

Стандартная операционная процедура «Получение церебральных органоидов из плюрипотентных стволовых клеток человека»

Составлено: Т.А. Шнайдер, м.н.с., А.Г. Мензоров, к.б.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол получения церебральных органоидов из плюрипотентных стволовых клеток человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Человеческий мозг является одним из самых сложных органов. Он имеет как сложную клеточную архитектуру, так и выполняет сложные функциональные задачи. Не удивительно, что исследователей давно интересовали процессы его развития, становления и функционирования, однако недоступность органа для различных экспериментальных манипуляций всегда препятствовала прогрессу в этой области. Многие выдающиеся результаты были получены на модельных животных, прежде всего грызунах и человекообразных обезьянах. Однако данные объекты слишком далеки в структурном отношении от мозга человека. Стремительное развитие методов клеточной биологии позволило реконструировать некоторые аспекты пространственной организации нервной ткани человека и процесса её дифференцировки. Одним из самых выдающихся достижений последних лет является разработка системы церебральных органоидов (ЦО) из плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, которая позволяет реконструировать трёхмерную цитоархитектонику некоторых отделов головного мозга [1, 2]. Данная технология представляет собой абсолютно новую и уникальную модель, позволяющую воссоздавать начальные этапы развития головного мозга человека и исследовать поведение нервных клеток в условиях максимально приближенных к *in vivo*. Особую ценность ЦО представляют для изучения патологических изменений фетального головного мозга, вызванных различными хромосомными [3, 4] или инфекционными заболеваниями [5]. Установление молекулярно-генетических и клеточных патологических механизмов многих болезней на модели ЦО может помочь в разработке потенциальных лекарственных препаратов [6] и, в конечном итоге, служить уникальной системой для их тестирования [7].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение церебральных органоидов из плюрипотентных клеток человека» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ЦО человека для ЦКП «Коллекция плюрипотентных

культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации получения церебральных органоидов из плюрипотентных стволовых клеток человека.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

В ходе работы мы руководствовались: правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартиформ. 2010. 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

Для большей части оборудования ниже не указан производитель, так как можно использовать приборы разных производителей. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Ламинарный шкаф II класса защиты.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Пипеточный дозатор 0,5–100 мл.
- Криоконтейнер (Thermo Fisher Scientific, 5100–0001).
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.

- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- CO₂-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO₂ и 37 °C).
- Термостат на 37 °C.
- Холодильники на -80 °C, -20 °C и +4 °C.
- Инвертированный микроскоп.
- Криохранилище с жидким азотом.
- Орбитальный шейкер.
- Маленький пинцет.
- Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)
- Указанные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому, например, для части пластиковых расходных материалов производитель не указан. В разделе Ожидаемые результаты необходимые материалы приведены в тексте.
- Среда mTeSR1 (StemCell Technology, 858450).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, 21103049)
- FBS (fetal bovine serum, сыворотка крови телят) для ЭС клеток (Thermo Fisher Scientific, 16141079).
- KSR (knockout serum replacement, нокаутный заменитель сыворотки) (Thermo Fisher Scientific, 10828-028).
- Stem Pro Accutase Cell Dissociation Reagent (Thermo Fisher Scientific, A1110501).
- GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038).
- NEAA (non-essential amino acid, не незаменимые аминокислоты) (Thermo Fisher Scientific, 11140050).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- 2-меркаптоэтанол (Thermo Fisher Scientific, 1985023).
- bFGF (basic fibroblast growth factor, основной фактор роста фибробластов) (Thermo Fisher Scientific, 13256029).
- BSA (bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин) (Sigma-Aldrich, A3311).
- Гепарин (Sigma-Aldrich, H3149).
- Y-27632 (ингибитор ROCK-киназ) (StemCell Technologies, 72302).
- Добавка N-2 (Thermo Fisher Scientific, 17502048).
- Добавка B-27 без витамина A (Thermo Fisher Scientific, 12587010).
- Добавка B-27 (Thermo Fisher Scientific, 17504044).

- Инсулин (раствор), (Sigma-Aldrich, i9278).
- Matrigel (Corning, 356234).
- Планшет 96-луночный с U-образным дном и низкоадгезивной поверхностью (Corning, CLS7007).
- Планшет 24-луночный, для работы с суспензионными культурами клеток (Eppendorf, 0030722019)
- Планшет 6-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030720.113).
- Чашка Петри диаметром 100 мм, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030702.115).
- Стерильные серологические пипетки объемом 5, 10 и 25 мл.
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Parafilm® M (парафильм), 5 см x 7600 см
- Линии ПСК человека (ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН).

