

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sara LADINEK

**UPORABA TEHNOLOGIJE FENOTIPSKIH
MIKROMREŽ ZA IZBOLJŠANJE RASTI IN
PRODUKTIVNOSTI INDUSTRIJSKIH SESALSKIH
CELIČNIH LINIJ CHO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sara LADINEK

**UPORABA TEHNOLOGIJE FENOTIPSKIH MIKROMREŽ ZA
IZBOLJŠANJE RASTI IN PRODUKTIVNOSTI INDUSTRIJSKIH
SESALSKIH CELIČNIH LINIJ CHO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**PHENOTYPE MICROARRAY TECHNOLOGY APPLICATION FOR
GROWTH AND PRODUCTIVITY IMPROVEMENT OF
INDUSTRIAL MAMMALIAN CHO CELL LINES**

M.SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v farmacevtski družbi Lek d.d., v laboratoriju za razvoj bioprocsov, Biofarmacevtika, Mengeš.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 11. junija 2014 za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat, za recenzetko pa prof. dr. Polono Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Recenzentka: prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Alojz IHAN Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Članica:	prof. dr. Mojca NARAT Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Članica:	prof. dr. Polona JAMNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Sara Ladinek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 602.4:606:615:577.2.088 = 163.6
KG	celične linije CHO /fenotipske mikromreže/Omnilog/tetrazolijeva barvila/DoE /izboljšanje gojišč/specifična produktivnost/bioproc
AV	LADINEK, Sara, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	NARAT, Mojca (mentorica) / JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2014
IN	UPORABA TEHNOLOGIJE FENOTIPSKIH MIKROMREŽ ZA IZBOLJŠANJE RASTI IN PRODUKTIVNOSTI INDUSTRIJSKIH SESALSKIH CELIČNIH LINIJ CHO
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XII, 88 str., 15 pregl., 51 sl., 2 pril., 39 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AB	Proizvodnja rekombinantnih proteinov v farmacevtski industriji večinoma poteka v sesalskih celičnih linijah, izmed njih so najpogostejše uporabljene celice kitajskega hrčka (CHO). Kljub velikemu napredku na področju tehnologije rekombinantne DNA, pa so stroški proizvodnje zaradi nizkih izkoristkov teh bioloških sistemov še vedno visoki. Rast in produktivnost celičnih linij po vnosu tuje DNA lahko izboljšamo predvsem z optimizacijo sestave rastnih in produkcijskih gojišč, ki nato omogočajo uporabo celotnega metabolnega potenciala celic. Za namen optimizacije sestave rastnega gojišča smo uporabili tehnologijo fenotipskih mikromrež, ki omogoča hkratno proučevanje 367 različnih metabolnih poti. Tehnologija temelji na kvantifikaciji respiracije celic preko redukcije tetrazolijevih barvil. S to tehnologijo lahko zaznamo tudi fenotipe, ki ne vodijo v rast celic. S pomočjo metodologije načrtovanja eksperimentov (ang. Design of Experiments) smo razvili protokol, ki omogoča primerjavo fenotipov visoko sorodnih celičnih linij CHO na fenotipskih mikromrežah. Na podlagi rezultatov fenotipizacije, smo za izbrano celično linijo optimizirali rastno gojišče. Iz rezultatov je bilo razvidno, da dodatek nukleozidov ali piruvata v rastno gojišče zavre rast celic in poviša specifično produktivnost za vsaj 40 %. Izbrana celična linija pa lahko namesto glukoze, kot alternativna vira ogljika izkorišča tudi galaktozo in manozo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDK
CX	CHO cell lines/phenotype arrays/Omnilog/tetrazolium dyes/DoE /growth medium improvment/specific productivity/bioprocess
AU	LADINEK, Sara
AA	NARAT, Mojca (supervisor) / JAMNIK, Polona (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY	2014
TI	PHENOTYPE MICROARRAY TECHNOLOGY APPLICATION FOR GROWTH AND PRODUCTIVITY IMPROVEMENT OF INDUSTRIAL MAMMALIAN CHO CELL LINES
DT	M. SC. THESIS (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO	XII, 88 p., 15 tab., 51 fig., 2 ann., 39 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Recombinant proteins are in the pharmaceutical industry generally produced in Chinese hamster ovary (CHO) cell lines. The product yields in mammalian cell lines are despite great improvements in recombinant DNA technology still low, resulting in high production costs. Growth and productivity of cell lines can be significantly improved by optimizing growth and production media composition which then enables the use of the full metabolic potential of the cell. With this purpose the phenotype microarray technology for simultaneously screening 367 different metabolic pathways was applied. The technology is based on the quantification of cell respiration through the reduction of tetrazolium dyes. Furthermore, detection of phenotypes that do not lead to cell growth is possible. By using the design of experiments methodology a protocol was developed, which enables a comparison of highly related CHO cells lines using phenotype microarrays. Additionally to the protocol, the composition of a growth medium for a selected cell line was optimized. It was observed that the addition of nucleosides or pyruvic acid inhibited cell growth and improved specific productivity of the cells for at least 40 %. The selected cell line can also grow on galactose or mannose as primary carbon source instead of using glucose.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK.....	XII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 TEHNOLOGIJA FENOTIPSKIH MIKROMREŽ	3
2.2 UPORABA TEHNOLOGIJE FENOTIPSKIH MIKROMREŽ	8
2.2.1 Proučevanje funkcije genov.....	8
2.2.2 Proučevanje patogeneze in epidemiologije	8
2.2.3 Zaznavanje okolja in patogeneza – pomembnost metabolnih in temperaturnih signalov.....	9
2.2.4 Proučevanje mikroskopske in makroskopske morfologije.....	9
2.2.5 Fenotipizacija bakterij	10
2.2.6 Uporaba v taksonomiji, identifikaciji, mikrobní ekologiji in evlucijskih študijah.....	10
2.2.7 Izboljšanje industrijskih bioprocesov	11
2.2.8 Uporaba v sistemske biologiji	11
2.2.9 Uporaba fenotipskih mikromrež na glivah	11
2.2.10 Uporaba fenotipskih mikromrež na sesalskih celičnih linijah	12
2.3 PROIZVODNJA BIOFARMACEVTIKOV	13
2.3.1 Celične linije ovarija kitajskega hrčka.....	14
2.3.2 Razvoj produkcijske celične linije	16
2.3.3 Razvoj gojišč in dohranjevalnih substratov.....	17
2.3.4 Razvoj bioprocesa	19
3.1 POTEK DELA	21
3.2 MATERIALI.....	22
3.2.1 Sesalske celične linije	22
3.2.2 Gojišča in dodatki za namnoževanje celic	22

3.2.3 Fenotipske mikromreže in barvila.....	23
3.2.4 Laboratorijska oprema.....	25
3.3 METODE.....	26
3.3.1 Odmrzovanje in namnoževanje celic.....	26
3.3.2 Priprava celic za fenotipsko analizo na mikromrežah.....	26
3.3.3 Optimizacija inkubacijskih pogojev za fenotipsko analizo.....	27
3.3.4 Pregled fenotipskih lastnosti štirih različnih celičnih linij.....	30
3.3.5 Sprememba rastnega gojišča na podlagi rezultatov.....	33
3.3.6 Analitske metode.....	36
3.3.6.1 Določanje fenotipskih lastnosti s pomočjo mikromrež in naprave OmniLog.....	36
3.3.6.2 Določanje koncentracije in deleža živih celic.....	37
3.3.6.3 Določanje koncentracije osnovnih virov ogljika in dušika.....	37
3.3.6.4 Določanje koncentracije galaktoze, manoze in piruvata.....	37
3.3.6.5 Določanje koncentracije monoklonskih protiteles.....	37
4 REZULTATI Z RAZPRAVO.....	38
4.1 OPTIMIZACIJA INKUBACIJSKIH POGOJEV.....	39
4.2 ČAS PREŽIVETJA CELIČNIH LINIJ V GOJIŠČU OS.....	47
4.3 FENOTIPSKA ANALIZA CELIČNE LINIJE A.....	48
4.4 FENOTIPSKA ANALIZA CELIČNE LINIJE B.....	54
4.5 FENOTIPSKA ANALIZA CELIČNE LINIJE C.....	59
4.6 FENOTIPSKA ANALIZA CELIČNE LINIJE D.....	63
4.7 PRIMERJAVA CELIČNIH LINIJ.....	68
4.8 SPREMEMBA RASTNEGA GOJIŠČA CELIČNE LINIJE A.....	71
4.8.1 Uporaba alternativnih sladkorjev.....	72
4.8.2 Uporaba nukleozidov.....	77
4.8.3 Uporaba piruvata in sukcinamidne kisline.....	79
4.9 UPORABA MIKROMREŽ ZA IZBOLJŠANJE BIOPROCESOV.....	83
5 SKLEPI.....	84
6 POVZETEK.....	85
7 VIRI.....	86
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Izbrane celične linije.....	22
Preglednica 2: Uporabljeni dodatki k rastnim gojiščem.....	23
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema	25
Preglednica 4: Seznam izbranih parametrov za optimizacijo inkubacijskih pogojev.	28
Preglednica 5: Seznam poskusov in njihovi parametri.....	29
Preglednica 6: Povzetek bioprocesov s spremembami rastnega gojišča	34
Preglednica 7: Seznam nastavitve parametrov in njihovi rezultati.....	39
Preglednica 8: Rezultati fenotipske analize celične linije A	48
Preglednica 9: Izkoriščanje alternativnih substratov celične linije A	52
Preglednica 10: Rezultati fenotipske analize celične linije B.....	54
Preglednica 11: Izkoriščanje alternativnih substratov celične linije	56
Preglednica 12: Rezultati fenotipske analize celične linije C.....	59
Preglednica 13: Izkoriščanje alternativnih substratov celične linije C	61
Preglednica 14: Rezultati fenotipske analize celične linije D	63
Preglednica 15: Izkoriščanje alternativnih substratov celične linije D	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Tehnologija fenotipskih mikromrež (Biolog Inc., 2014: 9)	4
Slika 2: Shematični prikaz glavnih metabolnih poti (Bochner, 2001: 1247).	5
Slika 3: Razvoj biofarmaceutikov (Jayapal, 2007: 43).....	14
Slika 4: Genetska heterogenost celičnih linij CHO (Wurm 2011: 719).....	15
Slika 5: Različni pristopi razvoja gojišč (Fletcher, 2005:4)	17
Slika 6: Shema poteka magistrske naloge	21
Slika 7: Razporeditev substratov na fenotipski ploščici PM-M1	24
Slika 8: Prikaz eksperimentalnih točk sestavljenega načrta (Zupan, 2009: 45)	28
Slika 9: Shema pregleda fenotipskih lastnosti različnih celičnih linij	32
Slika 10: Shema spremembe rastnega gojišča	35
Slika 11: Redukcija tetrazolijevih soli.....	36
Slika 12: Sistem Omnilog (Biolog Inc., 2014: 5)	36
Slika 13: Analiza minimalnega odziva – povzetek	40
Slika 14: Ocenjevanje ustreznosti modela.....	41
Slika 15: Vrednotenje kakovosti modela za minimalni odziv	42
Slika 16: Enačba modela za minimalni odziv.	43
Slika 17: Odnos med eksperimentalnimi vrednostimi in izračunanimi vrednostmi.....	43
Slika 18: Povezava med koncentracijo celic, razmerjem volumnov celične kulture in barvila ter minimalnim odzivom ob času 0.	44
Slika 19: Krivulje sistemskih odzivov (A,B,C) in zaželeno krivuljo (D)	45
Slika 20: Predlagane rešitve za doseg sistema odziva	46
Slika 21: Preživetje različnih celičnih linij v gojišču Os.....	47
Slika 22: Rastna krivulja in delež živih celic celične linije A	49
Slika 23: Poraba substratov celične linije A	50
Slika 24: Fenotip celične linije A na mikromreži PM-M1	51
Slika 25: Rastna krivulja in izraba substratov celične linije A.....	53
Slika 26: Rastna krivulja in delež živih celic celične linije B	55
Slika 27: Poraba substratov celične linije B	55
Slika 28: Fenotip celične linije B na mikromreži PM-M1.	56
Slika 29: Rastna krivulja in izraba substratov celične linije B.....	58
Slika 30: Rastna krivulja in delež živih celic celične linije C	59

Slika 31: Poraba substratov celične linije C	60
Slika 32: Fenotip celične linije C na mikromreži PM-M1	60
Slika 33: Rastna krivulja in izraba substratov celične linije C	62
Slika 34: Rastna krivulja in delež živih celic celične linije D	63
Slika 35: Poraba substratov celične linije D	64
Slika 36: Fenotip celične linije D na mikromreži PM-M1	65
Slika 37: Rastna krivulja in izraba substratov celične linije D	67
Slika 38: Rastne krivulje štirih celičnih linij	68
Slika 39: Primerjava celičnih linij na fenotipskih mikromrežah PM-M1	69
Slika 40: Rastne krivulje bioprosesov z dodano galaktozo in manozo	72
Slika 41: Poraba substratov v bioprosesu E2	73
Slika 42: Poraba substratov v bioprosesu E4	74
Slika 43: Specifična produktivnost bioprosesov z alternativnimi sladkorji.	75
Slika 44: Hitrost izrabe substratov	75
Slika 45: Rastne krivulje bioprosesov z dodanimi nukleozidi in negativna kontrola	77
Slika 46: Specifična produktivnost bioprosesov z dodanimi nukleozidi i.	78
Slika 47: Rastne krivulje bioprosesov z dodanim piruvatom in sukcinamidno kislino	79
Slika 48: Poraba substratov v bioprosesu E11.	80
Slika 49: Dinamika porabe substratov	80
Slika 50: Poraba substratov v bioprosesu E12.	81
Slika 51: Specifična produktivnost bioprosesov z dodanim piruvatom in sukcinamidno kislino	82

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Protokol za fenotipizacijo celičnih linij CHO s pomočjo mikromrež

PRILOGA B: Podatki pridobljeni iz bioprocsov na podlagi katerih smo izračunali podvojitvene čase, IVC in specifične produktivnosti ter izrisali grafe porabe substratov

