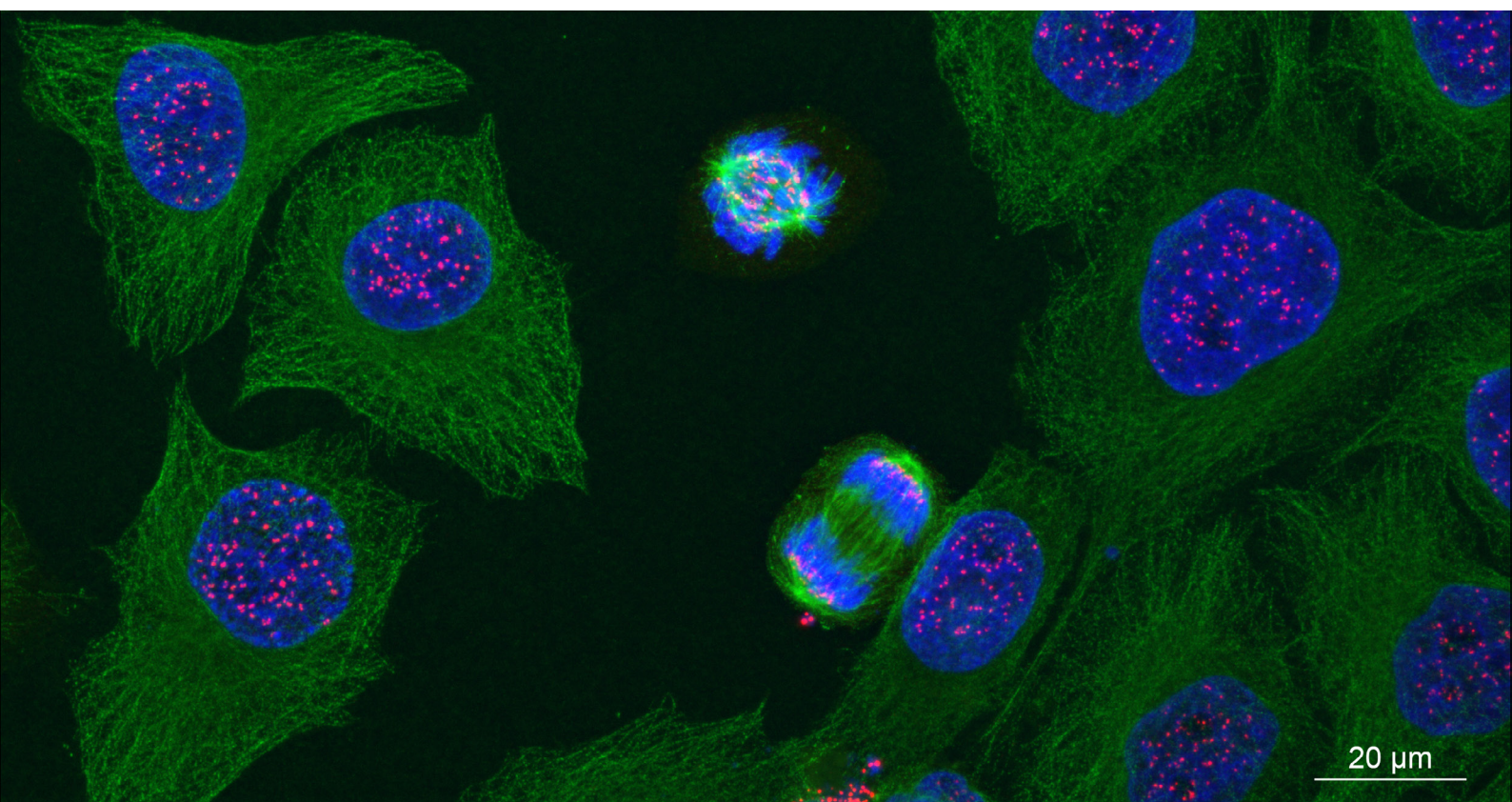


De mest använda odödliga cellinjerna

En introduktion



Seeing beyond

Författare: Dr. Johannes Amon

Der Kommunikator & BitesizeBio, München, Tyskland

Anke Koenen

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Tyskland

Datum: Juli 2022

Odödliga cellinjer används ofta i forskning i stället för primärceller. De erbjuder flera fördelar, till exempel att de är kostnadseffektiva, lätta att använda, ger obegränsad tillgång till material och kringgår etiska problem i samband med användning av djur- och mänsklig vävnad. Cellinjer ger också en ren population av celler, vilket är värdefullt eftersom det ger ett konsekvent prov och reproducerbara resultat. Cellinjer har revolutionerat vetenskaplig forskning och används i vaccinproduktion, testning av läkemedelsmetabolism och cytotoxicitet, antikroppsproduktion, studie av genfunktion, generering av konstgjorda vävnader (t.ex. konstgjord hud) och syntes av biologiska föreningar, t.ex. terapeutiska proteiner. Denna pedagogiska vägledning från ZEISS ger dig grunderna i att arbeta med cellinjer inklusive intressant bakgrundsinformation och ytterligare användbara resurser.

Det är dags för oss att odla våra celler bättre och gå från 2D till 3D-modeller och bättre försöka replikera den miljö där celler normalt lever och sedan ändra miljön för att efterlikna sjukdomar." [1]

Humana primärceller kontra odödliga cellinjer – en jämförelse

Vid undersökning av cancerbehandlingar eller giftigheten hos föreningar eller läkemedel för att studera utvecklingen av cancer använder forskare rutinmässigt cellinjer som en modell för frisk eller sjuk vävnad. Beslutet om användning av humana primärceller eller odödliga cellinjer beror på olika faktorer:

