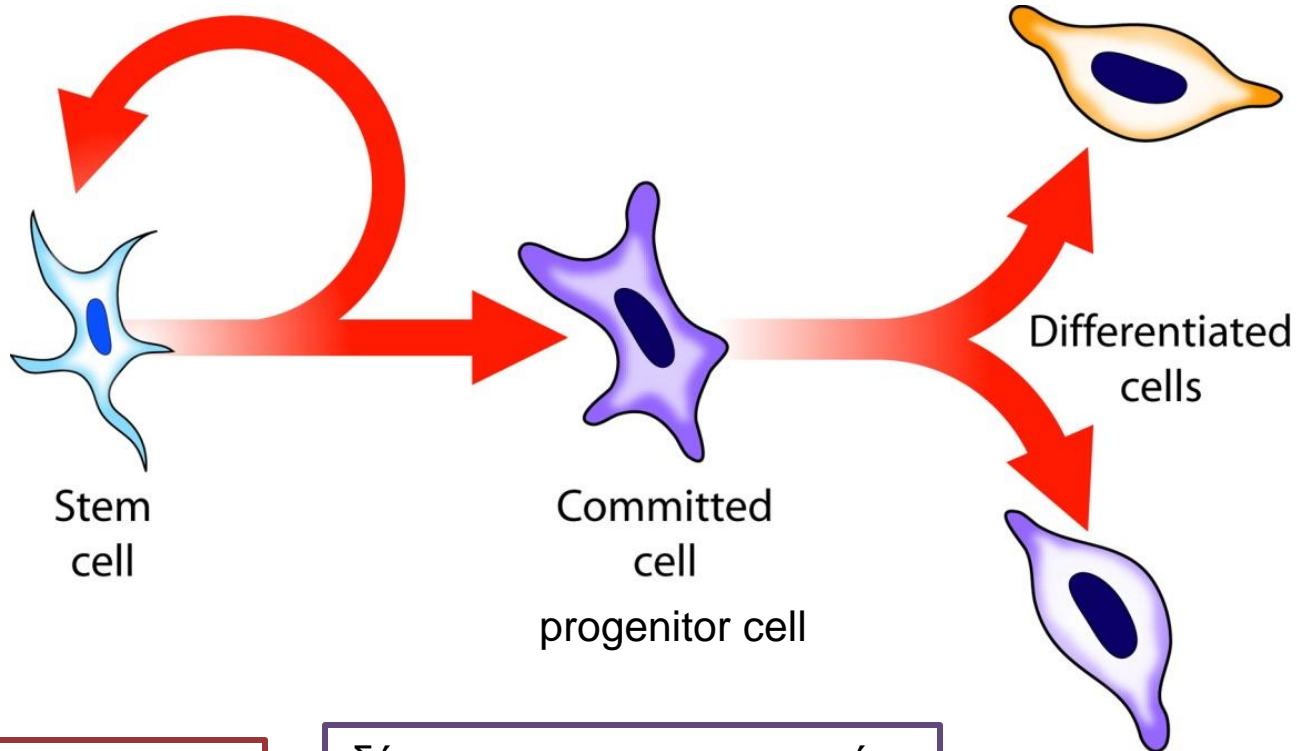


Κυτταροκαλλιέργεια εμβρυακών
βλαστικών κυττάρων (Embryonic
Stem Cells, ESCs)

Stem cells (βλαστικά κύτταρα)



αυτο-ανανέωση
self-renewal

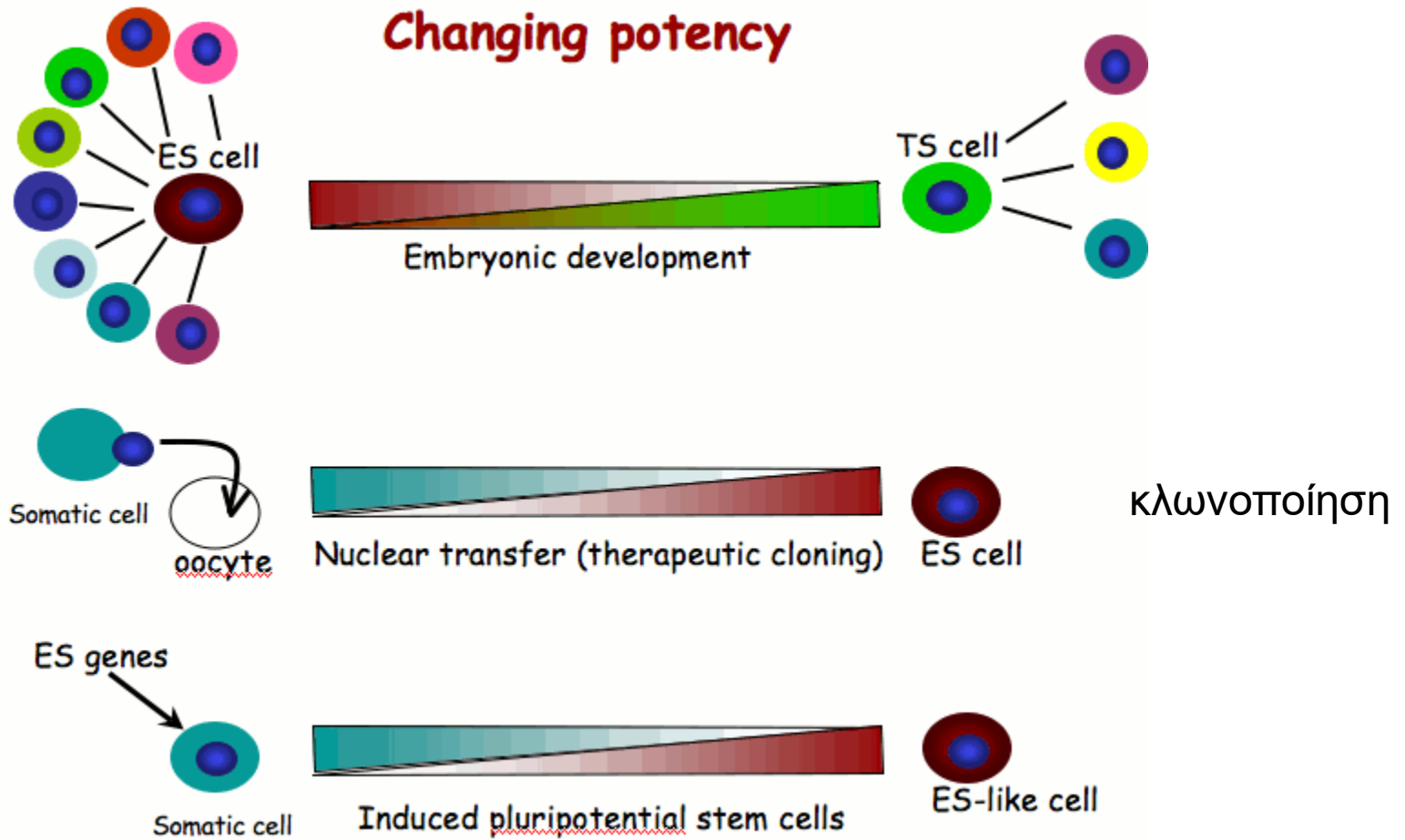
δέσμευση προς συγκεκριμένη
πορεία διαφοροποίησης
commitment

διαφοροποίηση
differentiation

Δυναμικό βλαστικών κυττάρων

- **Παντοδύναμα (totipotent):** έχουν απεριόριστες δυνατότητες: μπορούν να δημιουργήσουν εξω-εμβρυακές μεμβράνες και όλους τους ιστούς του εμβρύου (πχ ζυγώτης)
- **Ολοδύναμα (pluripotent):** δυνατότητα δημιουργίας όλων των κυττάρων, ιστών και οργάνων ενός οργανισμού (μεσόδερμα, ενδόδερμα, εκτόδερμα) (πχ εμβρυακά βλαστοκύτταρα)
- **Πολυδύναμα (multipotent):** δυνατότητα δημιουργίας περιορισμένου αριθμού κυτταρικών τύπων (βλαστοκύτταρα από ιστούς ενηλίκων ζώων ή στελεχιαία αρχέγονα κύτταρα)

Αλλαγή δυναμικού βλαστικών κυττάρων



Μετα-διαφοροποίηση σωματικών κυττάρων: induced Pluripotent Stem cell lines (iPS cell lines) ή επαγώμενες ολοδύναμες εμβρυακές βλαστικές κυτταρικές σειρές