PRILOGA B1: Rezultati poskusa E0

PRILOGA B2: Rezultati poskusa E1

PRILOGA B3: Rezultati poskusa E2

PRILOGA B4: Rezultati poskusa E3

PRILOGA B5: Rezultati poskusa E4

PRILOGA B6: Rezultati poskusa E5

PRILOGA B7: Rezultati poskusa E6

PRILOGA B8: Rezultati poskusa E7

PRILOGA B9: Rezultati poskusa E8

PRILOGA B10: Rezultati poskusa E9

PRILOGA B11: Rezultati poskusa E10

PRILOGA B12: Rezultati poskusa E11

PRILOGA B13: Rezultati poskusa E12

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (ang. Chinese hamster ovary)
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DoE	metodologija načrtovanja poskusov (ang. Design of Experiment)
GS	glutamin sintaza
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (ang. Messenger RNA)
MSX	metionin sulfoksiamin
MTX	metotreksat
NADH	nikotinamid adenine dinukleotid
PM-M (1-14)	fenotipska mikromreža za sesalske celice (1 – 14) (ang. Phenotype microarray for mammalian cells)
RNA	ribonukleinska kislina
SF	plastična erlenmajerica za enkratno uporabo (ang. Shake flask)
TCD	Koncentracija vseh celic (ang. Total Cell Density)
VCD	Koncentracija živih celic (ang. Viable Cel Density)

SLOVARČEK

Fenotip	Fenotip predstavlja morfološke in biokemijske lastnosti organizma (tudi celice), ki so posledica interakcije genotipa organizma in vpliva okolja.
Monoklonsko protitelo	Monospecifično in monoafinitetno protitelo, usmerjeno proti enemu antigenu in enemu epitopu.
Sesalski ekspresijski sistem	Sesalske gostiteljske celice, v katere vnesemo transgen s pomočjo genskega inženiringa. Izražanje gena nato poteka v gostiteljskih celicah.
Specifična produktivnost	Količina produkta, ki ga proizvede celica v določeni časovni enoti.
Transgen	Gen ali genetski material, ki je bil prenešen naravno ali s pomočjo tehnik genetskega inženiringa iz enega organizma v drugega
Volumska produktivnost	Količina produkta v določenem volumnu raztopine

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Proizvodnja rekombinantnih proteinov je do 90. let prejšnjega stoletja večinoma potekala v bakterijskih ekspresijskih sistemih. Z razvojem orodij genskega inženiringa za sesalske ekspresijske sisteme pa se je proizvodnja zaradi številnih prednosti teh sistemov preusmerila v sesalske celice. Industrijske celične linije ovarija kitajskega hrčka (CHO) so izmed sesalskih celic v farmacevtski industriji najpogosteje uporabljeni biološki sistemi za proizvodnjo rekombinantnih glikoproteinov – bioloških zdravil. Slednja se uporabljajo za terapevtske namene, predvsem za zdravljenje kroničnih bolezni, kot so revmatoidni artritis, psoriaza, osteoporoza, multipla skleroza in za zdravljenje različnih vrst rakavih obolenj (Lek d.d., 2014).

Prvi terapevtski protein, proizveden v rekombinantnih sesalskih celicah, je človeški tkivni aktivator plazminogena (t-PA), katerega je leta 1986 začelo proizvajati biotehnološko podjetje Genentech. Danes je v sesalskem biološkem sistemu proizvedenih 60 – 70 % vseh rekombinantnih glikoproteinov. Poleg celičnih linij CHO poteka proizvodnja tudi v celicah, ki izvirajo iz mišjega mieloma (NS0), ledvic mladih hrčkov (BHK), človeških embrionalnih ledvičnih celic in človeških celic iz očesne mrežnice. Prednost sesalskih ekspresijskih sistemov je predvsem v prisotnosti celičnega aparata, ki omogoča ustrezno glikozilacijo prevedene proteinske verige in drugih post-translacijskih modifikacij. Slednje so nujno potrebne za ustrezno biološko aktivnost terapevtikov. Vendar so končne koncentracije produktov, proizvedenih s sesalskimi celičnimi linijami, še vedno precej nizke v primerjavi z ekspresijskim sistemi bakterij, kvasovk in rastlin, zato se biotehnološka podjetja usmerjajo predvsem v razvoj celičnih linij, ki bi omogočale višje specifične produktivnosti (Wurm, 2004).

Metabolizem sesalskih celic je relativno dobro opisan, vendar so industrijske sesalske celične linije CHO transformirane celice, ki se po svoji genetski sliki bistveno razlikujejo od izvirne linije ovarija kitajskega hrčka. Posledično je njihov metabolizem bolj podoben metabolizmu rakastih celic in je zelo odvisen od rastnih pogojev *in vitro* (Nyberk in sod., 1999). Poznavanje odvisnosti metabolizma teh celičnih linij od komponent rastnega gojišča in procesnih parametrov (fizikalnih in kemijskih) je zato ključno za izboljšanje rasti in produktivnosti celic. Težava pa je, da s klasičnimi metodami, s katerimi analiziramo celice in njihov metabolizem ter njegovo odvisnost od okolja, ne odkrijemo celotnega potenciala celice. Tehnologija fenotipskih mikromrež kaže na takšen potencial, vendar je njena uporabnost na področju industrijskih sesalskih celičnih linij CHO do danes še neraziskana (Bochner, 2001).

1.2 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Raziskovalna naloga je imela več ciljev. Najprej je bilo potrebno sestaviti splošen protokol, ki je kljub genotipskim in fenotipskim razlikam med izbranimi sesalskimi celičnimi linijami CHO, omogočal analizo njihovih lastnosti s tehnologijo fenotipskih mikromrež.

Po razvoju splošnega protokola smo preverili uporabnost tehnologije fenotipskih mikromrež za proučevanje odvisnosti rasti in produktivnosti celic od komponent rastnega gojišča.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Razvijemo lahko splošen protokol, ki bo omogočal analizo lastnosti različnih sesalskih celičnih linij CHO s tehnologijo fenotipskih mikromrež.
- Izbrane sesalske celične linije CHO se med seboj fenotipsko razlikujejo.
- Koncentracija substratov v rastnem gojišču vpliva na sposobnost izkoriščanja različnih virov ogljika, nanešenih na fenotipske mikromreže.
- Na podlagi rezultatov fenotipizacije celic CHO lahko s spremembo rastnega gojišča izboljšamo rastne lastnosti in produktivnost izbranih sesalskih celičnih linij CHO.

2 PREGLED OBJAV

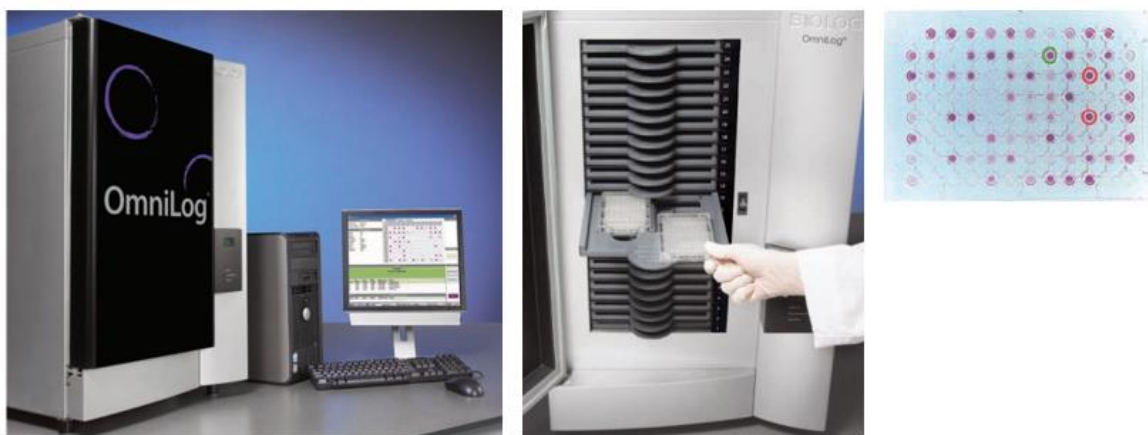
2.1 TEHNOLOGIJA FENOTIPSKIH MIKROMREŽ

V zadnjem desetletju smo priča hitremu razvoju orodij za analizo genov in posledično je na voljo vedno več genomskih informacij. Razvoj tehnik določanja nukleotidnega zaporedja nas je založil z zaporedji celotnih genomov različnih mikroorganizmov, rastlin, živali in nenazadnje tudi človeka. Cilj vseh projektov je poleg določitve nukleotidnega zaporedja tudi določitev mesta in števila genov, njihova anotacija in določitev njihovih biokemijskih funkcij. Kljub temeljitim študijam pa lahko pripišemo biokemijsko funkcijo le $\frac{2}{3}$ vseh genov (tako mikrobim, kot tudi človeškim) in le delček od teh genov lahko povežemo s fenotipom organizmov. Vloga gena v dednem zaporedju ne more biti popolnoma razumljena, dokler je ne moremo predvideti, opisati in pojasniti vseh fenotipov, ki izvirajo iz divjega tipa in mutiranih oblik dotičnega gena. Fenotipi običajno ne morejo biti predpostavljeni na podlagi biokemijske funkcije gena, saj ni jasno, kako regulatorne in katabolne aktivnosti vplivajo na biologijo celice ali celotnega organizma. Če ima gen biološko vlogo, potem mora vsak identificiran gen definirati vsaj en fenotip. Temu lahko sledi sekundarna anotacija genoma, v kateri je vsak gen opisan biološko s fenotipom, ki ga definira. Prvi korak v izdelavi t.i. fenotipske mape je bil izveden za bakterijo *Escherichia coli* leta 1996, ko so povezali okoli 1000 fenotipov tega organizma s pripadajočimi proučevanimi geni (Bochner, 2003).

Fenotip predstavlja morfološke in biokemijske lastnosti organizma, ki so posledica interakcij genotipa organizma z okoljem. Tehnologija fenotipskih mikromrež je bila razvita predvsem za področje mikrobiologije, šele v zadnjih par letih se je razvoj usmeril tudi na področje sesalskih celic. V mikrobiologiji je tehnologija pomembna predvsem pri sistemski biologiji, ki se ukvarja z izdelavo računalniških modelov, s pomočjo katerih bi lahko predvideli odzive organizmov/celic v različnih okoljih. Fenotipizacija je pomembna tudi pri mikrobni fiziologiji in taksonomiji, saj bi lahko povezala biokemijske in molekularne analize s fenotipom celic in s tem povečala naše razumevanje bioloških sistemov (Bochner, 2009).

Prvo analitično orodje za globalno zaznavanje fenotipov je bilo predstavljeno leta 1975 – dvo- dimenzionalna gelsko elektroforezo, ki je omogočala analizo vseh celičnih proteinov prisotnih v danem trenutku v enem poskusu. Metoda je postavila temelje proteomike, prve izmed današnjih –omik. Med leti 1980 in 1990 je bila razvita biokemijska metoda zaznavanja različnih membranskih lipidov, 1995 pa so razvili metodo za določanje nukleotidnega zaporedja celotnih genomov. Kmalu je bila postavljena tudi metoda za merjenje koncentracije mRNA molekul v celici. Kljub razvoju vseh biokemijskih in molekularnih metod pa je na voljo še vedno premalo informacij, s katerimi bi lahko postavljali kompleksne računalniške modele. Fenotipizacija celic je tako pomemben del informacije, ki bi lahko povezala biokemijske in molekularne analize (Bochner, 2009).

Tehnologija fenotipskih mikromrež je visoko zmogljiva tehnologija za sočasno testiranje velikega števila celičnih fenotipov. Mikromreža je v bistvu mikrotitrna ploščica, kjer vsaka od 96-ih luknjic predstavlja unikatne pogoje/okolje za celice. Podjetje Biolog (Hayward, CA) je razvilo mikromreže za hitro karakterizacijo fenotipa organizmov, ki temelji na uporabi različnih rastnih substratov. Barry R. Bochner je skupaj s sodelavci razvil standardni set fenotipskih mikromrež, s pomočjo katerega lahko proučujemo uporabo do 1920 različnih substratov (Bochner, 2001). Idejo sta leta 1977 predstavila B. R. Bochner in Michael Savageau, ki sta razvila splošno indikatorsko mikromrežo, katera je vsebovala agar, pufer, nujno potrebne rastne faktorje, testni substrat in barvilo na osnovi tetrazolijevega klorida. Na mikromreži sta testirala sposobnost izrabe različnih testnih substratov za različne seve *Salmonelle typhimurium* in *E. coli* (Bochner in Savageau, 1977). Leta 1989 so bile razvite že prve mikromreže, ki so imele na dnu posušen le še testni substrat in barvilo. Ob dodatku celične kulture je bilo v nekaj urah mogoče pridobiti obarvan rezultat, zaznan s pomočjo merjenja absorbance. Podjetje Biolog je metodo patentiralo in začelo izdelovati prve mikromreže, s katerimi je bilo mogoče razlikovati med vrstami po Gramu negativnih bakterij preko izrabe 95 različnih substratov (Bochner, 1989). Leta 2001 so bile na voljo že mikromreže, ki so omogočile testiranje bakterij na 700 različnih substratih (Wurm, 2004), do leta 2003 pa se je številka povzpela na 1920 (Bochner, 2003). Podjetje se je nato usmerilo še v izdelavo mikromrež za določanje fenotipov kvasovk, filamentoznih gliv in nenazadnje tudi sesalskih celic. Današnji standardni set za določanje fenotipov bakterij vsebujejo skoraj 2000 različnih testov izrabe substratov, vpliva pH, ozmolarnosti in uporabe ionov ter testov občutljivosti (Bochner, 2001).

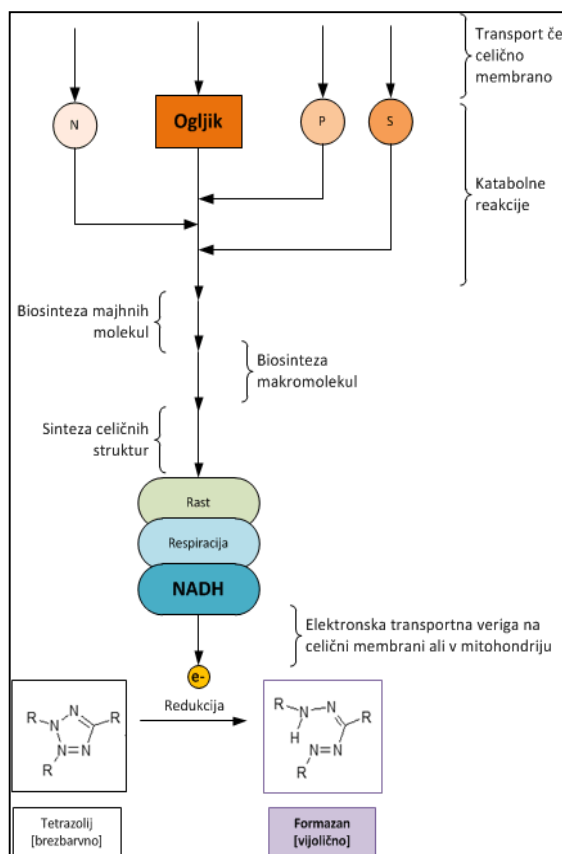


Slika 1: Tehnologija fenotipskih mikromrež. a) Naprava OmniLog z zunanjim računalnikom b) Inkubacijska komora z nosilci za 50 mikromrež c) Fenotipska mikromreža PM-M1 (Biolog Inc., 2014: 9)

Za sesalske celice je na voljo 14 različnih mikromrež, poimenovanih Phenotype MicroArrays (PM) od PM-M1 do PM-M14. S pomočjo slednjih lahko fenotipsko opredelimo sesalske celice glede na energetske metabolne poti (PM-M1 do PM-M4), učinke ionov in hormonov na celice (PM-M5 in PM-M6) ter občutljivost celic na protirakava sredstva (PM-M7 do PM-M14). Če uporabimo le set prvih štirih mikromrež, lahko testiramo 367 potencialnih metabolnih poti hkrati. Mikromreža PM-M1 vsebuje različne vire ogljika – enostavnih sladkorjev, polisaharidov in karboksilnih kislin. PM-M2 do M4 pa vsebujejo lipide, primarne aminokisline in dipeptide (Biolog Inc., 2007a).