Humana primärceller tas direkt från vävnad från friska donatorer, organ donationer, kirurgiska prover, fostervävnad eller post mortem-donatorer och förvaras därefter i kultur. De har samma morfologi och fenotyp som den ursprungliga källan, men kan också innebära svårigheter. Primärceller i odling har ofta ett begränsat antal replikationscykler och dör efter en viss livslängd. När de åldras visar de morfologiska och funktionella förändringar. Källan till humana primärceller är också begränsad eftersom man kanske inte kan få extra material från samma givare vilket innebär att forskare inte kan upprepa sina experiment på identiska celler eller använda samma celler för utökade studier och långsiktiga experiment. Dessutom behöver olika typer av celler olika medier för att växa och överleva.

Om du är intresserad av mer information om primära humana cellinjer, se Richter et al., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021. [2]

Odödliga celler klarar till största delen av dessa problem.

Forskare som planerar att undersöka grundläggande biologiska processer, manipulera cellulära funktioner, etablera nya metoder eller utföra preliminära screeningar tenderar att välja odödliga cellinjer eftersom de erbjuder en enkel, billig och stabil plattform. De odlas i speciella kärl som petriskålar, kolvar eller fat med flera brunnar i en kontrollerad miljö under längre tid. Kulturmedier som innehåller näringsämnen och valfria tillägg ger de nödvändiga förutsättningarna för optimerad celltillväxt. Odödliga celler replikeras på obestämd tid och ser till att det alltid finns ett konstant utbud av snabbt växande celler för experiment tillgängliga. Odödliga celler upptäcktes först på 1950-talet med den mest kända HeLa-cellinjen. Cellbiologen George Otto Gey tog en cancercell från Henrietta Lacks, lät cellen dela sig och fann att kulturen överlevde på obestämd tid om den fick näringsämnen och en lämplig miljö. Eftersom de ursprungliga cellerna fortsatte att mutera finns det nu många stammar av HeLa kommersiellt tillgängliga, alla härledda från samma enda tumörcell.