Подготовка материалов

- Среда для культивирования ПСК человека mTeSR1 (среда для ПСК): mTeSR1 (подготавливается в соответствии с рекомендациями производителя), ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования эмбрионных телец (среда для ЭТ): среда DMEM/F12, 20 % KSR, 3 % FBS, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 100 мкМ 2-меркаптоэтанол, bFGF в рабочей концентрации 4 нг/мл.
- Среда для нейральной индукции ПСК: среда DMEM/F12, ×1 N-2, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, гепарин в рабочей концентрации 1 мкг/мл, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования церебральных органоидов (среда для ЦО): Среда DMEM/F12 и Neurobasal в соотношении 1:1, ×0,5 N-2, ×0,5 B-27, ×0,5 NEAA, ×1 GlutaMAX, инсулин в рабочей концентрации 1 мкг/мл, ×1 пенициллин-стрептомицин, 100 мкМ 2-меркаптоэтанол.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.

- Сток bFGF: растворить 10 мкг bFGF в 200 мл DMEM/F12 с 10 % KRS для получения раствора с концентрацией 50 мкг/мл. Приготовить аликвоты и заморозить для дальнейшего хранения при -20°C .
- Гепарин: растворить 50 мг гепарина в 1 мл $\times 1$ НФБ для получения стокового раствора с концентрацией 50 мг/мл. Хранить приготовленный раствор можно при 4°C в течение двух лет.

Получение церебральных органоидов из плюрипотентных клеток человека

День -5 . Разморозка ПСК человека

1) Подготовить 6-лучный планшет для культивирования ПСК человека. Для этого предварительно разморозить на льду аликвоту матригеля объёмом 50 мкл, растворить в 10 мл холодной среды DMEM/F12 и заполнить лунки раствором, равномерно распределив по всей поверхности. Поместить планшет в термостат на 37°C и оставить минимум на 30 мин. После полимеризации матригеля пробыть два раза теплой средой DMEM/F12. Подготовленные таким образом планшеты для культивирования ПСК человека могут храниться до 7 дней на 4°C .

2) Налить в 10 мл пробирку 9 мл среды для ЭТ.

3) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ПСК человека и поместить на водяную баню на 37°C . Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

4) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 500 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку. Для увеличения выживаемости клеток в среду добавить ингибитор ROCK киназ Y-27632 в конечной концентрации 1 мМ.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2 -инкубатор.

День -3 . Пересадка ПСК человека

6) ПСК должны иметь плотность 70–90 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить 0,5 мкл Stem Pro Accutase и перенести в термостат на 37°C . Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

7) После округления клеток ресуспендировать в 2–3 кратном избытке среды для ПСК до образования суспензии единичных клеток и рассадить в соотношении 1:3–1:6. В течение первых трех дней в среду для культивирования ПСК добавлять ингибитор ROCK

киназ Y-27632 в конечной концентрации 1 мМ для того, чтобы повысить выживаемость клеток.

День 0–6. Формирование ЭТ из ПСК человека

8) ПСК должны иметь плотность 70–90 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить 0,5 мкл Stem Pro Accutase и перенести в термостат на 37 °С. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

9) После округления клеток ресуспендировать в 2–3 кратном избытке среды для ПСК до образования суспензии единичных клеток и рассадить в 96-луночные планшеты с U-образным дном в среду для культивирования ЭТ в количестве 9000 клеток/лунку. Объем среды в каждой лунке должен быть не менее 150 мкл.

10) Производить смену среды в течение следующих 5-ти дней с добавлением ингибитора ROCK киназ Y-27632 в конечной концентрации 1 мМ и наблюдать за изменением морфологии и размеров ЭТ (они должны иметь шарообразную форму с четко различимыми границами).

День 6–11. Индукция нейральной дифференцировки в ЭТ.

11) К этому дню ЭТ должны достигнуть 500–600 мкм в диаметре и иметь гладкую поверхность. Перенести каждое ЭТ в 24-луночный планшет для культивирования суспензионных клеток в 500 мкл среды для нейральной индукции. Для предотвращения механических повреждений ЭТ перенос следует осуществлять пластиковым носом на 200 мкл, предварительно обрезав его узкую часть.

12) Сменить среду через 48 ч после переноса ЭТ в 24-луночный планшет. Наблюдать за морфологическими изменениями ЭТ при индукции нейральной дифференцировки. При просмотре под световым микроскоп через 3–5 дней должны появляться области нейроэпителля с характерной радиальной организацией и псевдостратификацией клеточных слоев.