Fenotipske mikromreže predstavljajo prozorne mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinami. Vsaka vdolbinica ima volumen 200 μ l in ravno dno, na katerem je posušen specifičen substrat. Testi so izvedeni tako, da se v vsako vdolbinico doda homogena celična kultura, ki je bila predhodno gojena v običajnem rastnem gojišču, nato pa pripravljena v osiromašenem gojišču. Slednje ne vsebuje nobenih virov ogljika in dušika (Bochner, 2001). Od genotipa celic je odvisno, kakšen bo fenotip v določenem okolju/luknjici. Kot reporterski sistem za zaznavanje izkoriščanja substratov tehnologija fenotipskih mikromrež uporablja celično respiracijo. Če imajo celice na voljo transportni sistem in katabolno pot za katerega koli od specifičnih substratov, ki so v posameznih luknjicah, bodo celice le-tega uporabile, tekom katabolnega procesa pa bo nastal NADH. Elektronska transportna veriga v celicah bo prenesla elektrone iz NADH na katero izmed molekul dodanega tetrazolijskega barvila. Slednje se bo reduciralo v temno vijolično obarvan formazan (Slika 2). Hitrejša kot je respiracija, hitreje pride do reakcije. Izraba specifičnega substrata torej rezultira v celični respiraciji, ki jo zaznavamo preko redukcije barvila, katere posledica je razvoj temno vijoličnega

obarvanja v posamezni vdolbinici mikromreže (Slika 1). Količina in hitrost vijoličnega obarvanja v vsaki vdolbinici fenotipske mikromreže, sta beleženi in fotografirani preko naprave OmniLog. Gre za inkubator, v katerem je prostora za 50 mikromrež. V inkubatorju je tudi CCD kamera, povezana z zunanjim računalnikom. Kamera se premika po inkubatorju



Slika 2: Shematični prikaz glavnih metabolnih poti v celici in njihova povezava s kalorimetrijo. Viri ogljika, dušika, fosforja in žvepla so transportirani celico, kjer so v metabolnih reakcijah razgrajeni in porabljeni za sintezo novih molekul. Posledica izrabe substratov sta respiracija in/ali rast, ki se kaže v sintezi NADH. Elektronska transportna veriga prenese elektrone iz NADH na dodano tetrazolijsko barvilo in ga reducira. Končni rezultat kolorimetrične reakcije je vijolično obarvanje (Bochner, 2001: 1247).

ter beleži odzive v vsaki luknjici vsakih 15 minut. Kot rezultat lahko uporabimo fotografirane mikromreže, kjer vidimo različne intenzitete vijolične barve v posameznih luknjicah, izrisane kinetične grafikone, ki kažejo dinamiko respiracije v 24-ih urah ali pa podatke izvozimo v obliki *.csv datoteke (Bochner, 2009).

Tehnologija fenotipskih mikromrež za merjenje odzivov na specifične substrate uporablja kolorimetrijo, ki temelji na uporabi tetrazolijevih reagentov. Za potrebe proučevanja fenotipov sesalskih celic je podjetje Biolog razvilo dve vrsti barvil – Biolog Redox Dye Mix MA in MB. Količina tvorjenega vodotopnega formazana je merjena spektrofotometrično pri 590 nm direktno v mikromrežah s pomočjo CCD kamere. Barvilo MB se preferenčno uporablja za testiranje krvnih celic ter celičnih linij humanih embrionalnih celic ledvic HEK293, ovarijskih celic kitajskega hrčka CHO-K1, hibridomskih celic miši 413-15D12 in humanih pljučnih fibroblastov IMR-90 (Biolog Inc., 2007a).

V preteklosti je večina testov za določanje izrabe različnih substratov temeljila na spremljanju rasti celične kulture s pomočjo turbidimetrije. Kolorimetrična metoda, ki se uporablja za fenotipske mikromreže, pa meri hitrost respiracije. Slednja ima precej prednosti pred merjenjem motnosti:

- Spremembo barve je lažje meriti in kvantificirati (Bochner, 2009).
- Kolorimetrija je v primerjavi s turbidimetrijo bolj občutljiva in visoko ponovljiva (Bochner, 2009).
- Celična respiracija lahko poteka neodvisno od celične rasti, zato lahko merimo fenotipe, ki ne vodijo v rast celic. Tako je lahko format dehidrogenazna pot pri *E. coli* zaznana z respiracijo, vendar ne z rastjo. Bakterija namreč lahko diha in proizvede energijo s pomočjo formata, ne more pa rasti na njem (Bochner, 2009).
- S kolorimetrijo lahko zaznamo fenotipe, ki jih ne moremo gojiti samostojno. Za bakterijske vrste *Coxiella*, ki morajo biti gojene znotraj evkariontskih celic, so bili uporabljeni rezultati fenotipizacije s PM tehnologijo za razvoj medija, s pomočjo katerega lahko gojimo *Coxiella burnetii* v metabolno aktivnem stanju brez gostiteljskih celic več kot 24 ur (Bochner, 2009).

Proučevanje fenotipov na veliki skali s pomočjo tehnologije fenotipskih mikromrež ima tudi precej omejitev:

- Predstavljene mikromreže zaenkrat ne zajemajo vseh fenotipskih lastnosti – proučujemo lahko metabolne poti, vendar pa spregledamo fenotipe, ki vključujejo znotrajcelične strukture (citoskelet, organeli), površinske strukture in njihove vloge (bički, tvorba biofilmov, gibljivost, kemotaksa) ter funkcije, ki se izrazijo le pod anaerobnimi pogoji (Bochner, 2003).
- Funkcij celic, ki še niso bile odkrite, ne moremo testirati (Bochner, 2003).
- Učinki nekaterih genov so lahko kriptični in imajo vlogo le v visoko specifičnih okoljih. Številni mikrobni fenotipi so izraženi šele, ko pride organizem v stik z drugim mikrobom, rastlino ali živaljo. Problematično je tudi zaznavanje fenotipov genov, katerih odsotnost v genomu je kompenzirana z drugimi (Bochner, 2003).

- Omejitve se pokažejo tudi pri gojenju počasi rastočih mikroorganizmov ali celičnih kultur, saj pride pri višjih temperaturah do izhlapevanja. Težavo rešimo z uporabo prozorne plastične folije, s katero prelepimo mikromrežo ali pa uporabimo plastično vrečko, ki omogoča visoko vlažnost (Bochner, 2009).
- Pri gojenju termofilnih mikroorganizmov, bi pri temperaturi nad 80 °C lahko prišlo do taljenja mikromrež (Bochner, 2009).
- Anaerobni mikroorganizmi potrebujejo posebno atmosfero, zato je potrebna uporaba plastičnih vrečk, ki imajo nizko prepustnost plinov (Bochner, 2009).
- Težavna je tudi uporaba tehnologije PM v ekstremnih okoljih. V pogojih visoke slanosti lahko substrati in barvilo delno precipitirajo, zaradi česar so odzivi na substrat lahko nižji. Zaradi alkalnih pogojev lahko reakcije redukcije potekajo hitreje, medtem ko je v zakisanih pogojih redukcija nižja ali celo zavrta, pogost pa je tudi premik v barvnem spektru iz vijolične barve na rdečo (Bochner, 2009).

Proizvajalec sistema Omnilog ponuja tudi programsko opremo (program PM Kinetic), s pomočjo katere lahko obdelujemo pridobljene podatke. Precej boljše rešitve vizualizacije rezultatov pa so ponudile nekatere bioinformacijske skupine. Jacobsen in sod. so leta 2007 predstavili zbirko programskih orodij, ki omogočajo enostavno ter hitro pregledovanje in primerjanje rezultatov fenotipizacije preko spletnega brskalnika. S tem se precej poenostavi izmenjava podatkov med raziskovalci, ustvari pa se tudi baza podatkov. Vmesnik PMRow View omogoča enostavno primerjavo rastnih krivulj posameznih vrstic na mikromrežah (12 vdolbinic) ali posamezne vdobinice, primerjavo tehničnih ponovitev (enak vcepek), primerjavo bioloških ponovitev (enak organizem, drug vcepek) ali primerjavo odzivov različnih sevov organizma. Vmesnik PMColorMap prikazuje rastne krivulje kot tanke horizontalne črte, višina odziva pa je ponazorjena z ustrezno barvno lestvico. Na takšen način lahko prikažemo rastne krivulje za vseh 96 vdolbinic mikromreže na enem samem grafu (Jacobsen in sod., 2007). Leta 2011 je bilo predstavljeno še eno orodje, ki prav tako deluje preko spletnega brskalnika (<http://phemadb.sourceforge.net>). Sistem PheMaDB omogoča shranjevanje, pridobivanje in analizo pridobljenih podatkov. Uporabnik lahko hitro izbere željene odzive, saj program omogoča hierarhično filtracijo podatkov. Temu sledi izbor različnih statističnih analiz, s katerimi lahko identificiramo specifične rastne karakteristike proučevanih organizmov (Chang in sod., 2011).

2.2 UPORABA TEHNOLOGIJE FENOTIPSKIH MIKROMREŽ

Tehnologija fenotipskih mikromrež je bila sprva razvita za potrebe fenotipizacije bakterij. Uporaba se je kmalu razširila tudi na kvasovke, filamentozne glive in sesalske celične linije, skupaj z razširitvijo spektra organizmov pa se je povečevala tudi aplikativnost te tehnologije in razvoj dodatnih metod.

2.2.1 Proučevanje funkcije genov

Anotacija genov je pripis biološke vloge posamezni genski informaciji. Največkrat je ekstrapolirana na podlagi podobnosti novih genov z drugimi geni, kateri so že bili anotirani in katerih biološka vloga je bila preverjena. Potrjevanje biološke funkcije poteka na dva načina:

- s pomočjo tarčnega izbrisa genov (ang. knockouts of genes) iz genoma in preverjanja ali je izbris gena na fenotip celice vplival skladno s pričakovanji
- s pomočjo vstavljanja tarčnega gena v organizem in preverjanja, ali je vstavev gena na fenotip vplival skladno s pričakovanji

Tehnologija fenotipskih mikromrež je ena izmed metod, ki omogoča hitro in masovno preverjanje ustreznosti metode izbrisa in vstavljanja genov (Bochner, 2009).

Zhou in sodelavci (2003) so poskušali pripisati biološko funkcijo vsem genom *E.coli*, ki nosijo zapis za dvokomponentne sisteme. Geni so bili izbrisani s pomočjo metode, ki sta jo postavila Datsenko in Wanner (2000). S pomočjo fenotipskih mikromrež so želeli potrditi, da so bili izbrisi posameznih genov ustrezni. Poleg določitve nukleotidnega zaporedja relevantne genomske regije, so za dva izmed mutantskih sevov, preverili fenotipske lastnosti. Izbrana organizma sta na fenotipskih ploščicah izkazovala različne lastnosti, kar kaže na to, da so se poleg tarčnega gena pojavile še nenamerne genetske spremembe (Zhou in sod., 2003). Izbrani primer prikazuje sposobnost tehnologije PM, da razlikuje med močno sorodnimi sevi in da potrjuje ustreznost gensko spremenjenih mikroorganizmov.

Objavljenih je še veliko primerov uspešne uporabe tehnologije PM za testiranje fenotipskih lastnosti mutantskih sevov širokega spektra mikroorganizmov z izbranimi geni. Številni izmed teh genov so bili regulatorni, nekateri so kodirali encime, drugi pa so imeli slabo okarakterizirano vlogo. Pomembni dosežek je odkritje nove metabolne poti *E. coli* za razgradnjo pirimidinov, ki je bila izvedena z izbrisom celotnega operona (Bochner, 2009).

2.2.2 Proučevanje patogeneze in epidemiologije

Številni laboratoriji uporabljajo tehnologijo fenotipskih mikromrež za proučevanje različnih aspektov bakterijske patogeneze in s tem povezanimi problemi epidemiologije. Guard-Bouldin in sod. (2004) so proučevali razlike med kloni *Salmonelle enterica*, serovar Enteritidis. Različni sevi tega patogena si delijo 99,99 % genomske identitete, kljub temu pa se močno razlikujejo v patogenih lastnostih. Tehnologijo PM so uporabili za primerjavo

dveh podtipov – prvi tvori biofilm in kolonizira prebavila piščancev, drugi podtip pa biofilma ne tvori, prebavil ne kolonizira, vendar pa okužuje jajca. Koinfekcija z obema podtipoma vodi v najhujšo obliko bolezni, ki se hitro širi. Kljub zelo visoki sorodnosti med tema podtipoma in nezmožnosti ločevanja s pomočjo genskih tipizacijskih metod (DNA hibridizacija na mikromrežah, pulzna gelska elektroforeza, ribotipizacija), je tehnologija PM hitro odkrila številne fenotipske razlike. S tem je prispevala pomembne informacije, ki so pojasnile 447 majhnih genotipskih polimorfizmov, kateri so očitno »vroče točke« za genske spremembe (Guard-Bouldin in sod., 2004).

Kot že omenjeno so bili karakterizirani metabolni fenotipi *C. burnetii*, ekstrahirane iz celične kulture sesalskih celic. Analizirani so bili tudi številni drugi patogeni, kot so *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cronobacter sakazaki* in *Yersinia pestis*, *Listeria monocytogenes*, *Campilobacter jejuni* in *Vibrio cholerae* (Bochner, 2009).