Figur 1 Staty av Henrietta Lacks. Upphovsrätt: Bristol universitet [3]

	Humana primärceller	Odödliga cellinjer
Ursprung och tillgänglighet	Isolerad från frisk vävnad eller cancervävnad, begränsad tillgänglighet	Utvunnen från primär cellodling, kommersiellt tillgänglig
Karakteristik och tillämpningar	Genetiska komponenter förblir som ursprungsvävnaden för att studera cellers och vävnaders biologi, läkemedel och läkemedelstester.	Enhetlig genetik över celler, konsekventa och reproducerbara resultat för vaccin- och antikroppsproduktion och för att undersöka genfunktioner
Kultivering och hantering	Kräver särskilda medier och anpassade odlingsförhållanden, svår hantering.	Vanliga media och odlingsförhållanden, enkel hantering
Morfologi och fenotyp	Frisk cellmorfologi, behåll ursprunglig fenotyp under begränsad tid	Brist på viktiga morfologiska egenskaper, förändringar i fenotypen.
Genom och senescens	Genetiskt stabilt, begränsad självförnyelse i kulturen.	Förändrat genomiskt innehåll, kan odlas och utökas
Reproducerbarhet och relevans	Låg reproducerbarhet, hög relevans in vivo	Hög reproducerbarhet, låg relevans in vivo

Tabell 1 Jämförelse av primär cellodling kontra odödliga cellinjer

Typer av odödliga cellinjer

Animala cellinjer och humana cellinjer används ofta i laboratorier. Huvudskillnaden är att den animala cellen kan ha olika storlekar av genom beroende på art medan den humana cellen har 3 miljarder baspar i sitt genom. Antalet proteinkodande gener i genomet hos en animal cell beror också på arten medan det humana genomet består av 20 000 till 25 000 proteinkodande gener.

Forskare använder animala celler för att undersöka ett stort antal sjukdomsmekanismer och bedöma nya terapier. Förutom sjukdomsmodeller är många animala celler beroende av bioindustriella användningsområden såsom rekombinant proteinuttryck, virusproduktion, patogendetektering och toxicitetsscreening. Animala celler kan också ge insikter på områden inom utvecklingsbiologi, intracellulär signalering och genetisk evolution.

Animala cellinjer	Humana cellinjer
CHO (Kinesisk hamsteräggstock)	HeLa (livmoderhalscancer)
COS-7 (grön apnjure)	SH-SY5Y (neuroblastom)
Vero (grön apnjure epitelial)	HEK 293 (embryonal njure)
MDCK (Madin-Darby kaninnjure)	MCF-7 (bröstcancer)
Sf9 epitelceller från insekter	H1, H9 (stamceller från embryon)

Tabell 2 Översikt över utvalda animala- och humana cellinjer

Utvalda exempel

HeLa-cellinje

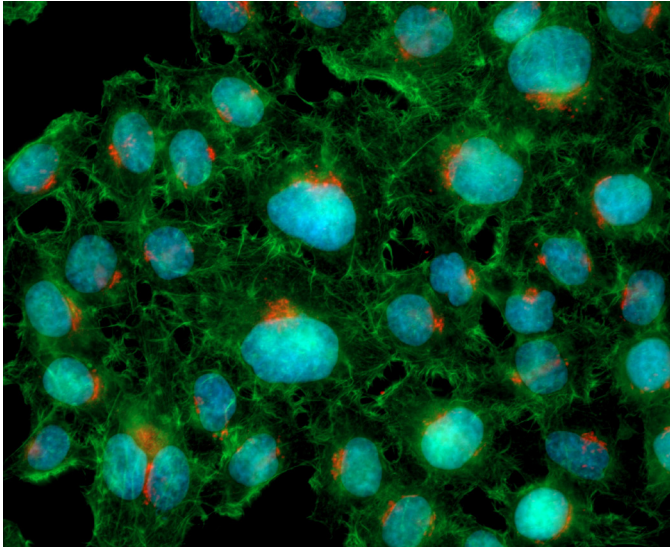
HeLa-cellinjen är den första och även den mest kända odödliga cellinjen. Denna cellinje är uppkallad efter Henrietta Lacks, en afroamerikansk kvinna som dog av cancer den 4 oktober 1951. I februari 1951 togs cancerceller från hennes livmoderhals och började odlas. Denna cellinje visade sig vara anmärkningsvärt hållbar och prevalent samt delade sig nästan oändligt. HeLa-celler användes för att utveckla det berömda poliovaccinet och de fortsätter att vara den mest använda cellinjen i forskningslaboratorier över hela världen.