Έρευνα με βλαστικά κύτταρα



- Isolate & separate individual stem cell populations

- Ensure that cells retain their functionality and potential to differentiate

- Characterize & track stem cell populations

- Culture stem cell lines in a stable, multi- or pluri-potent state, free from mutations & to sufficient quantity

- Economical expansion is key to making cell-therapy a reality

- Control & activate stem cell differentiation to desired lineages

- Functionally active differentiated cells

Κυτταροκαλλιέργειες βλαστικών κυττάρων

Εμβρυακά βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem cells, ESC)

- δυνατότητα δημιουργίας όλων των κυτταρικών τύπων
- αθάνατα σε καλλιέργεια
- αρκετά σε αριθμό

Ενήλικα (στελεχειαία) βλαστοκύτταρα (Adult stem cells)

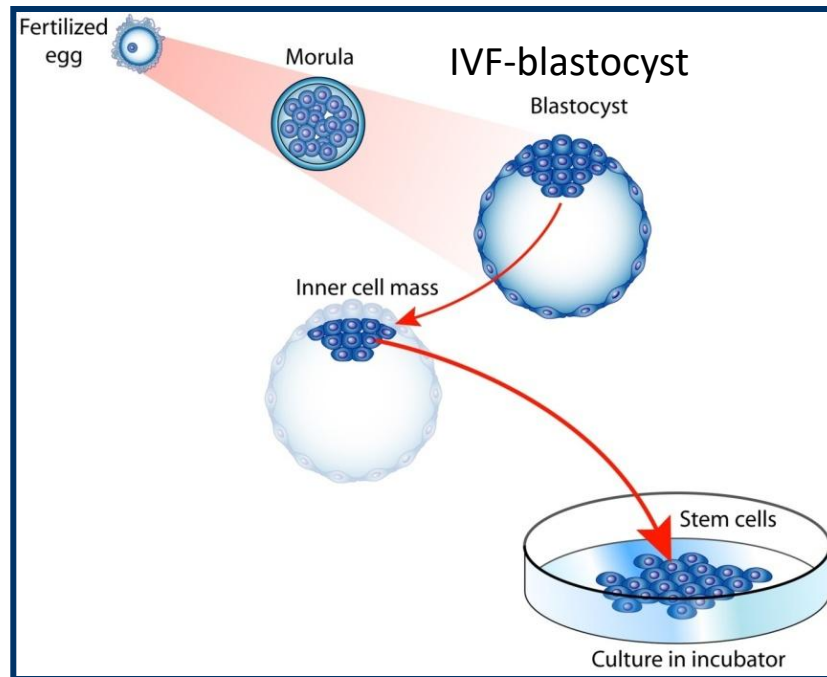
- απομόνωση από συγκεκριμένους ιστούς
- δημιουργία περιορισμένων κυτταρικών τύπων
- περιορισμένο χρόνος ζωής σε καλλιέργεια
- μικροί αριθμοί (δύσκολη απομόνωση και καλλιέργεια)

Απομόνωση και καλλιέργεια ES κυττάρων

δεκαετία 1980: καλλιέργεια ES κυττάρων από έμβρυα ποντικών →
δημιουργία ES κυτταρικών σειρών ποντικού – απόδειξη ολοδυναμίας

ES κυτταρικές σειρές από άλλα θηλαστικά (αρουραίους, αγελάδες, χάμστερ)

1998: Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. J.
Thomson et al, Science (πανεπιστήμιο Wisconsin)



Απομόνωση και καλλιέργεια ESC

Μεταφορά των κυττάρων της εσωτερικής μάζας (inner cell mass, ICM) σε πιάτο με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Τα κύτταρα εξαπλώνονται και μεταφέρονται διαδοχικά σε νέα πιάτα καλλιέργειας (ανακαλλιέργεια=subculturing, πέρασμα=passage)



καλλιέργεια ESC παρουσία ινοβλαστών (feeder cell cultures)

- τα πιάτα καλλιέργειας περιέχουν στρώμα κυττάρων (ινοβλάστες, από ποντίκι ή άνθρωπο, που δεν μπορούν να διαιρεθούν λόγω μιτομυκίνης ή ακτινοβολία)
- οι ινοβλάστες παρέχουν εκκρινόμενους παράγοντες και τις κυτταρικές επαφές για την διατήρηση των ESC σε αδιαφοροποίητη κατάσταση

ΑΛΛΑ: κίνδυνος μόλυνσης (cross-contamination)
(π.χ. ζωικά παθογόνα σε ανθρώπινα ESC)

καλλιέργεια ESC απουσία ινοβλαστών (feeder-free cultures)

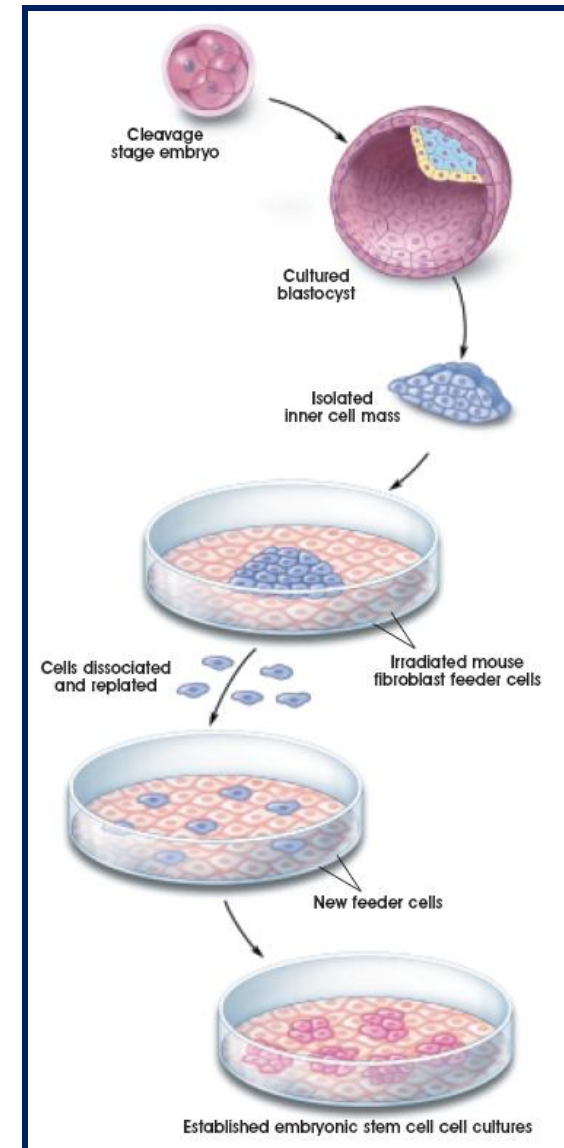
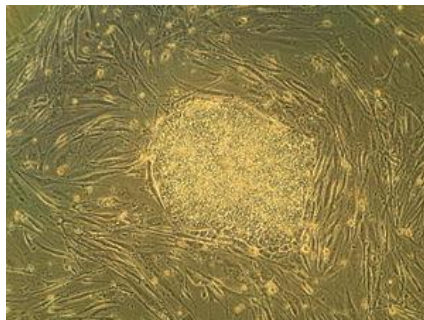
- το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ενισχύεται με διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες μεταγωγής σήματος
- το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας είναι conditioned medium (CM) : απομονώνεται από καλλιέργεια ανθρώπινων ή ποντικίστων κυττάρων (ινοβλαστών)

Δημιουργία Εμβρυακών Βλαστικών Κυτταρικών σειρών

Η διαδικασία της **ανακαλλιέργειας** επαναλαμβάνεται πολλές φορές, μπορεί να διαρκέσει πολλούς μήνες και να περιλαμβάνει έως και 60 περάσματα π.χ. ~ μετά από 6 μήνες τα αρχικά 30 κύτταρα της εσωτερικής μάζας θα δώσουν εκατομμύρια ESC

Embryonic Stem Cell line (Εμβρυακή Βλαστική Κυτταρική σειρά): κύτταρα ESC που πολλαπλασιάστηκαν σε καλλιέργεια για έξι ή παραπάνω μήνες χωρίς να διαφοροποιηθούν, διατηρούν την ολοδυναμία και έχουν φυσιολογικό καρυότυπο

ESC σειρές αποθηκεύονται (με πάγωμα) ή παραχωρούνται σε άλλα εργαστήρια για περαιτέρω καλλιέργεια/μελέτη



Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια ESC

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη)

- 15-20% **Fetal Calf Serum (FCS)** (ορός από νεογέννητο μοσχάρι), Knockout Serum Replacement (εταιρεία Invitrogen) (human serum)
- **L-γλουταμίνη** (1 mM τελ. συγκέντρωση) σταθερή σε διάλυμα μόνο για 10 μέρες
- **αμινοξέα** (γλυκίνη, L-αλανίνη, L-ασπαρτικό οξύ, L-ασπαραγίνη, L-προλίνη, L-σερίνη) (1/100 κατ'όγκον)
- **αντιβιοτικά** πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (1/100 κατ'όγκον)
- **βΜΕ** ή 2-mercaptoethanol (μερκαπτοαιθανόλη) (0.1 mM τελική συγκέντρωση)

καλλιέργεια ESC ποντικού παρουσία feeder cells (ινοβλάστες)

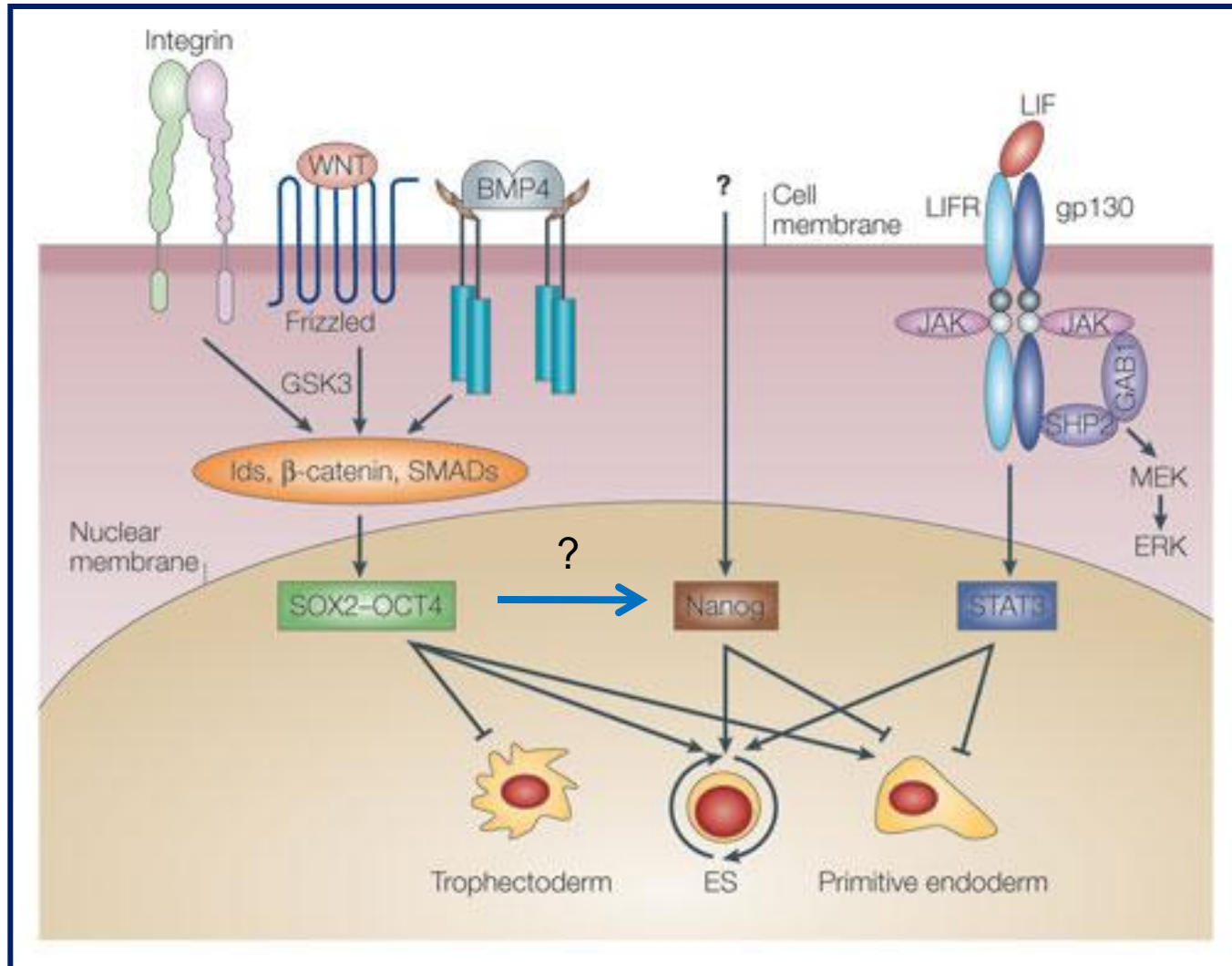
Leukemia Inhibitory Factor (LIF): τελική συγκέντρωση 1000 U/ml

καλλιέργεια ESC ανθρώπου παρουσία feeder cells (ινοβλάστες)


Fibroblast Growth Factor-2 (basic FGF, bFGF): τελική συγκέντρωση 4 ng/ml

➤ ινοβλάστες και η προσθήκη LIF ή bFGF: αποφυγή διαφοροποίησης ESC

Μονοπάτια μετάδοσης σήματος στην αυτο-ανανέωση των mESC



Cell culture reagents need to be tailored for SC use

Parameter	Implications for Stem Cell Culture	 invitrogen™
<ul style="list-style-type: none">• Osmotic & ionic equilibrium	<ul style="list-style-type: none">• Traditional media's osmolality can lead to cell death and differentiation	<ul style="list-style-type: none">• Osmolality-optimized media
<ul style="list-style-type: none">• Serum	<ul style="list-style-type: none">• Serum (esp. unqualified serum) triggers differentiation and loss of pluripotency	<ul style="list-style-type: none">• Qualified sera• Knockout Serum Replacement (KSR)
<ul style="list-style-type: none">• Glutamine	<ul style="list-style-type: none">• Glutamine degradation leads to ammonia buildup, which in turn causes cell death, protein glycosylation and chromosomal abnormalities	<ul style="list-style-type: none">• GlutaMAX
<ul style="list-style-type: none">• Trypsin protease damage	<ul style="list-style-type: none">• Proteases in animal-derived trypsin degrades trypsin; causes membrane damage	<ul style="list-style-type: none">• TrypLE

Βασικοί κανόνες για την καλλιέργεια ESC

Σκοπός: αποφυγή διαφοροποίησης των κυττάρων

- μεταφορά-πέραςμα κυττάρων συνήθως σε αναλογία 1/5
- δεν επιτρέπουμε στα κύτταρα να καλύψουν πλήρως το πιάτο καλλιέργειας; πέραςμα όταν καλύπτουν το μισό πιάτο (semiconfluent) - ιδανικά κάθε 2-3 μέρες
- αποδιάταξη των αποικιών σε μονοκύτταρα μετά την χρήση τρυψίνης
- πολύ σημαντική η ποιότητα του ορού καλλιέργειας
- σημαντική η καθημερινή ανανέωση θρεπτικού υλικού; σημαντική η ανανέωση θρεπτικού υλικού περίπου 3 ώρες πριν από πέραςμα σε νέο πιάτο ή το πάγωμα; παρατήρηση του χρώματος του θρεπτικού (κίτρινο → όξινο pH → απόρριψη)
- διατήρηση αρχείου με την συχνότητα και τον αριθμό περασμάτων

Τα ESC που διαφοροποιούνται αυθόρμητα μπορεί να διαφέρουν στην μορφολογία τους, ανάλογα με την αιτία διαφοροποίησης τους, π.χ. λάθος πυκνότητα ινοβλαστών, χαμηλή συγκέντρωση LIF, κακή ποιότητα ορού...