2.2.3 Zaznavanje okolja in patogeneza – pomembnost metabolnih in temperaturnih signalov

Spremembe v okolijskih pogojih lahko sprožijo spremembe v patogenezi bakterij. Med temi signali je zagotovo najpomembnejša temperatura, saj številni patogeni mikroorganizmi zaznajo višjo temperaturo gostitelja, kar sproži mehanizme patogenosti. Najboljši dokumentiran primer je *L. monocytogenes*, ki je znana po sposobnosti rasti pri nizkih temperaturah, predvsem v ohlajenih živilih. Veliki set genov za patogene lastnosti je reguliran s proteinom, katerega prepis se sproži pri višji temperaturi. Vazquez-Boland in sodelavci (2001) so objavili članek, v katerem je predlagan še en mehanizem sprožitve patogenosti, ki prav omogoča zaznavanje intracelularnega prostora preko povišane koncentracije heksoz fosfatov (glukoza-1-fosfat, glukoza-6-fosfat, fruktoza-6-fosfat). Gre za molekule, ki jih izven celice skoraj ne najdemo, v celicah pa je njihova koncentracija zelo visoka, saj se sladkorji med transportom skozi membrano fosforilirajo. Tehnologija PM je bila uporabljena za testiranje dveh sevov omenjene bakterije – prvi sev je bil običajen, drugi pa hiperpatogen. Pri slednjem je bilo opaziti povečan metabolizem fosforiliranih heksoz kot vir ogljika, v primerjavi z običajnim sevom. Bakterija tako uporablja kot primarni vir ogljika za rast fosforilirane heksoze iz citoplazme celic. Raziskovalci so naredili še en korak naprej in odkrili gen, ki je odgovoren za privzem tega vira ogljika. Ko so dotični gen načrtno odstranili iz dednega materiala, bakterija ni bila več patogena (Vazquez-Boland in sod., 2001).

Podobne sprožilce patogeneze lahko uporabljajo tudi druge bakterije. V primeru bakterij *Francisella tularensis* in *H. pylori* so fenotipski testi prav tako pokazali povečan metabolizem katabolnih poti vezanih na ogljik, ki so aktivne v prisotnosti seruma (Bochner, 2009).

2.2.4 Proučevanje mikroskopske in makroskopske morfologije

Pomemben vidik fenotipskih mikromrež za mikrobiologe je, da lahko v enem poskusu vidijo številne aspekte celic, med drugimi tudi morfologijo. S pomočjo tehnologije PM so

ugotovili, da formacijo biofilma pri *E. coli* povzročijo sub letalne koncentracije antibiotikov. Identificirani so bili tudi pogoji gojenja, ki sprožijo spremembo morfologije plodnih teles pri bakteriji *Myxococcus xanthus*. Pogoji v okolju so prav tako pomembni pri sprožitvi filamentacije, germinacije in sporulacije. Številni mikroorganizmi imajo gene, ki kodirajo metabolne poti sekundarnega metabolizma in za aktivacijo potrebujejo ustrezne stresne pogoje. Regulacija sprožitve proizvodnje antibiotikov pri aktinomicetah in toksinov pri bakterijah, je ponekod še vedno precej nejasna. In prav tehnologija fenotipskih mikromrež je lahko tista, s pomočjo katere se odkrijejo ustrezni parametri okolja in stresne molekule, ki aktivirajo sekundarni metabolizem (Bochner, 2009).

2.2.5 Fenotipizacija bakterij

Številnih mikroorganizmov še vedno ne znamo gojiti ali pa je njihova rast zelo počasna. Kadar gre za pomembne patogene, to seveda upočasni napredek v proučevanju teh organizmov in njihove patogeneze, hkrati pa podaljša čas do odkritja učinkovitega zdravljenja. Fenotipske mikromreže ponujajo hkratno testiranje preko 1920 različnih gojitvenih pogojev, s čemer je omogočen razvoj optimalnega medija, ki stimulira rast in spoznanje pogojev, ki rast zavirajo. Eden izmed primerov je že omenjeno gojišče za *C. burnetii* (Bochner, 2009).

Eno izmed najpomembnejših odkritij s pomočjo fenotipskih mikromrež je zagotovo razvoj protokola za testiranje sevov bakterije *Mycobacterium bovis*. Za večino bakterij rodu *Mycobacterium* je značilno, da rastejo zelo počasi. *M. bovis* tako za rast v tekočem gojišču potrebuje 2 tedna, za formacijo kolonij na agarju pa 4-8 tednov. Wheeler je razvil protokol za proučevanje metabolizma teh bakterij na fenotipskih mikromrežah. Raziskovalci so primerjali fenotipske lastnosti dveh sevov *M. bovis*. Pasteurjev sev proizvaja nizke koncentracije za cepivo proti tuberkulozi pomembnega antigena MPB70, medtem ko ruski sev proizvaja visoke koncentracije le-tega. Analiza fenotipa za Pasteurjev sev je trajala le 5 dni, saj se kot reporter uporablja respiracija in ne rast. Fenotipske razlike med sevoma so bile precejšnje in so se pojavile tako pri metabolizmu virov ogljika kot tudi dušika. Razviti protokol na fenotipskih mikromrežah je tako omogočil prvo metabolno karakterizacijo te bakterije, omogočil pa bo zagotovo tudi hitrejše diagnostične metode in razvoj ustreznih metod za gojenje in izolacijo mikobakterij (Bochner in sod., 2008).

2.2.6 Uporaba v taksonomiji, identifikaciji, mikrobni ekologiji in evolucijskih študijah

Največja prednost nukleotidnega zaporedja 16S rRNA v mikrobni taksonomiji je njena univerzalnost, saj jo najdemo v vseh mikroorganizmih. Hkrati pa vsebuje tudi taksonomsko pomembne informacije. Tudi testiranje fenotipov je univerzalno (le za organizme, ki jih znamo gojiti), poleg tega pa nam daje pomembne informacije o bioloških lastnostih celic. Vendar pa pred razvojem fenotipskih mikromrež ni bilo na voljo dovolj enakih testov, ki bi jih lahko uporabljali za veliko število mikrobnih vrst. Bochner je s sodelavci razvil fenotipsko mikromrežo GEN III Microplate, ki vsebuje 94 najboljših testov za identifikacijo bakterijskih vrst. Gre za prvo testiranje, ki omogoča identifikacijo velikega števila po Gramu negativnih in po Gramu pozitivnih vrst, z eno samo metodo. S pomočjo omenjene

mikromreže je bil opisan nov rod *Cronobacter*, predhodno neustrezno klasificiran kot *Enterobacter sakazakii* (Bochner, 2009).

2.2.7 Izboljšanje industrijskih bioprosesov

Številne možnosti uporabe fenotipskih mikromrež najdemo tudi v industrijskih bioprosesih, predvsem na področju optimizacije izkoristkov in ponovljivosti fermentacijskih procesov. Uporabijo se lahko pri izboru najboljših produkcijskih klonov, razumevanju lastnosti produkcijskih celičnih linij, razumevanju vpliva genetskih sprememb na celične linije ter za razvoj optimalnih rastnih in produkcijskih gojišč, ki vodijo v hitro rast celic, večjo produktivnost in boljšo kakovost končnega produkta. Tehnologija PM je že bila uporabljena v izboljšanju procesa proizvodnje celulaz, N-acetilglukoaminidaz in hitinaz s pomočjo gliv. Van Dyk (2004) pa je s pomočjo fenotipskih mikromrež proučil in optimiziral vlogo izlivnih črpalk, s čemer je omogočil, da bakterije tolerirajo višje koncentracije toksičnih končnih produktov (Bochner, 2009).

2.2.8 Uporaba v sistemski biologiji

Sistemska biologija želi postaviti računalniške modele celic, vendar za to potrebuje dejanske podatke. Tehnologija fenotipskih mikromrež je že bila uporabljena pri izboljšanju rastnega modela bakterije *Bacillus subtilis*, narejenega na podlagi genomskih informacij. Rastne lastnosti so bile izračunane s pomočjo izdelanega modela, nato pa primerjane z dejanskimi vrednostmi, pridobljenimi s pomočjo mikromrež. Od 270 testiranih primerov je bilo pravilno kvalitativno napovedanih le 53 % lastnosti. Ko so raziskovalci v model dodali popravljene vrednosti in dodatno vnesli 84 novih testov, se je napovedna vrednost fenotipov za seve, ki so imeli različne izbrisane gene, izboljšala na 94 % (Bochner, 2009).

2.2.9 Uporaba fenotipskih mikromrež na glivah

Glive so pomembni delovni mikroorganizmi v proizvodnji hrane in pijače, hkrati pa povzročajo tudi kvar živil, zaradi česar lahko v industriji pride do velikih izgub. Vlogo imajo tudi v naravni flori gastrointestinalnega in reprodukcijskega trakta pri živalih, v bolnišnicah pa se pojavljajo tudi kot oportunistični patogeni, ki okužujejo imunsko oslABLjene ljudi. Za filamentozne glive in kvasovke so značilni posebni rastni pogoji, zaradi česar jih je težko testirati in identificirati z običajnimi metodami. Ti organizmi rastejo pri nizkih vrednostih pH in ob prisotnosti visokih koncentracij sladkorja ali soli, kar lahko vpliva na redukcijo dodanih tetrazolijevih barvil. Ker lahko dodatek slednjih tudi upočasni ali celo prepreči rast gliv, sistem Omnilog omogoča tako kolorimetrično merjenje kot tudi merjenje motnosti. Na voljo so fenotipske mikromreže za identifikacijo in karakterizacijo kvasovk YT MicroPlate in filamentoznih gliv FF Microplate (Biolog Inc., 2014).

Pomemben preboj na področju biologije glivnih toksinov so objavili Gardiner, Kazan in Manners (2009), ko so s pomočjo tehnologije fenotipskih mikromrež identificirali dejavnike, ki sprožijo sintezo trihotekenov *Fusarium graminearum* med procesom okužbe pšenice. Ugotovili so, da so pomemben induktor sinteze toksinov produkti biosintezne poti arginina-poliamina v rastlinah (Gardiner in sod., 2009).

2.2.10 Uporaba fenotipskih mikromrež na sesalskih celičnih linijah

Fenotipske mikromreže za sesalske celične linije imajo velik potencial predvsem v raziskovanju njihovega metabolizma in izrabe substratov in tako omogočajo razumevanje energetskega metabolizma skoraj vsake celične linije. Lastnosti celičnih linij pogosto odražajo značilnosti organov ali tkiv, iz katerih izvirajo. Na ta način lahko pridobimo pomembne informacije pri raziskovanju metabolnih motenj, kot sta diabetes in prekomerna telesna teža, tudi na nivoju organizmov. Pridobivamo nove informacije o metabolizmu ogljika ali hranilnih vrednostih. Mikromreže so orodje tudi pri testiranju vpliva zdravil, hormonov in drugih kemikalij, ki bi lahko vplivale na metabolične poti. Namesto testiranja posamezne metabolične poti, lahko testiramo 367 poti hkrati (Biolog Inc., 2007a).

Druga večja aplikacija je določanje fenotipa sesalskih celic. Različne celične linije imajo aktivne različne metabolične poti, zaradi česar so odzivi na mikromrežah različni. Pregled 367 metaboličnih poti hkrati prav tako odseva fiziološko stanje celice. Če se lastnosti celičnih linij sčasoma spremenijo, se to zagotovo kaže na metaboličnih poteh. Metoda je tako primerna za testiranje stabilnosti celičnih linij (Biolog Inc., 2007a).

Z razvojem fenotipskih mikromrež za sesalske celice se odpira novo področje, ki omogoča proučevanje interakcij med patogenimi bakterijami in njihovimi gostiteljskimi celicami. S primerjavo fenotipov okuženih in zdravih celic bi lahko ugotovili, kako okužba z določenim mikroorganizmom vpliva na biologijo gostiteljske celice. Končni cilj bi bil hkratno zaznavanje fenotipskih lastnosti bakterije in gostiteljske celice med potekom okužbe. Teoretično bi bilo to mogoče izvesti z uporabo dveh različnih barvil, ki se razlikujeta v redoks potencialu in končnem obarvanju. Barvilo z višjim potencialom bi bilo primerno za bakterije, tisto z nižjim pa za sesalske celice. S tem bi bile fenotipske mikromreže uporabne tudi za proučevanje patogeneze, okoljskega signaliziranja in intracelularne regulacije rasti (Bochner, 2009).

Prve objave na temo uporabe fenotipskih mikromrež za sesalske celice so se pojavile šele leta 2011. Lee in sod. (2011) so tehnologijo uporabili za proučevanje vpliva kromosomske nestabilnosti (CIN) kolorektalnih rakastih celic na razvoj večkratne odpornosti proti zdravilom. Uporabljene so bile mikromreže, ki vsebujejo 92 različnih protirakavih spojin, v štirih različnih koncentracijah. V raziskavi so ugotovili, da celične linije, v katerih je prisotna kromosomska nestabilnost, kažejo pomembno povečanje v razvoju večkratne odpornosti kot tiste, ki kromosomske nestabilnosti nimajo. Slednja je prav tako neodvisna od somatskih mutacij in stopnje proliferacije.