Användning

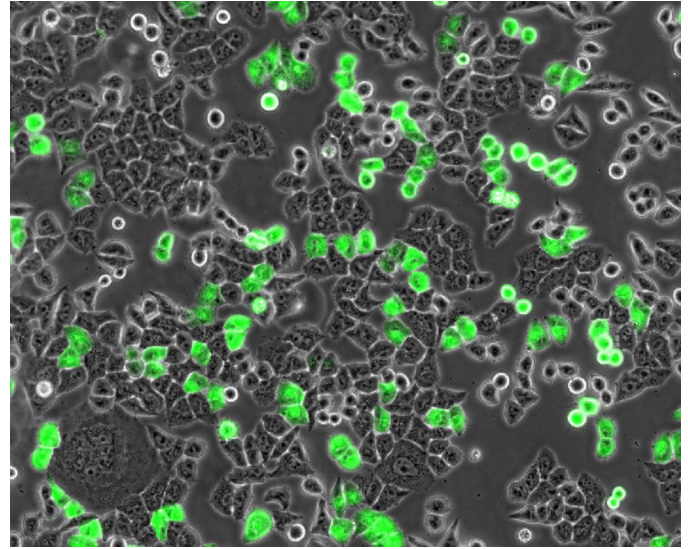
Även om den första användningen var i cancerforskning, har HeLa-celler använts i mer än 100 000 vetenskapliga publikationer om en rad ämnen inklusive cancer, cellbiologi, genetik och infektionssjukdomar. HeLa-celler har bidragit till många medicinska genombrott och lett till nästan 11 000 patent. De ledde till och med till upptäckter som har förtjänat Nobelpris.

Höjdpunkter i medicinska genombrott som möjliggörs av HeLa-celler:

- Utveckling av poliovaccin: poliovaccinet utvecklades redan i början av 1950-talet av Jonas Salk, men han kämpade för att hitta ett sätt att testa i fältförsök. 1952 utvärderades HeLa-celler som en idealisk källa till värdceller.
- Undersökning av leukemi
- Förbättrade cellodlingsmetoder: under massproduktionen och distributionen av HeLa-celler för poliovaccintestning utvecklade de ledande forskarna vid Tuskegee universitetet nya cellodlingsprotokoll inklusive användning av inkubatorer och nya leveranslösningar.
- Kromosomräkning: 1953 blandade ett laboratorium i Texas av misstag cellinjer så att forskarna kunde se och räkna varje kromosom tydligt i HeLa-cellerna de arbetade med. Efter denna upptäckt utvecklade Tijo och Levan en teknik för färgning och räkning av kromosomer, vilket visar att humana somatiska celler har 23 kromosompar. Idag vet vi att avvikelser från 23 kromosompar är förknippade med olika genetiska sjukdomar.
- Kartläggning av genom: Harris och Watkins skapade de första hybriderna mellan människa och djur 1965 genom att kombinera HeLa-celler med musceller.
- Vaccin mot humant papillomvirus (HPV): På 1980-talet fann Harald zur Hausen att Henriettas celler innehöll HPV-18, vilket ledde till utvecklingen av HPV-vaccin.



Figur 2 Fast odlade HeLa-celler. Blå: DNA (DAPI), grönt: F-actin (phalloidin-Alexa-fluor 488), rött: trans-Golgi-nätverk (TGN-Alexa-fluor 561).