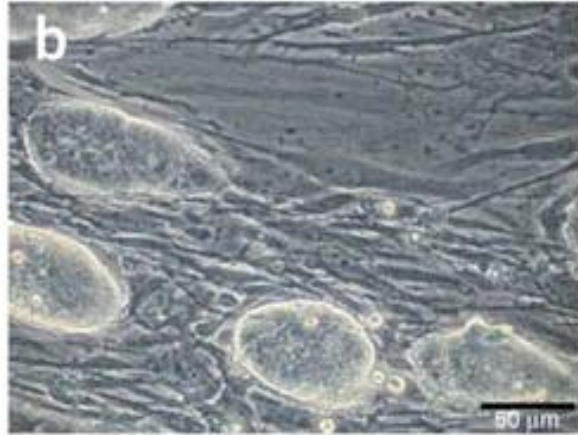
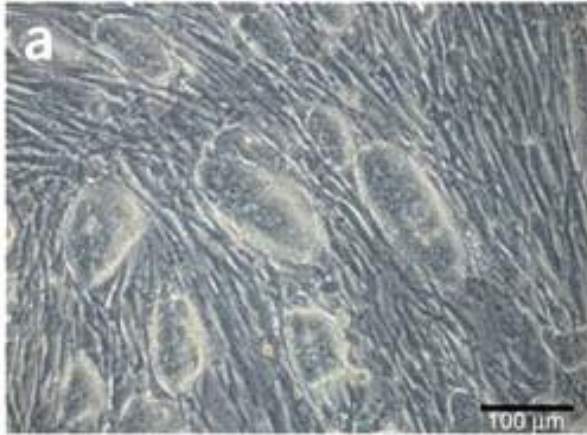
Δοκιμές για τον χαρακτηρισμό ESC σε καλλιέργεια

- A. Μεγάλωμα και ανακαλλιέργεια των βλαστικών κυττάρων για αρκετούς μήνες → τα κύτταρα είναι ικανά για μακροχρόνια αυτο-ανανέωση. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα φαίνονται υγιή και παραμένουν αδιαφοροποίητα
- B. Εκτίμηση παρουσίας επιφανειακών πρωτεϊνών-μαρτύρων ή άλλων πρωτεϊνών (μεταγραφικού παράγοντα Oct-4) που απαντώνται μόνο σε αδιαφοροποίητα κύτταρα
- Γ. Εξέταση των χρωμοσωμάτων στο μικροσκόπιο π.χ. αν έχει αλλάξει ο αριθμός τους
- Δ. Δυνατότητα ανακαλλιέργειας των κυττάρων μετά από πάγωμα (κρυοσυντήρηση) και ξεπάγωμα
- E. Δοκιμές που θα αποδείξουν την ολοδυναμία των ESC, όπως
- 1) τα αφήνουμε να διαφοροποιηθούν αυθόρμητα
 - 2) κατευθύνουμε την διαφοροποίησή τους προς συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους
 - 3) ένεση των κυττάρων σε ανοσοκατασταλμένο ποντίκι για να δούμε αν θα σχηματίζουν καλοήγη όγκο, που καλείται τεράτωμα (ένα μείγμα πολλών, μερικά διαφοροποιημένων κυτταρικών τύπων)

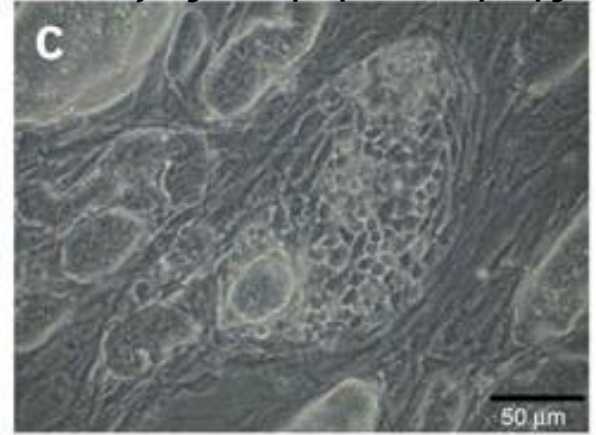
A. Καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων παρουσία ινοβλαστών

Καλλιέργεια για αρκετούς μήνες → κύτταρα ικανά για μακροχρόνια αυτοανανέωση
Μικροσκοπική παρατήρηση για μορφολογία υγιών και αδιαφοροποίητων κυττάρων

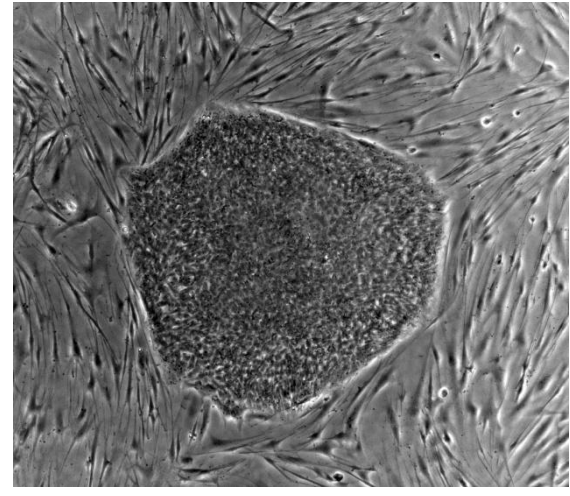
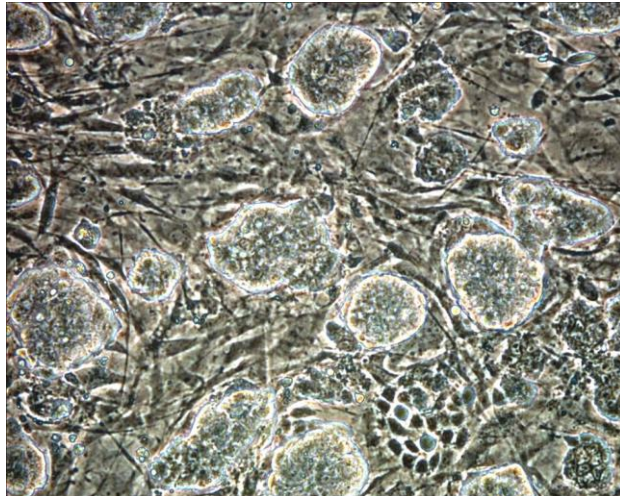
Mouse ESC



ενδείξεις διαφοροποίησης



Human ESC



B. Χαρακτηριστικοί μάρτυρες ESC

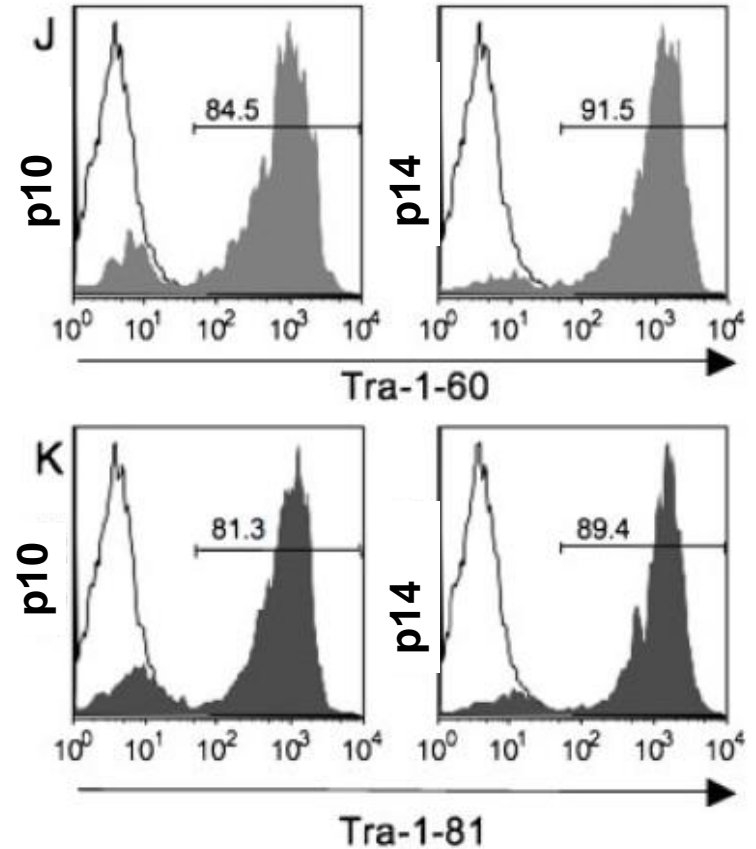
Table 1 | **The best-characterized ESC markers***

Undifferentiated state marker	Mouse	Human
<i>Cell-surface and nuclear antigens</i>		
SSEA1 [‡]	+	-
SSEA3/4 [‡]	-	+
TRA1-60/81 [§]	-	+
TRA2-54	-	+
GCTM-2 [§]	-	+
TG343 [§]	?	+
TG30	?	+
CD9	+	+
CD133/prominin	+	+
OCT4	+	+
NANOG	+	+
SOX2	+	+
<i>Enzymatic activities</i>		
AP	+	+
Telomerase	+	+