Istega leta so Bochner in sod. (2011) objavili metabolično tipizacijo sedmih človeških rakastih celičnih linij, ki izvirajo iz različnih tkiv, s pomočjo mikromrež PM-M1 do PM-M4. Celične linije so med seboj kazale različne fenotipe, vse pa so imele najmočnejši odziv na glukozo. Dve leukemični celični liniji sta kazali dodatne metabolične poti na D-manozi, D-maltozi in maltotriozni, njuna fenotipa pa sta bila precej podobna. Ostale celične linije so lahko izkoriščale tudi nekatere nukleozide, intermediate Krebsovega cikla, galaktozo, fruktozo, dekstrin in glikogen. Odzivi so se kazali tudi v metabolizmu dušika, predvsem gre za

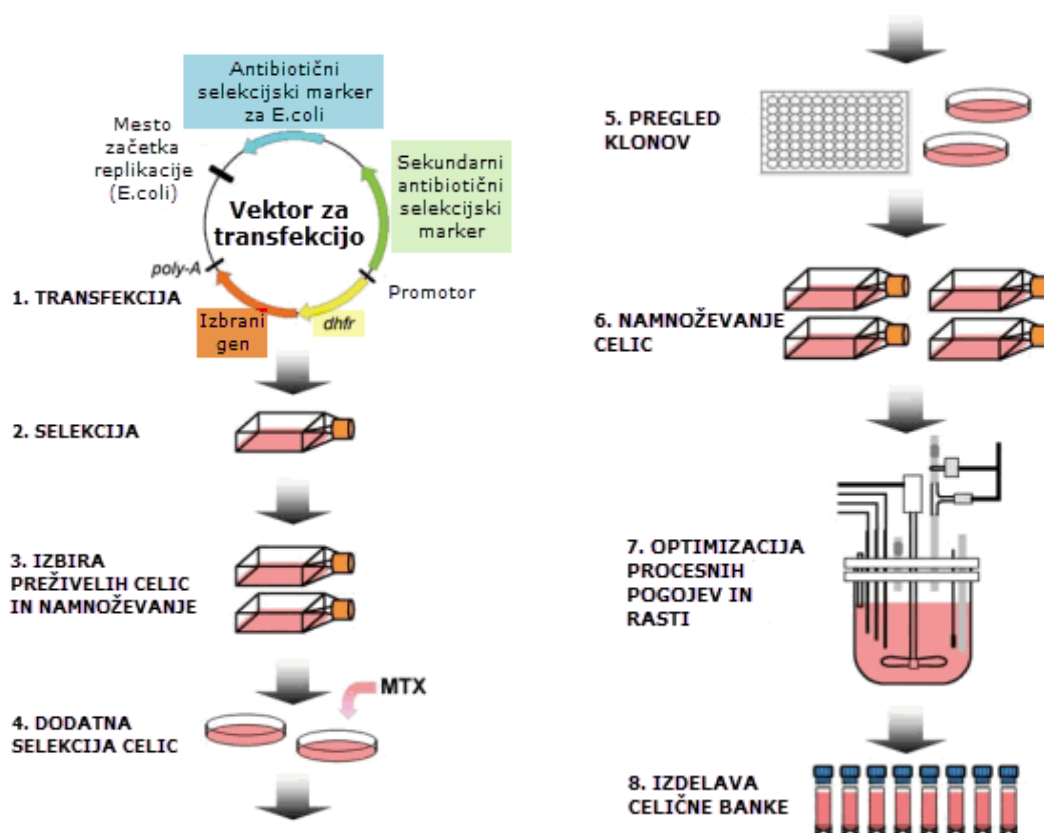
izkoriščanje glutamina in drugih dipeptidov, ki slednjega vsebujejo. V isti raziskavi je bilo izvedeno tudi metabolno profiliranje belih in rjavih maščobnih celic – adipocitov (Bochner in sod., 2011).

2.3 PROIZVODNJA BIOFARMACEVTIKOV

Biofarmacevtiki so zdravila, proizvedena s pomočjo genetske manipulacije živih celic ali celotnih organizmov. Gre za skupino zdravil, ki imajo kompleksno kemijsko strukturo in se uporabljajo kot terapevtiki, profilaktiki ali celo v diagnostične namene. Proizvedeni so s pomočjo genske manipulacije in ne preko kemijske sinteze ali ekstrakcije iz naravnih bioloških virov. Njihova proizvodnja zahteva uporabo modernih biotehnoloških orodij, kot so tehnike rekombinantne DNA in hibridomska tehnologija, ki so izvedene v prirejenih bioloških sistemih. Med biofarmacevtike tako spadajo rekombinantne oblike naravnih proteinov (inzulin, eritropoetin, interferoni), biološke spojine, pridobljene iz naravnih virov (cepiva, encimi, polipeptidi), produkti, ki temeljijo na nukleinskih kislinah (DNA, RNA, genska terapija) in monoklonska protitelesa (Zhang, 2010).

Rekombinantni proteini so običajno sintetizirani s pomočjo prilagojenih gostiteljskih celic, ki vsebujejo umetno vnesene gene, na katerih so zapisi za želene proteine. Če želimo, da so slednji učinkoviti, morajo biti sintetizirani v biološko aktivni obliki, ki vključuje ustrezno zvijanje proteinov in post-translacijske modifikacije, med katerimi je predvsem pomembna glikozilacija. Proteini so večinoma sintetizirani v sesalskih celicah, saj najpogosteje uporabljene mikrobne gostiteljske celice (npr. *E. coli*), nimajo ustreznega celičnega aparata za sintezo željenih glikoform. Med sesalskimi celičnimi linijami se uporabljajo v industrijske namene nekatere glodalske in človeške celične linije – mišji fibroblasti (3T3), ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO), ledvične celice hrčka (BHK), epitelne celice materničnega vratu človeka (HeLa) in epitelne celice jeternega karcinoma človeka (HepG2). Kljub temu, da je na voljo veliko celičnih linij, je skoraj 70 % vseh rekombinantnih proteinov proizvedenih s pomočjo celičnih linij CHO (Jayapal in sod., 2007). Na sliki 3 je shematsko prikazan razvoj biofarmacevtikov od razvoja produkcijske celične linije do razvoja

bioprocesa, ki se nato prenese v proizvodnjo. Podrobnejši opisi postopkov so v naslednjih poglavjih.



Slika 3: Razvoj biofarmacevtikov (Jayapal, 2007: 43)

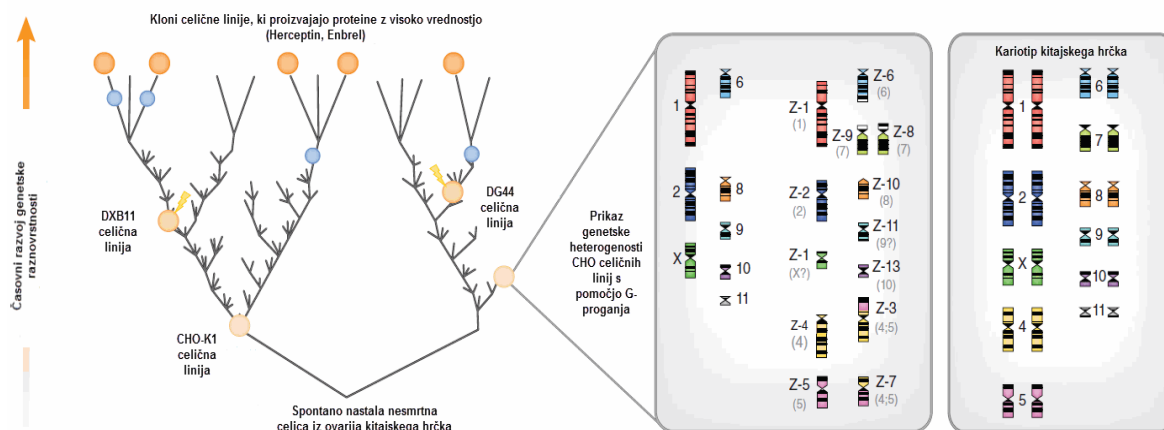
2.3.1 Celične linije ovarija kitajskega hrčka

Celične linije CHO, pridobljene z biopsijo ovarija kitajskega hrčka, so paradni konj farmacevtske industrije v proizvodnji biofarmacevtikov (Gardiner in sod., 2009), saj zagotavljajo 30 milijonov ameriških dolarjev letnega dobička (Jayapal in sod., 2007). Zaradi razširjene uporabe te celične linije v industriji, so njene rastne lastnosti, metabolizem, obnašanje v bioreaktorskih sistemih, virulentni dejavniki in gostiteljske nečistoče v končnem produktu, dobro proučene, opisane in regulirane (Zhang, 2010). Kot gostiteljski sistem so bile prvotno izbrane zaradi njihove varnosti (ne omogočajo razmnoževanja patogenih človeških virusov), enostavnega vnosa tuje DNA ter hitre in robustne rasti. Zaradi razvoja linij, sposobnih suspenzijske rasti, so v produktivnosti prehitele celo nekatere mikrobne sisteme, saj omogočajo proizvodnjo 3 – 10 g/l visoko kakovostnega produkta (Wurm in Hacker, 2011).

Pod oznako celic CHO spada veliko celičnih linij CHO, ki se med seboj precej razlikujejo. Prva celična linija CHO je bila izolirana leta 1956, ko je Theodore Puck pridobil prvo spontano nastalo populacijo fibroblastov iz gojenih ovarijskih celic delno pasemskega kitajskega hrčka. Uporaba celic CHO v industriji se je začela po odkritju celičnih linij, ki

nosijo mutacijo v genu za sintezo dihidrofolatne reduktaze (DHFR). Gre za genetsko napako, ki omogoča transgenezo, pri kateri se prenese še funkcionalna kopija omenjenega gena kot selektivni marker. Leta 1980 so s kemijsko mutagenozo celične linije CHO-K1 ustvarili novo linijo DXB11, ki ima izbrisan en alel DHFR, drugi pa je inaktiviran. Nekaj let kasneje je bila z ionizacijskim sevanjem ustvarjena nova celična linija CHO-DG44, pri kateri sta izbrisana oba alela DHFR (Wurm in Hacker, 2011). Na sliki 4(levo) je prikazan razvoj celičnih linij CHO.

Genom originalne celične linije in njenih potomk je bil določen leta 2011. Citogenetske študije zadnjih 40 let so pokazale, da med različnimi celičnimi linijami CHO obstaja velika genomsko heterogenost. S pomočjo G-proganja so dokazali, da imajo kitajski hrčki 22 kromosomov (10 avtosomskih, 2 spolna), medtem ko ima prednik linije CHO-K1 precej drugačen kariotip. 8 kromosomov je na pogled enakih normalnim kromosomom hrčka, preostalih 13 pa predstavlja nenormalne Z-kromosome, ki nakazujejo na delecije, translokacije in prerazporeditve segmentov kromosoma (Wurm in Hacker, 2011). Kariotipi so prikazani na sliki 4 (desno).



Slika 4: Genetska heterogenost celičnih linij CHO. Razvejan diagram prikazuje koncept razvoja celičnih linij CHO. Na desni strani slike sta kariotipa celic kitajskega hrčka in razvite nesmrtnne celične linije (Wurm 2011: 719)

Kromosomska heterogenost je bila opažena celo med celicami znotraj domnevne klonske populacije. Ugotovili so namreč, da število kromosomov pri različnih celičnih linijah variira, največ linij vsebuje 20 kromosomov. Pogosto jih je tudi 19, 21, 22 ali 44. Kariotipizacija linije DG44 je pokazala, da večina celic vsebuje 20 kromosomov, od tega 7 normalnih, 4 Z-kromosome, preostalih 9 pa je derivatov. 30-40 % rekombinantnih DG44 klonov je ta kariotip ohranilo, med tem ko je pri ostalih prišlo do novih prerazporeditev (Wurm in Hacker, 2011).

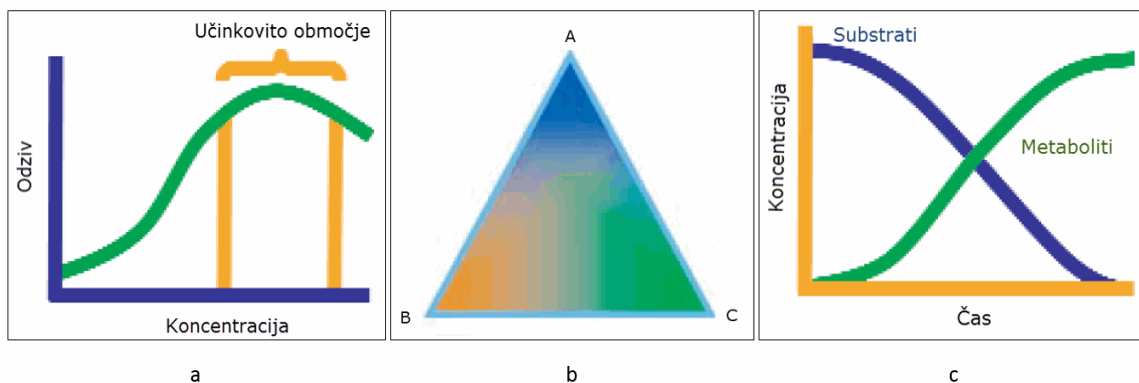
Že s pomočjo kariotipizacije 40 let nazaj so ugotovili veliko kompleksnost in raznolikost genomov med nesmrtnimi celičnimi linijami. Vse linije so podvržene konstantnim genetskim modifikacijam, ki se odražajo tudi na fenotipskih razlikah med celičnimi linijami. Do sprememb genomov prihaja tudi med gojenjem celic, saj so podvržene različnim gojitveni pogojem (Wurm in Hacker, 2011).

2.3.2 Razvoj produkcijske celične linije

Izbira gostiteljske celice, ki bo proizvajala rekombinantne proteine, ima velik vpliv na lastnosti produkta in maksimalne dosegljive izkoristke (Zhang, 2010). Privlačni so zlasti mikrobní sistemi, saj omogočajo proizvodnjo z nizkimi stroški, visokimi izkoristki in hitrim razvojem bioprocesa (Jayapal in sod., 2007). Vendar pogosto ne zagotavljajo ustreznega zvižanja in post translacijskih modifikacij produkta, ki so povezani s farmakokinetičnimi in farmakodinamičnimi lastnostmi proteinov, topnostjo, stabilnostjo, biološko aktivnostjo in zadrževalnim časom v človeku. Pomemben vidik gostiteljskih sistemov je tudi njihova varnost, saj ne smejo omogočati razmnoževanja patogenih organizmov. Iz industrijske perspektive je zaželena tudi suspenzijska rast celične kulture, ki omogoča večji volumen proizvodnih reaktorjev. Nenazadnje je pomembna tudi enostavna genetska manipulacija in zmožnost izražanja velike količine želenega proteina. Kljub vsem prednostim, pa imajo sesalske celične linije tudi negativne lastnosti. Razvoj celične linije je časovno potraten, na voljo je precej manj genskih orodij, produkcijski stroški so veliki, izkoristki pa nizki. Celične linije so prav tako občutljive na strižne sile, zaradi svoje velikosti in odsotnosti celične stene. Glavni cilj razvoja celične linije je tako pridobitev klona, ki izloča produkt ustrezne kakovosti z visoko specifično produktivnostjo (Q_p) v konstantni koncentraciji čez več generacij, kar omogoča prenos na industrijski nivo in dobičkonosno proizvodnjo (Zhang, 2010). Razvoj bioprocesa se začne z razvojem in izbiro ustrezne celične linije. Sledi proces optimizacije gojišč, dohranjevanja in rastnih pogojev, ki poteka v različnih merilih (mikrotitrne ploščice, erlenmajerice različnih velikosti, bioreaktorji). Ko so pogoji vzpostavljeni, se proces prenese na pilotni nivo, kjer se preveri ustreznost prenosa v večje merilo in se proizvede material za pred klinične študije toksičnosti. Ko so vsi parametri določeni se proces karakterizira, prenese na industrijski nivo in validira (Feng in sod., 2010).