Figur 3 HeLa-celler transfekterades med GFP-expressionsplasmid

Historik

Johns Hopkins Hospital i Baltimore var det sjukhus som Henrietta Lacks besökte efter att hon hade känt en knöl i sin livmoder. Det byggdes 1889 för sjuka och fattiga och var det enda större sjukhuset i regionen som behandlade svarta patienter. Det var inte ovanligt att dessa patienter användes som forskningsobjekt. Läkarna ansåg att detta var en skälig kompensation för deras annars kostnadsfria behandling. Patienterna upplystes inte alltid att deras fall användes i forskningsändamål.

Henriettas gynekolog Wesley Telinde hade utvecklat en teori om livmoderhalscancer som drastiskt skulle kunna minska antalet dödsfall i livmoderhalscancer om den visade sig vara riktig. Nästan alla inom området var skeptiska till hans idéer, men han var övertygad om att karcinom in situ var ett tidigt stadium av det mer dödliga invasiva karcinomet, istället för en distinkt typ som bara behövde mildare behandling. Han föreslog att karcinom in situ skulle behandlas på samma aggressiva sätt som invasiva cancerformer, för att förhindra att det sprids. Telinde ville bevisa sin teori genom att visa att karcinom in situ och invasivt karcinom beter sig på samma sätt i laboratoriet. Han gav ett prov av Henriettas livmoderhalscancer till George Otto Gey, som drev ett forskningslaboratorium för vävnadskulturer tillsammans med sin fru Margaret. Cellerna förblev inte bara levande utan delade och fördubblade sig varje dygn. Den första mänskliga odödliga cellinjen var en realitet. Snart blev andra forskare intresserade och George Gey skickade flaskor till laboratorier över hela jorden.

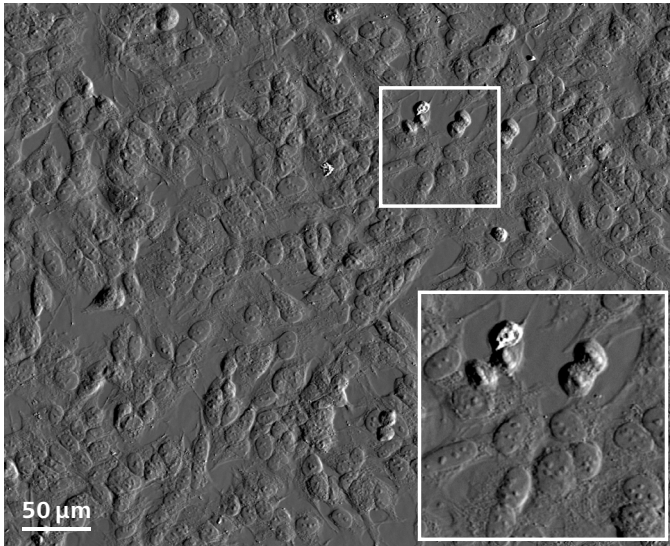
HEK 293

HEK 293 är mänskliga embryonala epitelceller från njuren som ursprungligen isolerades och odlades av biologen Alex van der Eb från Nederländerna i början av 1970-talet. Frank Graham införlivade adenovirala gener Ad5 i cellerna – vilket gjorde att de kunde producera mycket höga nivåer av rekombinanta proteiner. Som ett resultat fick de en robust cellinje med lågt underhåll som delade sig snabbt och har ett gott rykte för post-translational modifiering av sina heterologiskt uttryckta proteiner. Deras cellfördubblingstid är ungefär var 36:e timme. De kan odlas i suspension eller som ett monolager och har använts i stor utsträckning i cellbiologisk forskning i många år på grund av deras tillförlitliga tillväxt och benägenhet för transfektion. Men om de odlas under en längre tid försämras deras hälsa. Detta kan påverka tillväxttakten och översättningseffektiviteten, så de tenderar att bli mindre tillförlitliga när det gäller experimentella resultat. Men eftersom de växer ganska snabbt och är enkla att behålla, börjar forskare bara ett nytt förlopp. Om det finns behov av en cellinje som kan producera stora mängder rekombinanta proteiner, eller om du är en nybörjare inom cellodling som letar efter en cellinje med lågt underhåll, kan HEK293 vara ett bra val.