День 12–90. Перенос ЦО с индуцированной нейроэпителлиальной дифференцировкой в матригелевый каркас и культивирование.

13) Разморозить на льду аликвоту матригеля объемом 500 мкл.

14) Подготовить подложку из парафила для формирования капель матригеля. Для этого наложить квадрат парафила на поверхность пустого лотка для пластиковых носов 200 мкл, аккуратно надавить на каждое отверстие в лотке для формирования небольших лунок в парафиле. Поскольку парафил не стерилен, провести стерилизацию полученных подложек, обработав УФ в течение 30 мин, предварительно поместив их в чашки Петри.

15) Перенести каждый ЦО в лунку подложки из парафильма. Для предотвращения механических повреждений ЦО перенос следует осуществлять пластиковым носом на 200 мкл с обрезанной узкой частью. Так же необходимо предотвратить пересыхание ЦО в момент переноса и заключения в матригелевый каркас. Для этого настоятельно рекомендуется одновременно осуществлять перенос не более 16 ЦО.

16) Полностью удалить остатки среды, окружающей ЦО в лунках подложки и сразу же добавить каплю матригеля объемом 25–30 мкл. При помощи пластикового носа на 10 мкл выровнять и установить ЦО в центре капли матригеля.

17) Поместить чашки Петри с подложками из парафильма и заключенными в матригелевый каркас ЦО для полимеризации внеклеточного матрикса в CO₂-инкубатор при 37 °C на 30 мин.

18) Добавить в новую чашку Петри 12 мл среды для ЦО. Аккуратно перенести ЦО, заключенные в капли матригеля в среду, используя пластиковые носики на 10 мкл и маленький пинцет. В первые 4 дня культивирования среда должна содержать добавку В-27 без витамина А. Переместить чашки Петри в CO₂-инкубатор.

19) Сменить среду для ЦО через 48 ч и продолжить культивирование ещё в течение 48 ч.

20) Сменить среду для ЦО, содержащую добавку В-27, содержащую витамин А. Смену среду производить не полностью, оставляя 2–3 мл, для того чтобы избежать подсушивания ЦО.

21) Расположить в CO₂-инкубаторе орбитальный шейкер, установив рабочий режим 85 об/мин и поместить чашки Петри с ЦО на платформу орбитального шейкера.

22) Культивировать ЦО, меняя среду каждые 3–4 дня. Продолжительность культивирования зависит от целей эксперимента (от 1 до 9 месяцев).

При подготовке СОП «Получение церебральных органоидов из плюрипотентных стволовых клеток человека» использованы следующие литературные источники:

1 Lancaster M.A., Knoblich J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells // *Nat Protoc.* 2014. 9(10). 2329–2340.

2 Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurles M.E., Homfray T., Penninger J. M., Jackson A.P., Knoblich J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // *Nature* 2013. 501(7467). 373–379.

3 Bershteyn M., Nowakowski T.J., Pollen A.A., Di Lullo E., Nene A., Wynshaw-Boris A., Kriegstein A.R. Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of

Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia // *Cell Stem Cell*. 2017. 20(4). 435–449.

4 Iefremova V., Manikakis G., Krefft O., Jabali A., Weynans K., Wilkens R., Marsoner F., Brändl B., Müller F.J., Koch P., Ladewig J. An Organoid-Based Model of Cortical Development Identifies Non-Cell-Autonomous Defects in Wnt Signaling Contributing to Miller-Dieker Syndrome // *Cell Rep*. 2017. 19(1). 50–59.

5 Qian X., Nguyen H.N., Song M.M., Hadiono C., Ogden S.C., Hammack C., Yao B., Hamersky G.R., Jacob F., Zhong C., Yoon K.J., Jeang W., Lin L., Li Y., Thakor J., Berg D.A., Zhang C., Kang E., Chickering M., Nauen D., Ho C.Y., Wen Z., Christian K.M., Shi P.Y., Maher B.J., Wu H., Jin P., Tang H., Song H., Ming G.L. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure // *Cell*. 2016. 165(5). 1238–1254.

6 Li C., Deng Y.Q., Wang S., Ma F., Aliyari R., Huang X.Y., Zhang N.N., Watanabe M., Dong H.L., Liu P., Li X.F., Ye Q., Tian M., Hong S., Fan J., Zhao H., Li L., Vishlaghi N., Buth J.E., Au C., Liu Y., Lu N., Du P., Qin F. X., Zhang B., Gong D., Dai X., Sun R., Novitch B.G., Xu Z., Qin C.F., Cheng G. 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model // *Immunity*. 2017. 46(3). 446–456.

7 Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells // *Nature*. 2008. 455(7213). 627–632.