2.3.3 Razvoj gojišč in dohranjevalnih substratov

Da lahko izkoristimo celoten potencial razvite celične linije, je pomembna tudi zagotovitev optimalnih fizikalnih in kemijskih pogojev za rast celic in proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Gojišče predstavlja ustrezne kemijske pogoje, kateri imajo velik vpliv na rastne lastnosti celične linije, količino in nenazadnje tudi kakovost proizvedenih proteinov. Razvoj ustreznega gojišča, prilagojenega vsaki celični liniji posebej, je tako ključen korak optimizacije bioprocesa (Zhang, 2010).



Slika 5: Različni pristopi razvoja gojišč. a - Titracija komponent gojišča; b - Mešanje različnih gojišč; c - Analiza izrabljenega gojišča (Fletcher, 2005:4)

Običajno je razvoj gojišča za dohranjevalne bioprocese sestavljen iz razvoja osnovnega medija in koncentriranih substratov, ki se dohranjujejo tekom bioprocesa. Zaradi varnosti končnega proizvoda se kot sestavni del osnovnega medija ne uporablja več goveji serum in drugi surovi materiali živalskega izvora, zato je bil potreben razvoj ustreznega kemijsko definirane gojišča. Le-to danes vsebuje ustrezne aminokisline, vitamine, elemente v sledovih, anorganske soli, lipide, inzulin ali inzulinu podobne rastne dejavnike. Za povečanje celične gostote se pogosto dodaja tudi rastlinske ali kvasne hidrolizate. Slednji so sestavljeni iz kratkih peptidov, ogljikovih hidratov, vitaminov, nukleozidov in mineralov, ki predstavljajo dodatna hranila v gojišču. Vendar so ravno zaradi svoje kompleksnosti, vir variabilnosti sestave gojišča (Feng in sod., 2010).

Razvoj gojišča gre običajno v smer izbire osnovnega medija, ki je kemijsko definiran in komercialno dostopen. Osnovnemu gojišču se nato doda hranila, ki so specifična za vsako celično linijo. Kljub izvoru iz iste starševske celične linije, se metabolni genotip klonov med razvojem toliko spremeni, da je potrebno gojišče prilagajati vsaki celični liniji posebej. Običajne strategije razvoja gojišča obsegajo (Zhang, 2010):

- **Pregled obstoječe literature** – identifikacija možnih rastnih substratov in dodatkov na podlagi podobnih celičnih linij (Zhang, 2010).
- **Titracija komponent gojišča** je klasičen pristop razvoja gojišča. Vanj je vključena serija poskusov, v katerih iščemo optimalen odziv celic (rast, koncentracija produkta) na različne koncentracije substratov. Slednje dodajamo posamezno v različnih

koncentracijah. Gre za metodo, pri kateri se testira le en faktor naenkrat, zaradi česar je časovno zamudna (Fletcher, 2005). Metoda je predstavljena na sliki 5a.

- **Mešanje različnih gojišč** je hitra in enostavna metoda, pri kateri preprosto zmešamo med seboj različna, že obstoječa gojišča. Pridobljene rezultate ovrednotimo in ponavljamo metodo tako dolgo, dokler ne pridobimo željenih odzivov. Vendar gre za slepo metodo, pri kateri ne vemo v kakšnih koncentracijah so substrati in kako le-ti interagirajo. Končni rezultat je tako le izboljšano gojišče, ne ve pa se kaj ga dela boljšega in kateri substrati so kritični (Fletcher, 2005). Metoda je predstavljena na sliki 5b.
- **Analiza izrabljenega gojišča** nam podaja informacije o spremembi gojišča med bioprocesom. S primerjavo izrabljenega in svežega gojišča dobimo vpogled v specifični metabolizem celične linije. Izmed vseh metod je ta še najbolj poučna, vendar je uspešnost odvisna od števila analitov, ki jih lahko merimo. Običajno gre le za omejen nabor – glukoza, laktat, amonij in aminokisline, ki nam ponujajo le osnoven vpogled v precej bolj kompleksno biologijo organizmov (Fletcher, 2005). Metoda je predstavljena na sliki 5c.
- **Načrtovanje poskusov s pomočjo statističnih programov** se uporablja za pridobivanje velikega števila informacij, ki vključujejo tudi medsebojne interakcije substratov, brez velikega števila poskusov. Orodja kot so Design Expert, ECHIP in Design-Ease nam omogočajo izbrati najnižje možno število pogojev, katerih rezultati pa so še vedno statistično zanesljivi (Zhang, 2010).
- **Uporaba mikrotitrskih plošč** je osredotočena predvsem na preizkušanje velikega števila kombinacij v relativno kratkem času. Običajno gre za uporabo robotskih sistemov in mikromrež, ki ustvarjajo velike količine podatkov, poskusi pa so lahko izvedeni v paralelkah. Negativna stran avtomatizacije je močno zmanjšan volumen celične kulture, ki ne odraža dejanskega bioprocesa (Fletcher, 2005).

Pri razvoju gojišča je najboljši pristop kombinacija več različnih metod, saj ima vsaka izmed njih svoje prednosti in slabosti. Vsaka izmed naštetih metod je lahko učinkovita, če se uporablja s specifičnim namenom in če se upošteva njene omejitve (Fletcher, 2005).

Poleg razvoja gojišča je za procese z dohranjevanjem pomemben tudi razvoj optimalnih dohranjevalnih substratov. Njihov cilj je nadomestitev porabljenih substratov, dodatek substratov za usmerjenje alternativnih metabolnih poti, preusmeritev metabolizma iz rastne v produkcijsko fazo in nadzorovanje apoptoze. Najpogostejši pristop je zgostitev osnovnega gojišča, kateremu se dodajo:

- Koncentrati hranil (aminokisline, vitamini, minerali), ki povečajo biomaso in produktivnost celic;
- preparati lipidov, specifični za posamezno celično linijo;
- pospeševalci produkcije (butirat), ki povečajo specifično produktivnost;
- kislina, baza ali pufer, ki zagotavljajo vzpostavijo optimalni optimum ali ga prilagodijo produkcijski fazi;

- antioksidanti ali rastni faktorji, ki vzdržujejo dolgoživost celične kulture in s tem podaljšujejo produkcijsko fazo;
- surfaktanti na bazi silikonov, ki preprečujejo prekomerno penjenje (Zhang, 2010).

Podobno kot razvoj gojišča, je tudi razvoj dohranjevalnih substratov ponavljajoč se proces, ki temelji predvsem na analizi porabe substratov, akumulacije stranskih produktov in zagotavljanja ravnotežja med rastjo in produkcijo celične kulture. Popolnoma optimiziran dohranjevalni substrat običajno obstaja v obliki dveh ali več raztopin, ki se med seboj razlikujejo v pogojih shranjevanja (Zhang, 2010).

2.3.4 Razvoj bioprocesa

Poleg razvoja celičnih linij, ki omogočajo doseganje visokih specifičnih produktivnosti, in razvoja optimalnih gojišč ter dohranjevalnih substratov, je pomembno tudi razumevanje bioprocesa. Slednje omogoča doseganje visokih gostot celične kulture z visokim deležem živih celic v čim daljšem časovnem obdobju, za kar je pomembna optimizacija fizikalnih, kemijskih in bioloških parametrov v bioprocusu (Zhang, 2010). Za proizvodnjo rekombinantnih proteinov se uporabljajo celične kulture z dvema načinoma rasti – adherentna in suspenzijska celična kultura. Prva se še vedno uporablja pri procesu proizvodnje eritropoetina, saj je bilo v letu 1980 težko gojiti celične linije v obliki suspenzijskih kultur. Danes je na voljo veliko različnih komercialno dostopnih gojišč, ki omogočajo prehod iz pritrjene oblike rasti sesalskih celic v suspenzijsko (Wurm, 2004).

Tipični bioproces se začne z naslednjimi koraki (Zhang, 2010):

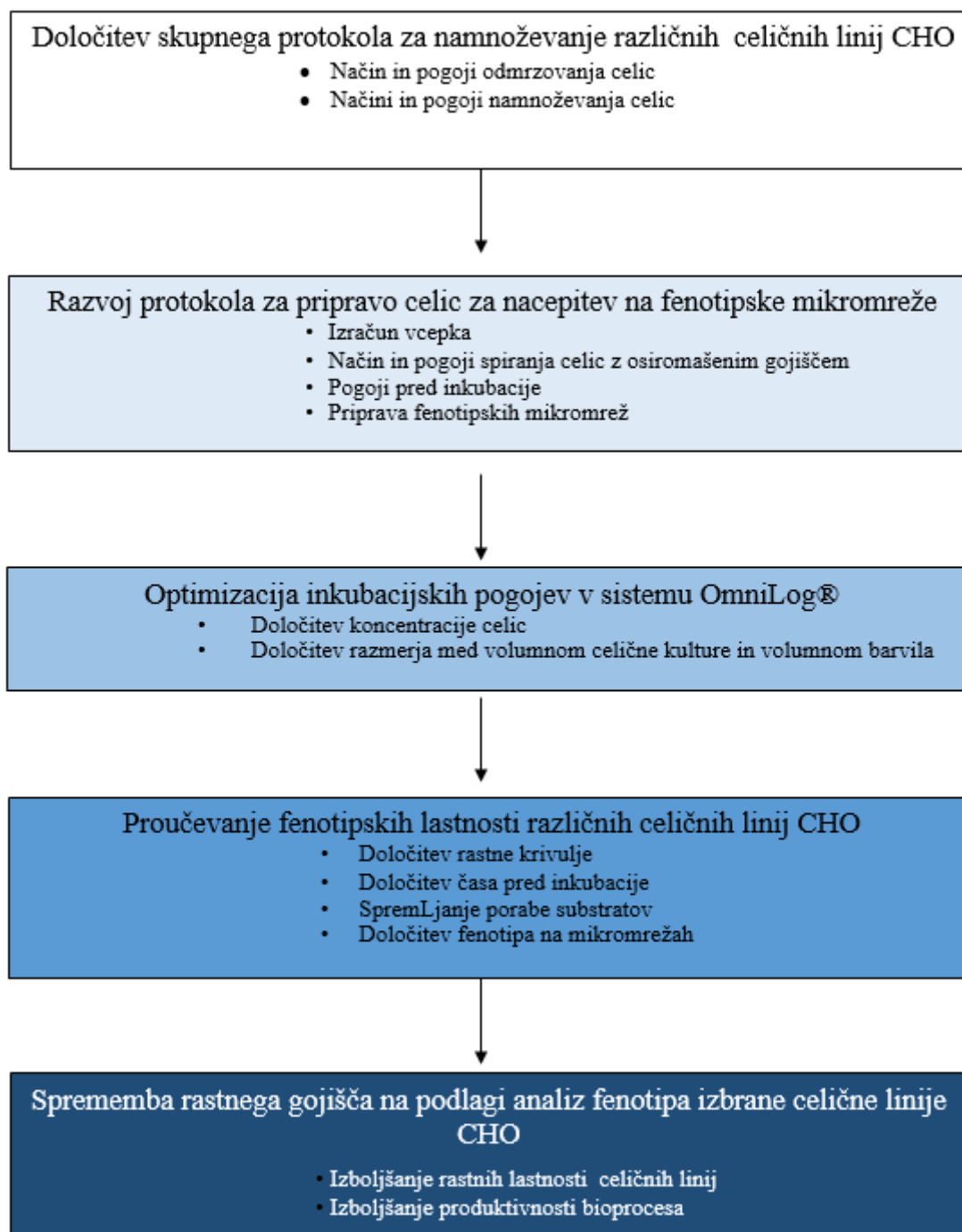
- odtajevanje celične kulture iz ustrezne delovne celične banke;
- namnoževanje celične kulture s povečevanjem delovnega volumna;
- nacepitev celic (vcepka) v bioreaktorje različnih velikosti (od 10 ml do 20 000 l);
- vodenje dohranjevalnega bioprocesa, ki omogoča doseganje visoke specifične produktivnosti;
- odvzem celičnega materiala v obliki žetev, ki predstavlja material za zaključne procese .

Za doseg visokega izražanja produkta z ustrezno kakovostjo, je potrebna v bioreaktorjih optimizacija procesnih parametrov – fizikalnih, kemijskih in bioloških. Med fizikalne spadajo temperatura, pretok zraka in mešanje; med kemijske koncentracija raztopljenega kisika, pH, ozmolarnost, redoks potencial in koncentracija substratov, aminokislin in odpadnih produktov; med biološke pa koncentracija in delež živih celic, znotraj in zunajcelične koncentracije NADH, laktat dehidrogenaze, aktivnosti mitohondrijev in analiza celičnega cikla. Odstopanje teh parametrov v mikrookolju izven optimalnih vrednosti, ima lahko velik vpliv na rast in produkcijo celične kulture ter na kakovost produkta, ki se odraža predvsem na stopnji glikozilacije in drugih post-translacijskih modifikacij, ter na prisotnost nečistoč. Zato je pomembno, da optimiziramo bioprocesne parametre in izvedemo karakterizacijo bioprocesa, ki nam daje vpogled v razumevanje, kako sprememba določenih parametrov vpliva na kakovost produkta (Feng in sod., 2010).

Poleg bioprocenih parametrov imajo na uspešnost prenosa celične kulture na industrijski nivo vpliv tudi variacije v surovih materialih, konsistentnost pripravljenih gojišč in njihova stabilnost ter stabilnost same celične linije v proizvodnih procesih. Ti problemi so pogosto odpravljeni preko prenosa v manjše merilo, za katerega je ključno, da s poustvarjanjem industrijskih pogojev priskrbi pomembne informacije o vzrokih in rešitvah proizvodnih problemov. Procesni so pomembni tudi za karakterizacijo in validacijo bioprocen, pri katerih se določi sprejemljive meje bioprocenih parametrov (Feng in sod., 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 6: Shema poteka magistrske naloge

3.2 MATERIALI

3.2.1 Sesalske celične linije

Za poskuse smo uporabili štiri industrijske celične linije CHO, ki izvirajo iz različnih starševskih celičnih linij. Med seboj se razlikujejo v starosti, stabilnosti, rastnih lastnostih, porabi substratov in vrsti končnega produkta. Ker so celične linije last farmacevtske družbe Lek d.d., smo jih v tej magistrski nalogi poimenovali s črkami. Podrobnosti so zbrane v preglednici 1. Izvorne starševske celične linije so bile pridobljene iz Ameriške zbirke celičnih kultur ATCC.

Preglednica 1: Izbrane celične linije

Oznaka celične linije	Izvorna starševska celična linija	Vrsta produkta
A	CHO-K1	Monoklonsko protitelo
B	CHO-K1	Monoklonsko protitelo
C	CHO-DXB11	Monoklonsko protitelo
D	CHO-DHFR	Glikoprotein

Za namnoževanje celičnih kultur smo uporabljali plastične erlenmajerice za enkratno uporabo, imenovane »Shake Flask« (v nadaljevanju SF), proizvajalca Corning. Pri odmrzovanju celic smo uporabljali SF250, z delovnim volumnom 50 ml. Pri precepljanju in gojenju celic za analizo fenotipa smo uporabili SF1000 z delovnim volumnom 250 ml. Za poskus spremembe ravnega gojišča pa smo uporabili SF500 z delovnim volumnom 125 ml.