Användning

På grund av deras fördelar och mångsidighet är de den näst mest använda cellinjen efter HeLa. HEK 293 är den cellinje som väljs

- i övergående och stabila transformationsexperiment,
- för proteinuttryck och proteinproduktion,
- i elektrofysiologiska experiment,
- för transfektionsstudier,
- för att producera terapeutiska proteiner och virus för genterapi.



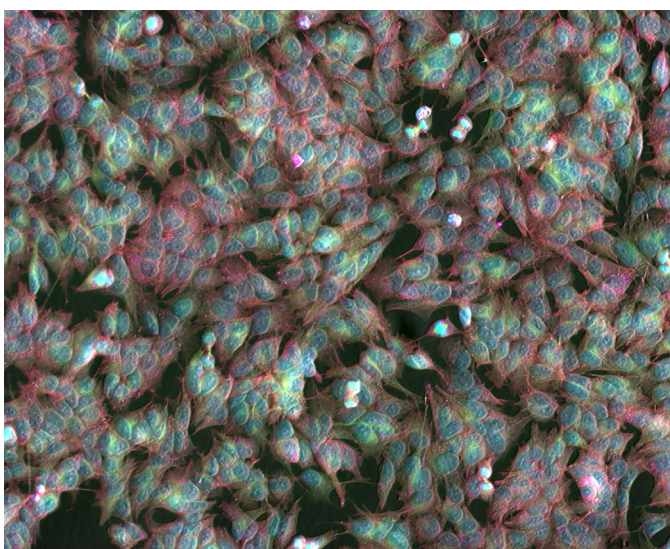
Figur 4 SH-SY5Y-celler odlad på en 384 mikrowell-platta. Femkanalsbild vid en enda position med Plan-Apochromat 20x/0,95. EDF från Z-stack, fasgradientkontrast, överlagrad bild. Prov med tillstånd av P. Denner, Core Research Facilities, German Center of Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn, Tyskland.

SH-SY5Y

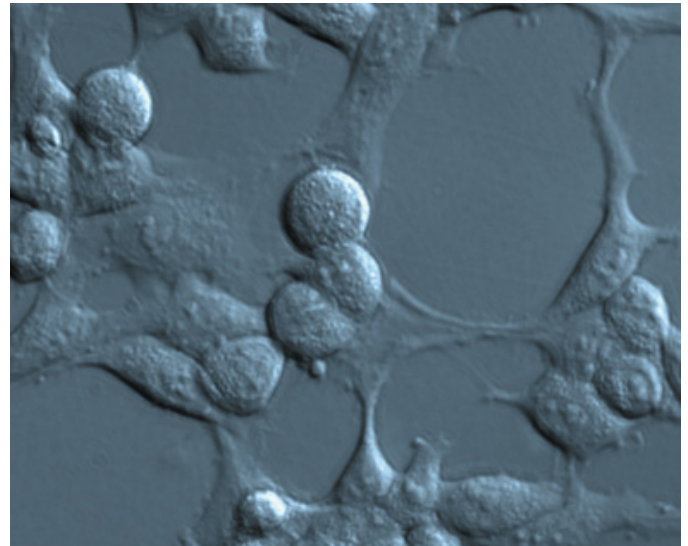
SH-SY5Y är en human cellinje som används i vetenskaplig forskning. Den ursprungliga cellinjen, kallad SK-N-SH, från vilken den subklonades, isolerades från en benmärgsbiopsi som togs från en fyraårig flicka med neuroblastom.

Användning

SH-SY5Y-celler används ofta som in vitro-modeller av neuronal funktion och differentiering. De är adrenerga i fenotyp men uttrycker också dopaminerga markörer och har som sådan använts för att studera Parkinsons sjukdom, neurogenes och andra egenskaper hos hjärnceller.