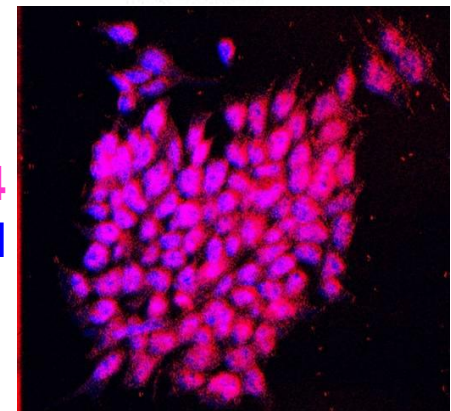
SSEA: Stage-Specific Embryonic Antigen

TRA: Tumour-Rejection Antigen

Sox2: SRY-related high-mobility group (HMG)-box protein-2



Oct4
DAPI

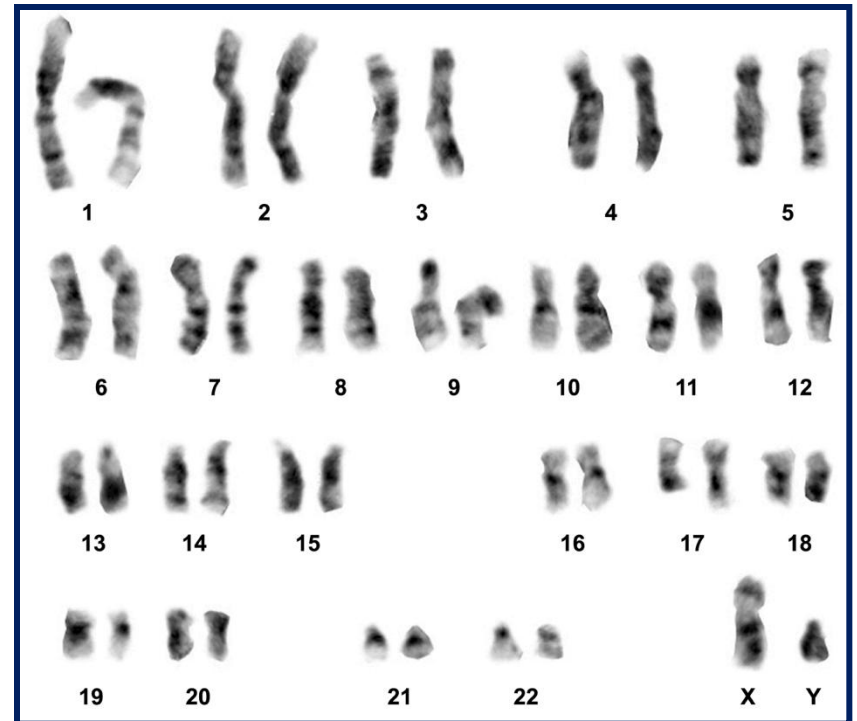


Γ. Εξέταση των χρωμοσωμάτων των ESC

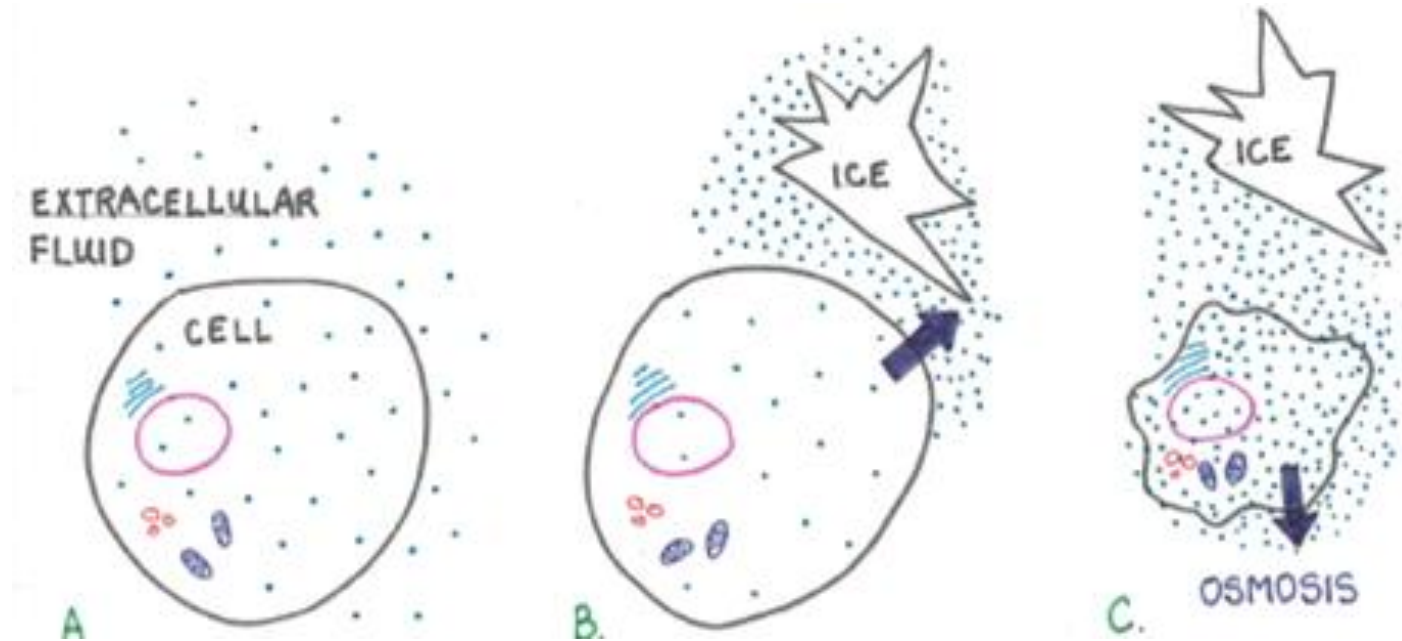
καρυότυπος ESC ποντικού



καρυότυπος ESC ανθρώπου

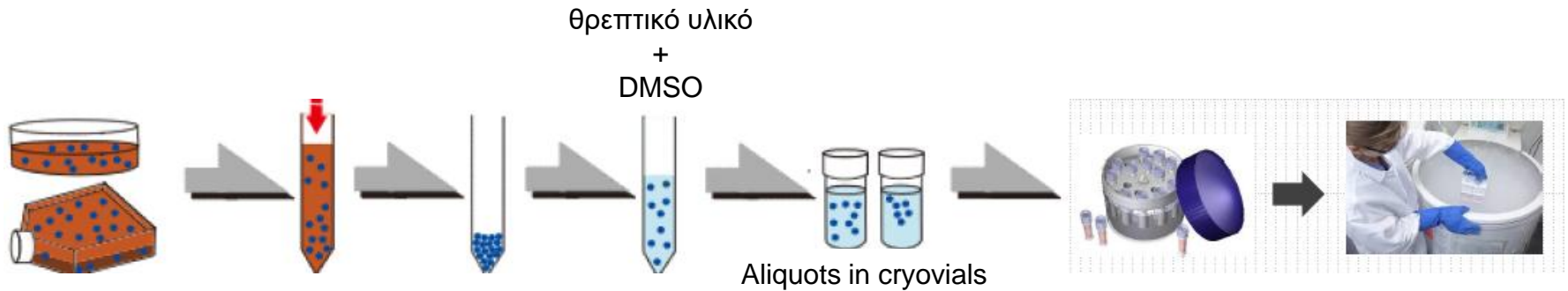


Δ. Κρυοσυντήρηση κυττάρων



- σταδιακή ψύξη που επιτρέπει τη διάχυση του νερού από το εσωτερικό του κυττάρου, αλλά όχι τόσο αργή ώστε να υποβοηθείται ο σχηματισμός κρυστάλλων νερού
- χρήση κρυοπροστατευτικών ουσιών
- αποθήκευση των κυττάρων στη χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία
- απότομη απόψυξη που μειώνει τον σχηματισμό κρυστάλλων και την τοπική συμπύκνωση διαλυμένων ουσιών