3.2.2 Gojišča in dodatki za namnoževanje celic

Pri namnoževanju celičnih linij smo uporabili specifična rastna gojišča. Med seboj se razlikujejo po koncentraciji osnovnih virov ogljika in dušika ter vrsti rastnih dodatkov. Gojišča ne vsebujejo seruma, pripravljajo pa se s trikrat destilirano vodo. Podrobnega recepta za gojišča nismo zapisali, saj sodi med zaupne informacije farmacevtske družbe Lek d.d.

Za določanje fenotipskih lastnosti na mikromrežah smo sestavili posebno osiromašeno gojišče (v nadaljevanju gojišče Os), ki ne vsebuje nobenih virov ogljika in dušika, vsebuje le mikroelemente in puferski sistem.

V preglednici 2 so zbrane informacije o dodatkih, ki smo jih v rastno gojišče dodali pri poskusu spremembe ravnega gojišča.

Preglednica 2: Uporabljeni dodatki k ravnim gojiščem

Dodan substrat	Proizvajalec	Kataloška številka
Adenozin	Sigma Aldrich	A9251
Galaktoza	AppliChem	A7983
Inozin	Sigma Aldrich	I4125
Manoza	Sigma Aldrich	63580
Natrijev piruvat	Sigma Aldrich	P5280
Sukcinamidna kislina	Sigma Aldrich	134376

Ker so sestavine gojišč občutljive na visoke temperature, smo namešana gojišča sterilizirali s filtracijo skozi membrane, ki so imele velikost por 0,22 μm . Na enak način smo filtrirali tudi gojišča z dodatki ter založne raztopine dodatkov, ki smo jih dodajali med bioprocesom.

3.2.3 Fenotipske mikromreže in barvila

Osrednja metoda moje magistrske naloge je bila analiza fenotipskih lastnosti s pomočjo fenotipskih mikromrež (Phenotype MicroArrays™), ki jih proizvaja podjetje Biolog. Gre za prozorne mikrotitrne ploščice z 96 vdolbinicami, končnega volumna 200 μl . Vsaka izmed vdolbinic ima na dnu liofiliziran drug substrat (lahko tudi enak, vendar v različnih koncentracijah). Substrati predstavljajo različne vire energije, ogljika, dušika in mikroelementov. Mi smo uporabili le eno izmed fenotipskih mikromrež, imenovano PM-M1 (ang. Phenotype Microarray for Mammalian Cells 1), ki vsebuje različne vire ogljika in energije. Ploščice smo naročili pri podjetju Biolog, kataloška številka 13101.

Zaznavanje izrabe različnih virov ogljika na mikromreži PM-M1 je potekalo s pomočjo barvila, ki vsebuje mešanico različnih tetrazolijevih soli. Barvilo se imenuje Biolog Redox Dye Mix MB (6x) in smo ga kupili skupaj s fenotipskimi mikromrežami pri podjetju Biolog, kataloška številka 74352.

PM-M1 MicroPlate™ - Carbon and Energy Sources

A1 Negative Control	A2 Negative Control	A3 Negative Control	A4 α -Cyclodextrin	A5 Dextrin	A6 Glycogen	A7 Maltitol	A8 Maltotriose	A9 D-Maltose	A10 D-Trehalose	A11 D-Cellobiose	A12 β -Gentiobiose
B1 D-Glucose-6-Phosphate	B2 α -D-Glucose-1-Phosphate	B3 L-Glucose	B4 α -D-Glucose	B5 α -D-Glucose	B6 α -D-Glucose	B7 3-O-Methyl-D-Glucose	B8 α -Methyl-D-Glucoside	B9 β -Methyl-D-Glucoside	B10 D-Salicin	B11 D-Sorbitol	B12 N-Acetyl-D-Glucosamine
C1 D-Glucosaminic Acid	C2 D-Glucuronic Acid	C3 Chondroitin-6-Sulfate	C4 Mannan	C5 D-Mannose	C6 α -Methyl-D-Mannoside	C7 D-Mannitol	C8 N-Acetyl- β -D-Mannosamine	C9 D-Melezitose	C10 Sucrose	C11 Palatinose	C12 D-Turanose
D1 D-Tagatose	D2 L-Sorbose	D3 L-Rhamnose	D4 L-Fucose	D5 D-Fucose	D6 D-Fructose-6-Phosphate	D7 D-Fructose	D8 Stachyose	D9 D-Raffinose	D10 D-Lactitol	D11 Lactulose	D12 α -D-Lactose
E1 Melibionc Acid	E2 D-Melibiose	E3 D-Galactose	E4 α -Methyl-D-Galactoside	E5 β -Methyl-D-Galactoside	E6 N-Acetyl-Neuraminic Acid	E7 Pectin	E8 Sedoheptulosan	E9 Thymidine	E10 Uridine	E11 Adenosine	E12 Inosine
F1 Adonitol	F2 L-Arabinose	F3 D-Arabinose	F4 β -Methyl-D-Xylopyranoside	F5 Xylitol	F6 Myo-Inositol	F7 Meso-Erythritol	F8 Propylene glycol	F9 Ethanolamine	F10 D,L- α -Glycerol-Phosphate	F11 Glycerol	F12 Citric Acid
G1 Tricarballic Acid	G2 D,L-Lactic Acid	G3 Methyl D-lactate	G4 Methyl pyruvate	G5 Pyruvic Acid	G6 α -Keto-Glutaric Acid	G7 Succinamic Acid	G8 Succinic Acid	G9 Mono-Methyl Succinate	G10 L-Malic Acid	G11 D-Malic Acid	G12 Meso-Tartaric Acid
H1 Acetoacetic Acid (a)	H2 γ -Amino-N-Butyric Acid	H3 α -Keto-Butyric Acid	H4 α -Hydroxy-Butyric Acid	H5 D,L- β -Hydroxy-Butyric Acid	H6 γ -Hydroxy-Butyric Acid	H7 Butyric Acid	H8 2,3-Butanediol	H9 3-Hydroxy-2-Butanone	H10 Propionic Acid	H11 Acetic Acid	H12 Hexanoic Acid

Slika 7: Razporeditev substratov na fenotipski ploščici PM-M1

3.2.4 Laboratorijska oprema

Pri delu v laboratoriju smo uporabili tudi laboratorijsko opremo, naštetu v preglednici 3.

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema

OPREMA / PROGRAM	PROIZVAJALEC	NAMEN
HPLC	Agilent	Določanje koncentracije protiteles
Analitska tehnica	Mettler Toledo	Priprava gojišč
Avtomatske pipete	Sartorius	
Biophotometer	Eppendorf	Merjenje koncentracije substratov
Bioprofile® 400	Nova Biomedical	Merjenje koncentracije substratov in metabolitov
Centrifuga	Eppendorf	Priprava celic za fenotipsko analizo na mikromrežah
CO ₂ stresalnik	Kühner	Inkubacija celičnih kultur
Design Expert 8.0	Stat-Ease	Izdelava načrta poskusov in obdelava podatkov
Hladilnik	Angelatorri	Shranjevanje vzorcev in materiala
Krioposoda	Custom BioGenic Systems	Shranjevanje zamrznjenih celičnih kultur
Mikrobiološka komora	Iskra PIO d.o.o.	
Multikanalne pipete	Sartorius	Polnjenje fenotipskih mikromrež
OmniLog®	Biolog	Analiza fenotipa celičnih linij
PMM Kinetic	Biolog	Obdelava podatkov fenotipske analize
Termoblok	Biometra	Odtajevanje zamrznjenih celičnih kultur
Vakuumska črpalka	Millipore	Priprava gojišč
Vibro-mix mešalo	Tehnica	
Vi-Cell XR	Beckmann Coulter	Določanje koncentracije in deleža živih celic
Vodna kopel	Kambič	Gretje gojišč
Zamrzovalna skrinja -80 °C		Shranjevanje vzorcev

3.3 METODE

3.3.1 Odmrzovanje in namnoževanje celic

Krioviale z zamrznjeno celično kulturo so bile shranjene v krioposodah s tekočim dušikom, na temperaturi -185°C . Pri odmrzovanju smo uporabili tehniko direktnega odmrzovanja. Izbrane zamrznjene krioviale smo vstavili v termoblok segret na 37°C za 3 – 4 minute. Nato smo 1 ml vsebine prenesli v 49 ml ogretega rastnega gojišča, pripravljenega v SF250. Inkubacija je potekala v CO_2 stresalniku na $36,5^{\circ}\text{C}$, 10 % CO_2 in pri stresanju 200 obratov na minuto (v nadaljevanju rpm).

Po 3 dneh namnoževanja celic v SF250 smo izvedli drugo pasažo (v nadaljevanju P2) - celice smo prenesli v ogreto sveže rastno gojišče, pripravljeno v SF1000 in jih nacepili v koncentraciji $2 \cdot 10^5$ celic/ml. Volumen vcepka smo izračunali po Enačbi 1.

$$V_{\text{vcepka}} (\text{ml}) = \left| \frac{\text{zaželena koncentracija živih celic} \left(\frac{\text{celic}}{\text{ml}} \right) \times \text{končni volumen celične kulture} (\text{ml})}{\text{izmerjena koncentracija živih celic} \left(\frac{\text{celic}}{\text{ml}} \right)} \right| \dots (1)$$

Namnoževanje celic je potekalo v CO_2 stresalniku na $36,5^{\circ}\text{C}$, 10 % CO_2 in pri stresanju 200 rpm do uporabe celic za fenotipsko analizo ali bioprocese.

Ker je pri namnoževanju celic za fenotipsko analizo s pomočjo mikromrež zelo pomembna zgodovina namnoževanja celic (vrsta gojišča, pogoji inkubacije, čas gojenja), smo vse celične linije v vseh poskusih odmrzovali in namnoževali na enak način. Vse precepitve so potekale v enakih časovnih intervalih - tretji dan po odmrzovanju celic.

3.3.2 Priprava celic za fenotipsko analizo na mikromrežah

Analizo fenotipa celičnih linij smo izvedli vedno po drugi pasaži, običajno od tretjega dneva naprej. Koncentracija celic na mikromrežah je bila $6,5 \cdot 10^5$ celic/ml (poglavje 3.3.3), ciljni volumen pa je bil odvisen od števila mikromrež, ki smo jih napolnili. Za napolnitev ene mikromreže smo potrebovali okoli 7 ml celične kulture, upoštevajoč rezervo in izgube pri prenosu celic. Volumen vcepka smo izračunali po Enačbi 1.

Ustrezen volumen celic smo sterilno odvzeli iz gojitvene posode v mikrobiološki komori ter ga prenesli v sterilno mikrocentrifugirko z maksimalnim volumnom 50 ml. Celice smo nato centrifugirali v namizni centrifugi 5 min pri sobni temperaturi in centrifugalni sili 180 g. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in celice resuspendirali s 40 ml ogretega gojišča Os. Zopet je sledilo centrifugiranje pod omenjenimi pogoji, odstranitev supernatanta in resuspendiranje celične usedline z ustreznim volumnom gojišča Os.

Celice v koncentraciji $6,5 \cdot 10^5$ celic/ml, sedaj v gojišču Os, smo nato prenesli na fenotipske mikromreže PM-M1 z avtomatsko pipeto tako, da je bilo v vsaki luknjici 60 μl celične kulture. Mikromreže smo nato pokrili s plastičnim pokrovom in izvedli 4-urno pred inkubacijo (pred dodatkom barvila) v gojitvenem sistemu OmniLog, pri temperaturi $36,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Namen predinkubacije je bil poraba energijskih zalog celice.

Po pred inkubacijo smo mikromreže prenesli nazaj v mikrobiološko komoro in celicam v luknjicah dodali 12 μ l/luknjico barvila MB. Mikromreže smo nato prekrili s prozorno plastično folijo, ki preprečuje okužbe celične kulture ter izhlapevanje, hkrati pa omogoča optično odčitavanje absorbance v sistemu OmniLog. Tako pripravljene mikromreže smo nato razporedili na ustrezna mesta v sistemu OmniLog in zagnali program OmniLog Data Collection, ki omogoča vpis podatkov o celični liniji na posameznih mestih. Sledil je zagon optičnega branja absorbance, ki je trajal 24 ur, v časovnih intervalih 15 min.

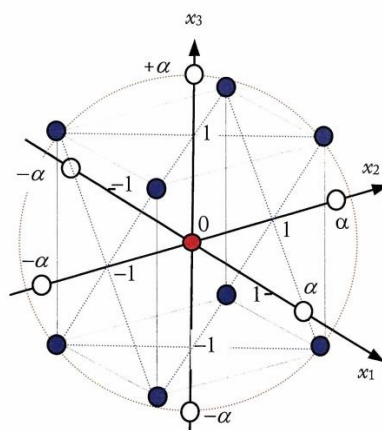
3.3.3 Optimizacija inkubacijskih pogojev za fenotipsko analizo

Ker je končni rezultat fenotipske analize močno odvisen od načina namnoževanja in priprave celic, smo vse celične linije namnoževali in pripravljali po postopkih, opisanih v poglavjih 3.3.1 in 3.3.2. Prav tako je rezultat odvisen od inkubacijskih pogojev, kamor spadata koncentracija celic v luknjicah in razmerje med volumnom celične kulture ter barvila MB. Poleg teh dveh dejavnikov smo preverili tudi, ali koncentracija glukoze na mikromrežah vpliva na višino absorbance.

Za optimizacijo izbranih pogojev in potrditev prve hipoteze smo izbrali statistično metodologijo načrtovanja eksperimentov (ang. Design of Experiments; DoE), ki smo jo izvedli s pomočjo računalniškega programa Design Expert, verzija 8.0. Glavni prednosti metodologije DoE v primerjavi s klasično optimizacijo posameznih parametrov sta manjše število potrebnih eksperimentov in zaznavanje interakcij med izbranimi parametri.