Figur 6 SH-SY5Y-celler odlad på en 384 mikrowell-platta. Femkanalsbild vid en enda position med användning av objektivet 20x/0,95. (Utökad skärpedjup från Z-stack) Hoechst - kromatin, anti-alpha-tubulin-antikropp FITC för alfa-tubulin (grönt), Phalloidine för aktin (rött), MitoTracker deepRed för mitokondrier (lila). Prov med tillstånd av P. Denner, Core Research Facilities, German Center of Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn, Tyskland.



Figur 5 HEK-celler, PlasDIC. Prov med tillstånd av C. Lücking, Institutet för neurogenetik, Klinikum Großhadern, Tyskland.

CHO

CHO-celler (Kinesisk hamsteräggstock) är en epitelial cellinje härledd från äggstocken hos den kinesiska hamstern. Den kinesiska hamstern som används i biomedicinsk forskning klassificeras traditionellt som *Cricetulus griseus*.

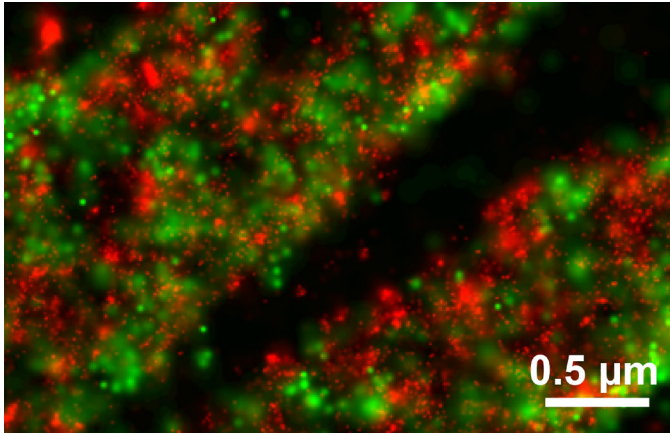


Figur 7 Kinesisk hamster; *allocricetulus* – stock.adobe.com

Den ursprungliga cellinjen skapades på 1950-talet. Den kinesiska hamstern har fungerat som modellvärd för odling på grund av sin lilla storlek, korta graviditetsperiod och **låga antal däggdjurskromosomer**, samtidigt som den kan upprätthålla långsiktigt, stabilt genuttryck och ge höga utbyten av proteiner. Den kinesiska hamstern har en låg förekomst av spontana och endogena virusinfektioner. CHO kan existera både som vidhäftande eller suspensionsceller i odling.

Användning

CHO har blivit en viktig cellinje från däggdjur som används för industriell produktion av glykosylerade terapeutiska proteiner och i cytogenetiska toxicitetsanalyser.



Figur 8 Dubbel färg PALM av CHO-celler (Kinesisk hamster livmodersceller). Med tillstånd av H. Shroff & H. Hess, HHMI Janelia Farm, Ashburn, USA.

COS-7

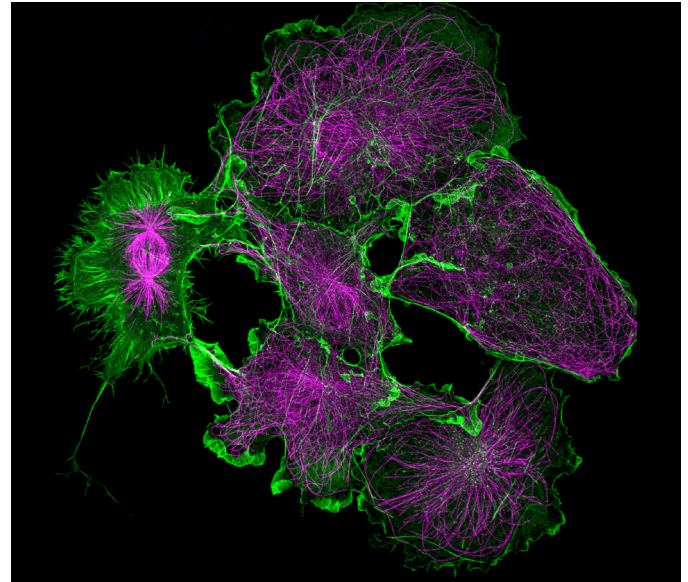
Dessa celler kommer från njurceller från afrikansk grön apa och är också kända som icke-steroidogena celler. De grundades av professor Yakov Gluzman 1981. Akronymen "COS" kommer från att cellerna har CV-1 (simian) ursprung och bär på det genetiska materialet SV40. Tre COS-linjer skapades (COS-1, COS-3 och COS-7), varav två används allmänt (COS-1 och COS-7). Under odling visar COS-7-celler karakteristiskt att de växer fast på glas- och plastytor och är fibroblastliknande. Kombinationen av fibroblastliknande tillväxt och viruskänslighet gör COS-7 till ett utmärkt val för transfektionsexperiment för DNA-plasmider och mutationer mot SV40-virus. SV40-viruset fortsätter att användas på grund av dess förmodade inblandning i cancer hos människor.



