыворотки крови и 10% диметилсульфоксида. Клетки замораживают: на этапах получения, клонирования и реклонирования для последующего возобновления в случае ее гибели вследствие контаминации.

При отсутствии в лаборатории резервуара с жидким азотом замороженные клетки можно хранить при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение года. В жидком азоте клетки хранят несколько лет.

Гибридная технология

- | | | | |
|--|--|--|---|
| ① Культивирование клеток миеломы | ③ Выделение спленоцитов из селезёнки | ⑤ Культивирование гибридом в НАТ-среде | ⑦ Размножение гибридом <i>in vivo</i> и выделение антител |
| ② Иммунизация животного белком-антигеном | ④ Слияние спленоцитов с клетками миеломы | ⑥ Скрининг клеточных линий | |



Этапы получения гибридом, синтезирующих МкАТ

Культивирование гибридом *in vivo*.

- ✓ Для культивирования гибридом *in vivo* их вводят мышам или крысам внутрибрюшинно.
- ✓ Моноклональные антитела будут накапливаться во внутрибрюшинной асцитической жидкости в количестве 1 – 25 мг/мл.
- ✓ Для получения асцитов перед введением гибридных клеток (в период от трех дней до одного месяца) внутрибрюшинно инъецируют 0,5 мл пристана (2, 6, 10, 14-тетраметилпентадекан) или неполный адъювант Фрейнда, которые повышают способность гибридом расти в брюшной полости.
- ✓ Асцитную жидкость можно собирать с 14-го дня после введения пристана или адъюванта.

Области применения МкАТ

1. Диагностика:

- ✓ иммунологические анализы биологических жидкостей и клеток организма, микроорганизмов, вирусов и т.п.;
- ✓ иммуногистохимические методы анализа;
- ✓ иммуносцинография опухолей;
- ✓ типирование групп крови и тканей;

2. Терапия:

- ✓ воздействие на отдельные клеточные популяции;
- ✓ влияние на иммунные регуляторные механизмы с помощью антител к лимфокинам;
- ✓ иммунорегуляция с помощью антиидиотипических антител;
- ✓ направленный транспорт лекарственных веществ;
- ✓ элиминация токсинов, иммунотоксинов и аллергенспецифичных антител.

3. Технология:

- ✓ идентификация молекул;
- ✓ очистка молекул и клеток, несущих специфический антиген;

4. Научные разработки:

- ✓ исследования этиологии и патогенеза различных заболеваний;
- ✓ исследование системных и межсистемных механизмов регуляции;
- ✓ создание новых лекарственных средств и биопрепаратов.