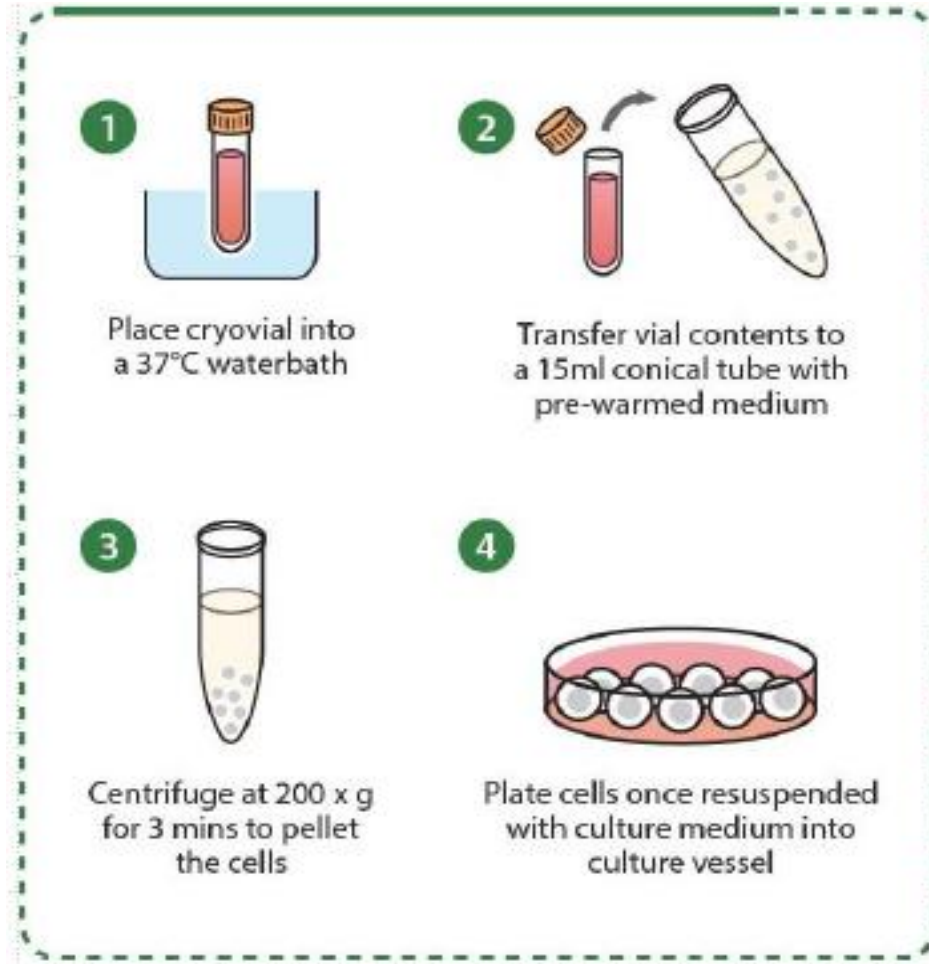
Κρυοσυντήρηση - ψύξη κυττάρων



χρήση **κρυοπροστατευτικών** ουσιών, π.χ. γλυκερόλη ή DMSO (5-10% v/v)

σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας ~ 1 °C/λεπτό έως τους -80 °C (χρήση συσκευής ισοπροπανόλης) και μακροχρόνια αποθήκευση σε υγρό άζωτο (-196 °C)

Απόψυξη: επαναφορά κυττάρων μετά από κρυοσυντήρηση



Η ταχεία απόψυξη μειώνει τον σχηματισμό κρυστάλλων και την τοπική συμπύκνωση διαλυμένων ουσιών

Ε. Δοκιμές απόδειξης ολοδυναμίας των ESC

In vitro δοκιμές

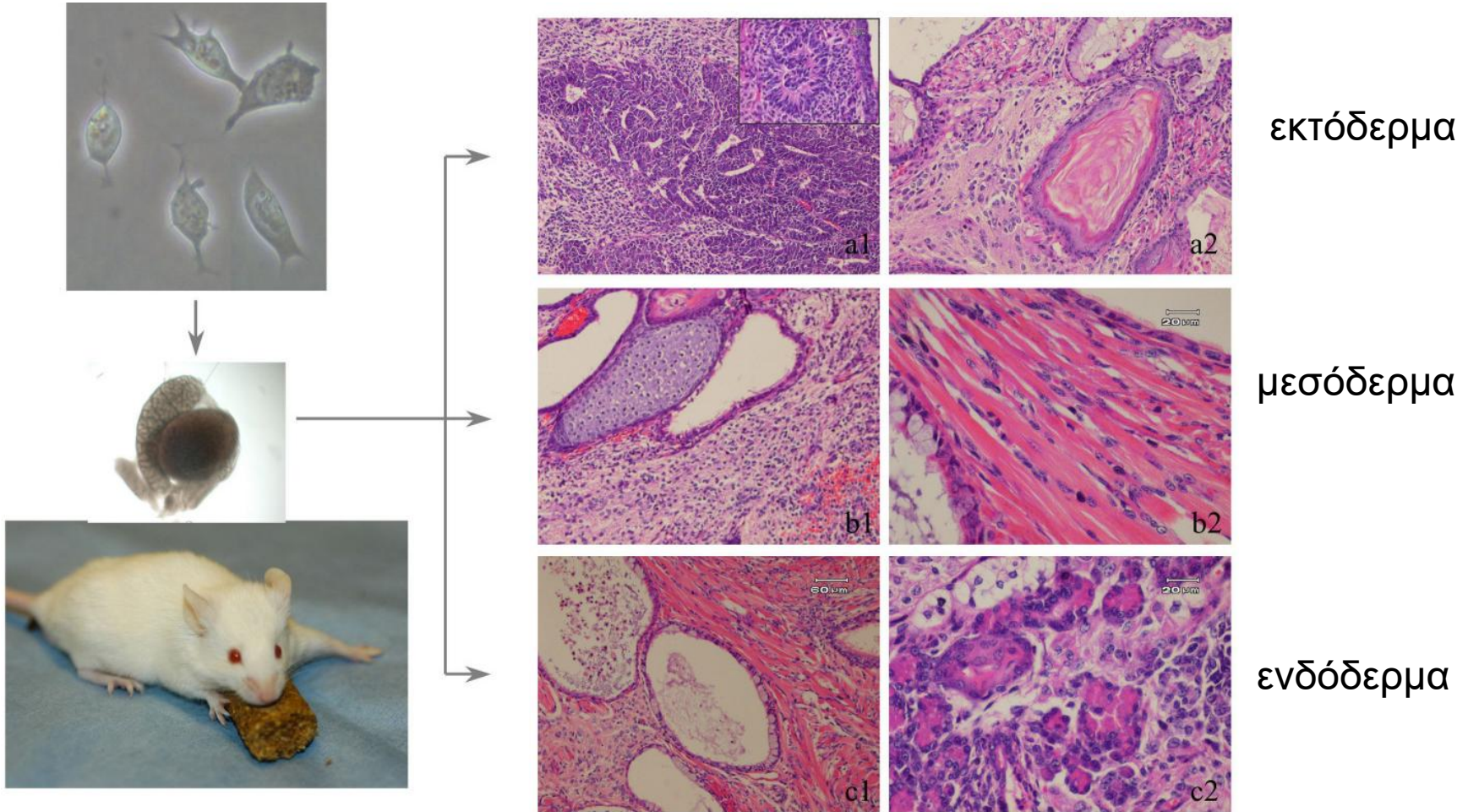
Μελέτη ικανότητας αυθόρμητης διαφοροποίησης

Μελέτες κατευθυνόμενης διαφοροποίησης προς συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους

In vivo δοκιμές

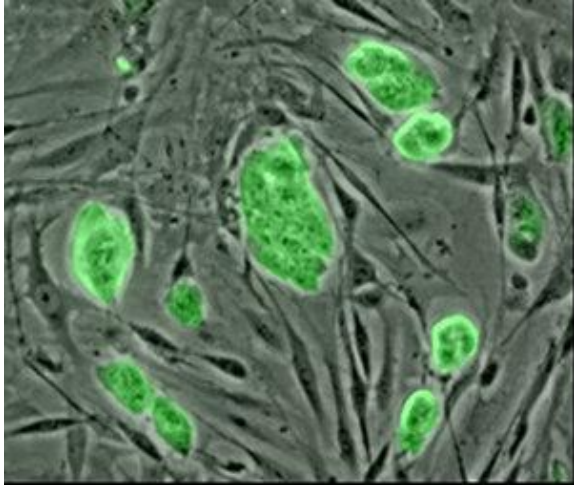
Μεταφορά ESC κυττάρων σε ποντίκια (υπό ανοσοκαταστολή) και έλεγχος σχηματισμού τερατώματος (μείγμα διαφορετικών, μερικά διαφοροποιημένων κυτταρικών τύπων)