Figur 9 Grön apa – *Chlorocebus aethiops*; David Havel – stock.adobe.com

Användning

COS-7-celler används ofta av biologer när de studerar apviruset SV40 och i transfektionsexperiment för att producera rekombinanta proteiner för molekylärbiolegisk, biokemisk och cellbiologisk forskning.



Figur 10 COS-celler märkta för aktin (grönt) och mikrotubuli (magenta). Provtillstånd av C. Leterrier, Institutet för neurofysiologi, Fakulteten för medicinska och paramedicinska vetenskaper, Marseille, Frankrike.

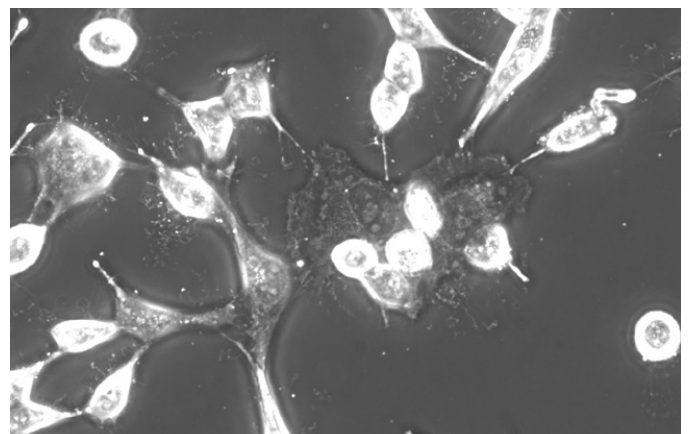
MDCK

Madin-Darby hundnjureceller (MDCK) är en modell däggdjurscellinje som används i biomedicinsk forskning. Efter den första isoleringen 1958 av epitelceller från njurkanalen hos en vuxen Cocker Spaniel-hund av Stewart H. Madin och Norman B. Darby Jr., användes cellinjen med deras namn främst som en modell för virusinfektion av däggdjursceller. Det är en av få cellodlingsmodeller som är lämplig för 3D-cellodling och flercelliga omarrangemang som kallas förgreningsmorfogenes.

Användning

MDCK-celler används för en mängd olika cellbiologiska studier inklusive

- cellpolaritet,
- vidhäftningar mellan cell till cell (så kallade adherenskorsningar),
- kollektiv cellrörelse,
- samt svar på tillväxtfaktorer.



Figur 11 DIC, MDCK-celler (hund) – tjocka cellområden visas bättre med negativ faskontrast. Tillstånd från R. Nitschke, Life Imaging Center, Freiburgs universitet, Tyskland.

Referenser

- [1] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5414769>
- [2] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.711381/full>
- [3] <https://www.bristol.ac.uk/research/impact/stories/hela-cells>



Carl Zeiss Microscopy GmbH

07745 Jena, Tyskland
microscopy@zeiss.com
www.zeiss.com/routine