Η ένεση των ESC προκαλεί τεράτωμα *in vivo*

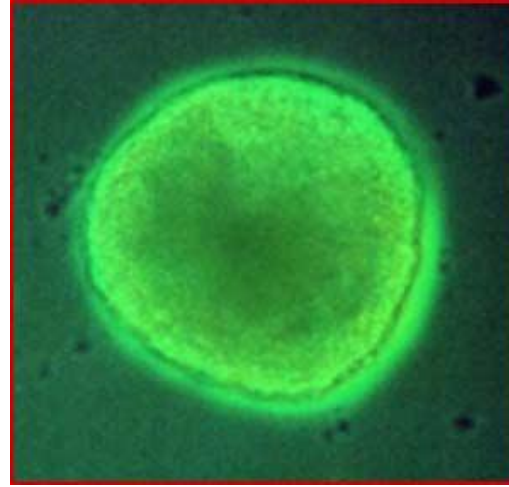


Αυθόρμητη διαφοροποίηση ESC κυττάρων προς εμβρυοειδή σωμάτια (Embryoid Bodies, EBs)

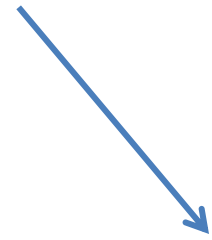
Mouse ESC



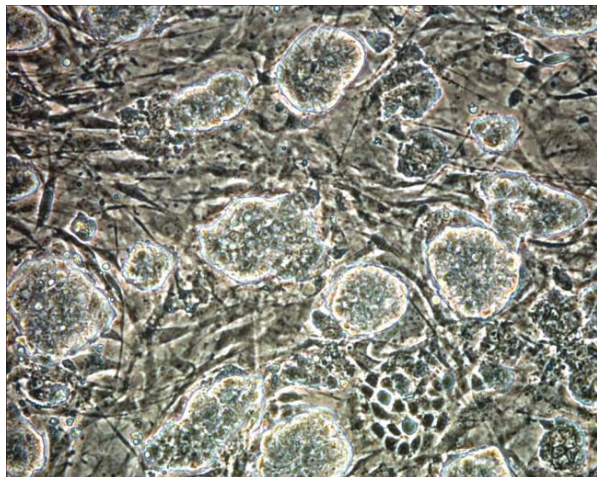
Αφαίρεση LIF



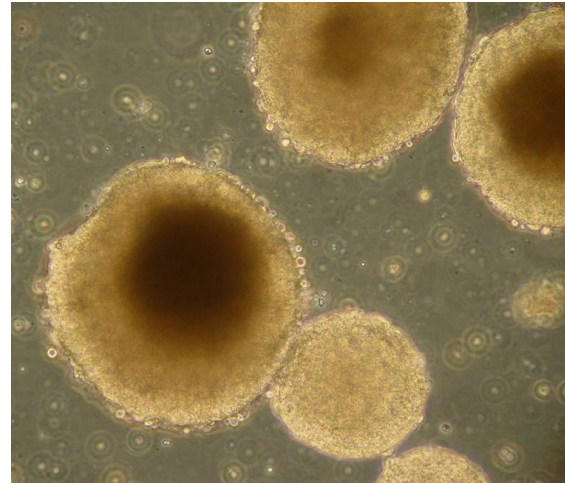
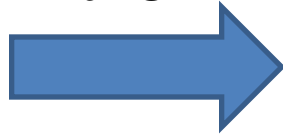
Embryoid Bodies (EBs)



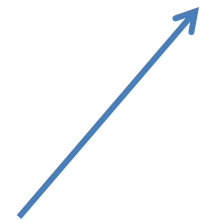
Κατευθυνόμενη
διαφοροποίηση



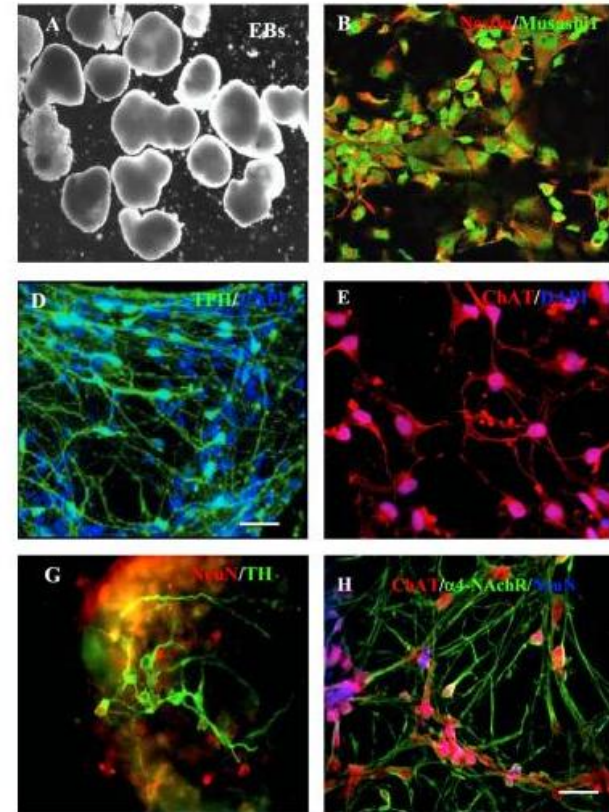
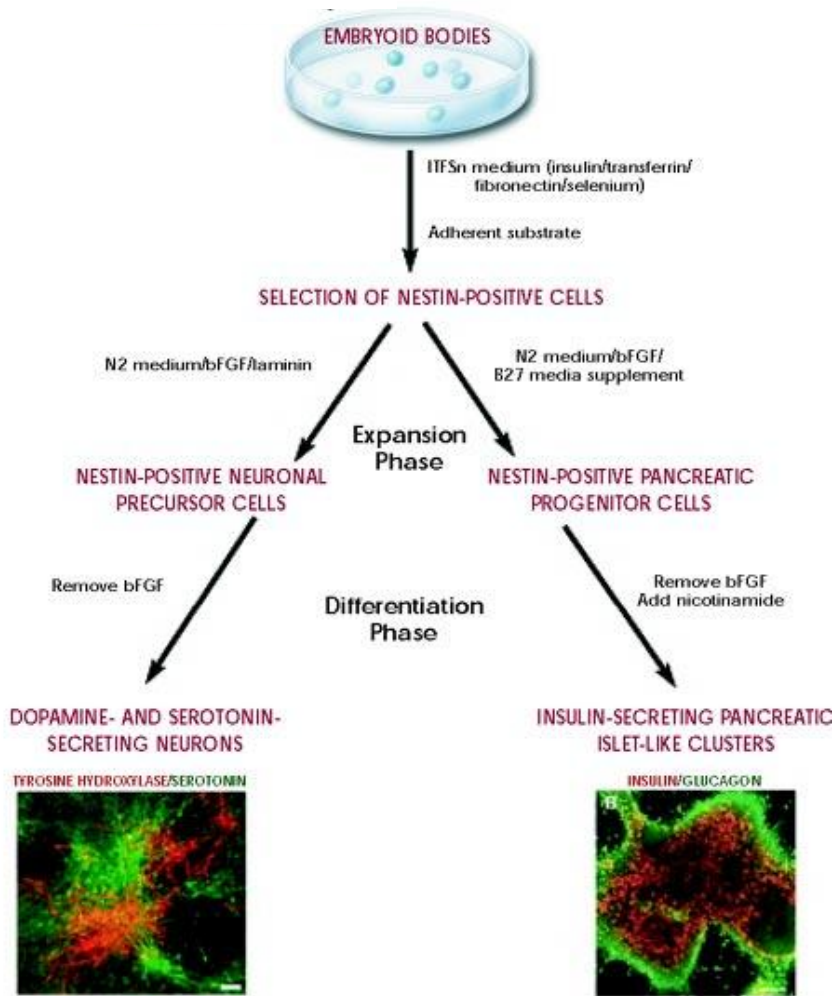
Αφαίρεση
bFGF



Human ESC



Κατευθυνόμενη διαφοροποίηση mESC



- B. Nestin, musashi1
- D. Tryptophan hydroxylase (TPH)
- E. Choline acetyltransferase (ChAT)
- G. Tyrosine hydroxylase (TH)
- H. $\alpha 4$ -nicotinic receptors

Κύτταρα feeder (MEF, Mouse Embryo Fibroblast)

πρωτογενείς καλλιέργειες εμβρυακών ινοβλαστών ποντικού

Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των MEF

DMEM

10% ορός (FBS)

αμινοξέα, L-γλουταμίνη

αντιβιοτικά

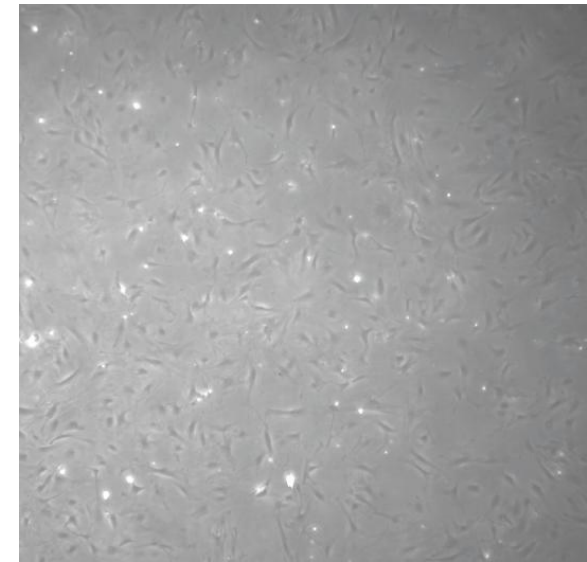
οι MEF απενεργοποιούνται μιτωτικά
μια μέρα πριν την χρήση τους

μιτομυκίνη-C

αλκυλιούν παράγοντας
(10 μg/ml, 2 ώρες, 37°C)

γ-ακτινοβολία

(5000-8000 rads)



η πυκνότητα των MEF επιδρά άμεσα στην ανάπτυξη των ESC

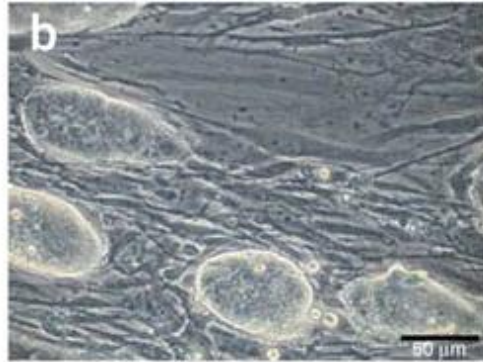
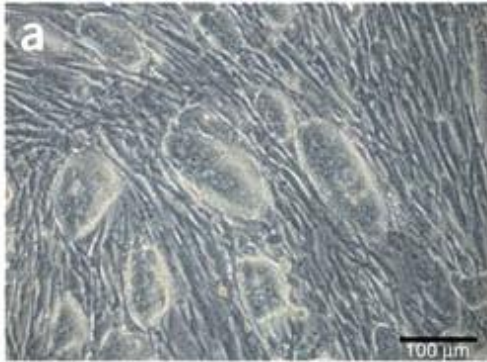
Καλλιέργεια hESC απουσία κυττάρων feeder

❖ Παρασκευή **Conditioned Medium (CM)** από MEF

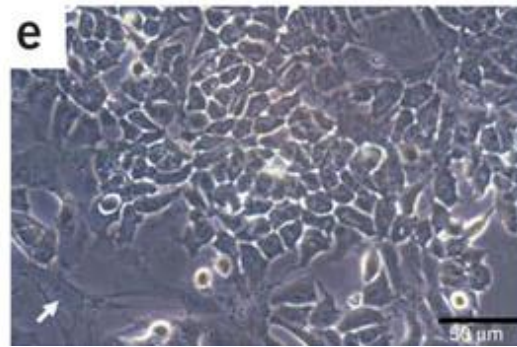
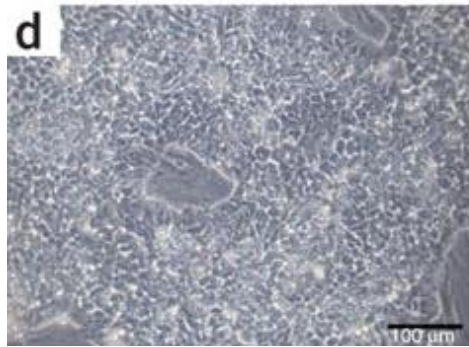
- Καλλιέργεια των MEFs (max p4) σε πιάτα επιστρωμένα με ζελατίνη (πυκνότητα $1 \times 10^6/10\text{cm}$ πιάτου καλλιέργειας)
- Την επόμενη μέρα τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και προστίθενται 10 ml κανονικού hESC θρεπτικού μέσου παρουσία 4 ng/ml bFGF. Το θρεπτικό μέσο συλλέγεται την επόμενη μέρα και προστίθεται νέο θρεπτικό, το οποίο συλλέγεται την επόμενη μέρα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 6 διαδοχικές μέρες.
- Το θρεπτικό υλικό που συλλέγεται καλείται Conditioned Medium (CM)
- Το CM μπορεί να αποθηκευτεί παγωμένο για αρκετούς μήνες. Πριν την χρήση του φιλτράρεται και προστίθεται επιπλέον 4 ng/ml bFGF.

❖ Χρήση κανονικού θρεπτικού υλικού hESC με αυξημένη συγκέντρωση του bFGF (100 ng/ml)

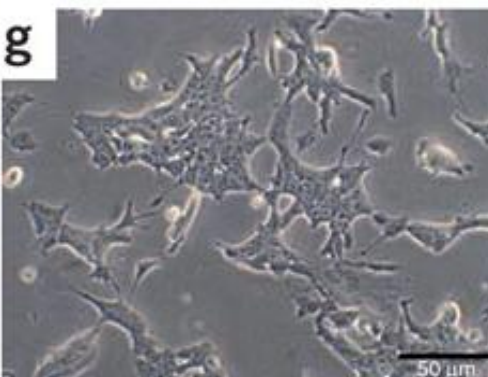
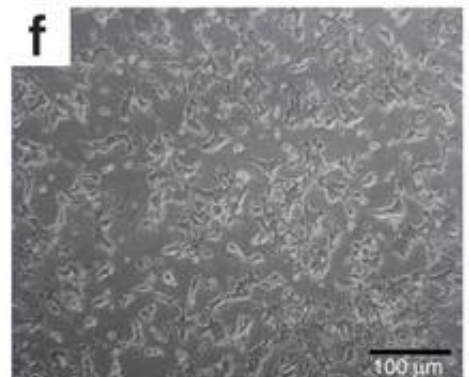
Καλλιέργεια mESC απουσία και παρουσία κυττάρων feeder



παρουσία κυττάρων feeder



απουσία κυττάρων feeder
3 μέρες μετά από πέρασμα



απουσία κυττάρων feeder
1 μέρα μετά από πέρασμα d,e

Καλλιέργεια hESC απουσία κυττάρων feeder

- Matrigel (BD Biosciences) χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα προσκόλλησης σε καλλιέργειες hESC
- Matrigel = ζελατινώδες μείγμα πρωτεϊνών που εκκρίνεται από καρκινικά κύτταρα ποντικού
Έχει ετερογενή σύσταση και η ακριβής του σύσταση είναι άγνωστη
Κύρια συστατικά του Matrigel είναι δομικές πρωτεΐνες (λαμινίνη, κολλαγόνο)
Περιέχει αυξητικούς παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες σε μικρά ποσά
- Επικάλυψη πιάτου καλλιέργειας με 5% Matrigel σε DMEM, O/N, σε 4 °C.
Πριν την χρήση η επώαση 30 min σε 37 °C οδηγεί σε σχηματισμό λεπτής στοιβάδας που καλύπτει την επιφάνεια του πιάτου
- Μεταφορά κυττάρων σε πιάτο με Matrigel και προσθήκη θρεπτικού υλικού (CM παρουσία 4 ng/ml bFGF ή θρεπτικού hESC με 100 ng/ml bFGF).
Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται καθημερινά → κανονική ανάπτυξη αποικιών και διατήρηση της μορφολογίας τους (παρόμοια με χρήση MEF)

Εφαρμογές έρευνας βλαστοκυττάρων

Μελέτη βιολογικών διαδικασιών

Ανακάλυψη-ανάπτυξη φαρμάκων

Θεραπεία ασθενειών μέσω μεταφοράς κυττάρων