Za optimizacijo smo izbrali dopolnjeni zvezdasti ali sestavljeni središčni načrt (central composite design), v katerem so vsi trije parametri predvideni na petih nivojih ($-\alpha$, -1 , 0 , 1 , $+\alpha$). Načrt spada med večnivojske eksperimentalne načrte, ki omogočajo izgradnjo statističnega modela in optimizacijo sistemskih odzivov. Uporabljen načrt je sestavljen iz:

- **Popolnega dvonivojskega načrta za tri parametre** kjer so ti uravnani na vmesnih nivojih (1 , -1) (slika 8; 8 modrih točk).
- **Delnega zvezdastega načrta za tri parametre**, kjer so vsi razen enega uravnani na sredinskem nivoju (0), tisti ki ostane, pa je uravnan na najvišji oz. najnižji nivo ($\pm\alpha$). Ker so to najvišje oz. najnižje vrednosti parametrov, mora biti vrednost parametra α večja od 1 . Parameter α je del vrtljivega eksperimentalnega načrta, pri katerem so vsi eksperimenti od središčne točke enako oddaljeni. Posledično so napovedi tega modela enako zanesljive po celotnem merilnem območju, ki ga določa parameter α (slika 8; 6 belih točk).
- **Središčnih eksperimentalnih točk**, katere imajo vse tri parametre uravnane na sredinskem nivoju (0), (slika 8; rdeča točka) (Zupan, 2009).



Slika 8: Prikaz eksperimentalnih točk sestavljenega središčnega načrta (Zupan, 2009: 45)

Metodologija DoE se začne z izborom systemskega odziva, ki ga želimo optimizirati. Kot systemski odziv smo opredelili vrednost absorbance pri valovni dolžini $\lambda = 590 \text{ nm}$ (A_{590}) na začetku inkubacije (čas 0), po štirih urah inkubacije (čas 4), po 8 urah inkubacije (čas 8) in po 12 urah inkubacije (čas 12). Na ta način smo časovno odvisen odziv razdelili na štiri merljive systemske odzive.

Sledil je izbor parametrov, ki naj bi vplivali na systemski odziv. Izbrali smo tri parametre in določili njihove mejne vrednosti ($\pm\alpha$) (Preglednica 4). V našem primeru je bila vrednost $\alpha = 1,33$ in je program preko teh podatkov izračunal centralno točko in vmesne točke.

Preglednica 4: Seznam izbranih parametrov za optimizacijo inkubacijskih pogojev.

PARAMETER	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Koncentracija CHO celic [celic/ml]	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^5$
Koncentracija glukoze v gojišču [g/l]	0,078	0,300	1,000	1,700	1,920
Razmerje med prostornino celične kulture in barvila MB [1]	0,070	0,100	0,200	0,300	0,330

Program nam je izdelal načrt, razviden iz preglednice 5. V načrtu so posamezni eksperimenti razporejeni v naključno zaporedje, kar zmanjša možnost vpliva morebitnih nekontroliranih parametrov (v našem primeru položaj mikrotitrne plošče v inkubacijski komori, razporeditev temperature).

Preglednica 5: Seznam poskusov in njihovi parametri

Številka poskusa	Koncentracija živih celic/ml	Koncentracija glukoze [g/l]	Razmerje med barvilom in kulturo
1	200000	0,30	0,17
2	200000	0,30	0,17
3	800000	0,30	0,17
4	800000	0,30	0,17
5	200000	1,70	0,17
6	200000	1,70	0,17
7	800000	1,70	0,17
8	800000	1,70	0,17
9	200000	0,30	0,30
10	200000	0,30	0,30
11	800000	0,30	0,30
12	800000	0,30	0,30
13	200000	1,70	0,30
14	200000	1,70	0,30
15	800000	1,70	0,30
16	800000	1,70	0,30
17	105179	1,00	0,20
18	105179	1,00	0,20
19	894821	1,00	0,20
20	894821	1,00	0,20
21	500000	0,08	0,20
22	500000	0,08	0,20
23	500000	1,92	0,20
24	500000	1,92	0,20
25	500000	1,00	0,17
26	500000	1,00	0,17
27	500000	1,00	0,33
28	500000	1,00	0,33
29	500000	1,00	0,20
30	500000	1,00	0,20
31	500000	1,00	0,20
32	500000	1,00	0,20
33	500000	1,00	0,20
34	500000	1,00	0,20

V našem eksperimentalnem načrtu so bili vsi eksperimenti izvedeni v dveh paralelkah, z izjemo središčenega eksperimenta, ki je v šestih paralelkah.

Za poskus smo uporabili gojišče Os, kateremu smo dodali ustrezeni volumen glukoze, ki je bila pripravljena kot založna raztopina s koncentracijo 200 g/l. Celice smo pripravili na enak način, opisan v poglavju 3.3.2, le da smo volumen celične kulture prilagajali zahtevani koncentraciji celic, v skladu s preglednico 5. Celično kulturo, z ustrežno koncentracijo celic in glukoze, smo nato nanесли na prazne mikrotitrne ploščice. Sledil je dodatek barvila MB v ustreznem volumnu in pričetek inkubacije. Vsak poskus (1 – 34) je bil izveden na svoji mikrotitrski ploščici (ima 96 luknjic z enakimi pogoji), tako da so pridobljeni rezultati absorbanc, prikazani v preglednici 5, povprečje 96-ih meritev.

3.3.4 Pregled fenotipskih lastnosti štirih različnih celičnih linij

Namen poskusa je bil potrditev druge in tretje hipoteze. Želeli smo:

- Določiti čas preživetja izbranih celičnih linij v osiromašenem gojišču Os
- Določiti rastno krivuljo in trend porabe substratov
- Ugotoviti povezavo med koncentracijo substratov v gojišču in fenotipskimi lastnostmi na mikromrežah PM-M1, ki vsebujejo različne vire ogljika in energije

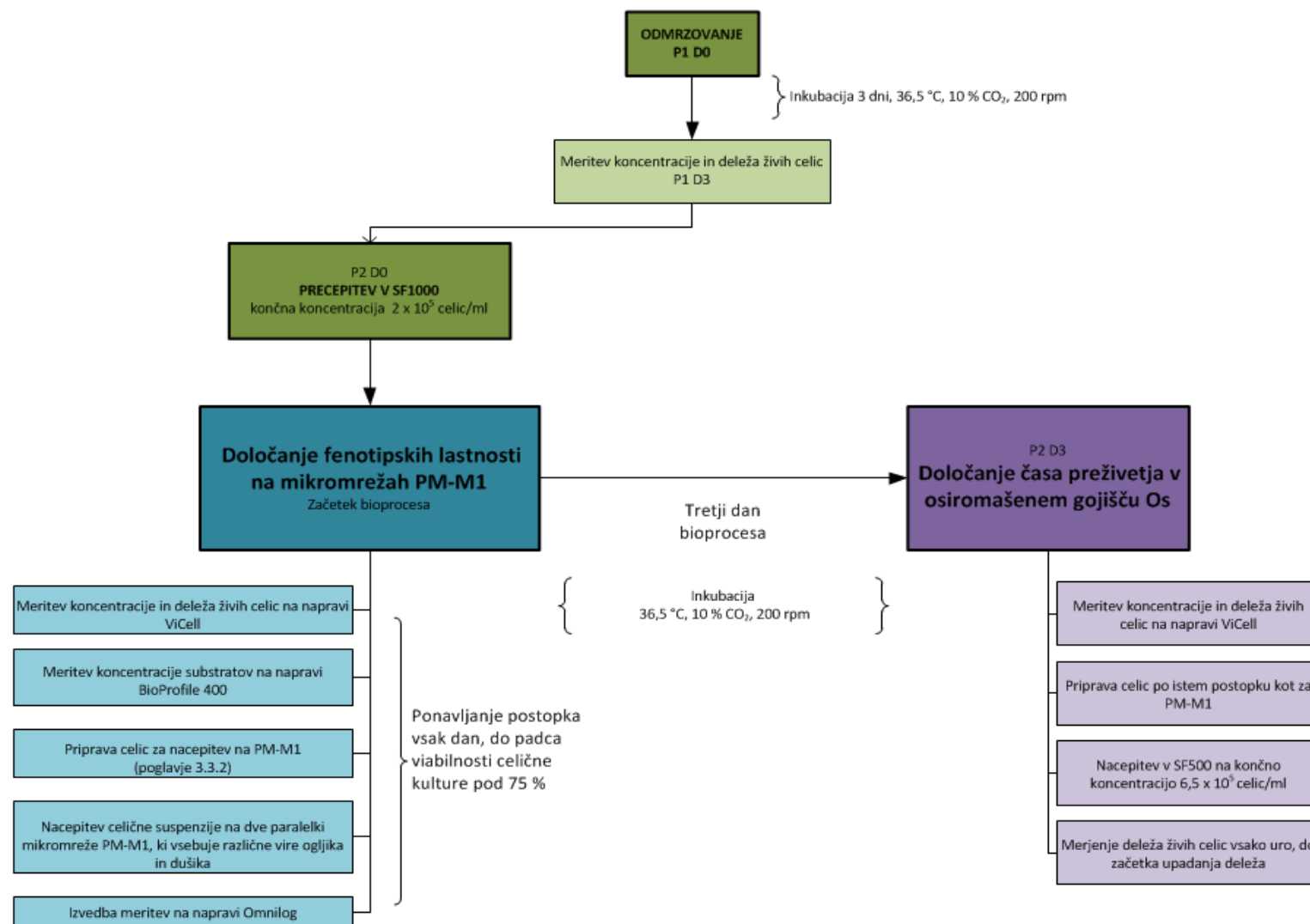
Izbrali smo štiri, po produktu različne celične linije CHO (A – D), ki smo jih odmrznili v specifičnih rastnih gojiščih. Rastna gojišča za celične linije A - C so vsebovala enake koncentracije glutamina in glukoze, medtem ko je bila njuna koncentracija v gojišču za celično linijo D prepolovljena. Potek poskusa je razviden s slike 9.

Celične linije smo odmrznili na enak način – po postopku direktnega odmrzovanja (poglavje 3.3.1). Gojenje je potekalo v inkubatorju na 36,5 °C, 10 % CO₂ in 200 rpm za vse celične linije, razen za linijo D, ki smo jo stresali na 120 rpm. Po treh dneh gojenja smo precepili celice v 250 ml svežega rastnega gojišča (SF1000), s koncentracijo $2 \cdot 10^5$ celic/ml in tako začeli z bioprosom.

Od začetka bioprosoma smo spremljali koncentracijo in delež živih celic, merili pa smo tudi koncentracije substratov, predvsem glutamina in glukoze. Na dan 4 smo začeli proučevati tudi fenotipske lastnosti na mikromrežah PM-M1, ki vsebujejo različne vire ogljika in energije. Izvajanje poskusov na mikromrežah je bilo pred dnevom 4 nesmiselno, saj je bila začetna koncentracija celic $2 \cdot 10^5$ /ml. To pomeni, da morajo celice doseči vsaj celično gostoto $6,5 \cdot 10^5$ celic/ml, če jih želimo prenesti na mikromreže brez dodatnega koncentriranja. Ker so imele celice do dneva 4 na voljo tudi še vse ključne substrate, smo z analizo fenotipa pričeli šele na dan 4 pri celičnih linijah A, B in C, pri celični liniji D pa že na dan 3, saj je rastno gojišče vsebovalo polovične vrednosti glutamina.

Tretji dan bioprocesa smo uporabili eno izmed paralelk za določanje časa preživetja celic v gojišču Os. S tem poskusom smo določili optimalen čas pred inkubacije – to je čas, od nacepitev celične kulture na mikromreže, do dodatka barvila. Celice smo pripravili na enak način, kot za nacepitev na fenotipske mikromreže (poglavje 3.3.2). Nacepili smo jih na končno koncentracijo $6,5 \cdot 10^5$ celic/ml v 125 ml gojišča Os. V časovnem intervalu 1 ure smo na napravi Vi-Cell XR® merili delež živih celic, dokler le-ta ni začel upadati.

Celice smo za nacepitev pripravili po že ustaljenem postopku (poglavje 3.3.2), nato pa jih nacepili na dve paralelni mikromreži PM-M1. Po štirih urah pred inkubacije smo dodali barvilo MB in začeli izvajati meritve na napravi OmniLog. Proučevanje fenotipskih lastnosti je potekalo od dneva 4 naprej, dokler ni delež živih celic padel pod 75 %.



Slika 9: Shema pregleda fenotipskih lastnosti različnih celičnih linij

3.3.5 Sprememba ravnega gojišča na podlagi rezultatov

Na podlagi rezultatov fenotipskih mikromrež, smo spremenili ravnno gojišče celične linije A. Namen poskusa je bil potrditi zadnjo hipotezo - ugotoviti ali je tehnologija fenotipskih mikromrež primerno orodje za razvoj bioprocesov, natančneje za razvoj gojišč.

Glede na ravnne lastnosti vseh štirih celičnih linij, smo se odločili za celično linijo A (poglavje 4.7). S spremembo ravnega gojišča smo želeli:

- Izboljšati ravnno celične linije
- Podaljšati bioproces
- Povečati produktivnost bioprocasa

Sprememba ravnega gojišča je potekala na podlagi rezultatov, opisanih v poglavju 4.3. Poskus smo razdelili na več sklopov, v vsakem smo dodali drug substrat. Kot negativno kontrolo smo uporabili specifično ravnno gojišče celične linije A, v katerem sta glavna vira ogljika in dušika glukoza in glutamin. Rezultati tega poskusa so nam služili kot referenčne vrednosti. Potek poskusa je razviden s slike 10.

Vsak dan bioprocasa smo določali koncentracijo in delež živih celic s pomočjo naprave Vi-Cell® XR. Koncentracije substratov in metabolitov smo merili s pomočjo naprave Bioprofile 400 in encimskih kitov, proizvajalca Megazyme. Koncentracijo monoklonskih protiteles smo merili s pomočjo afinitetne kromatografije. Analitske metode so opisane v poglavju 3.3.6.

a) Uporaba alternativnih sladkorjev

Kot glavni sladkor celična linija A uporablja glukozo. Zanimalo nas je, ali lahko dodatek galaktoze ali manoze v ravnno gojišče izboljša ravnno celične linije, podaljša bioproces ali poveča sintezo produkta. V specifično ravnno gojišče smo dodali manozo ali galaktozo, njuna koncentracija je predstavljala 50 % koncentracije glukoze.

Zanimalo nas je tudi ali v prisotnosti alternativnih virov ogljika celična linija A preferenčno izrablja glukozo. Ravnno gojišče smo modificirali tako, da smo koncentracijo glukoze prepolovili in dodali galaktozo ali manozo. Razmerje med glukozo in alternativnim sladkorjem je bilo 1:1. Povzetek poskusov je razviden iz preglednice 6.

b) Uporaba nukleozidov

Rezultati na fenotipskih mikromrežah so kazali sposobnost izkoriščanja adenoizina in inozina na vseh celičnih linijah, zato smo se odločili, da bomo preverili vpliv teh nukleozidov na ravnno in produkcijske lastnosti celične linije A.

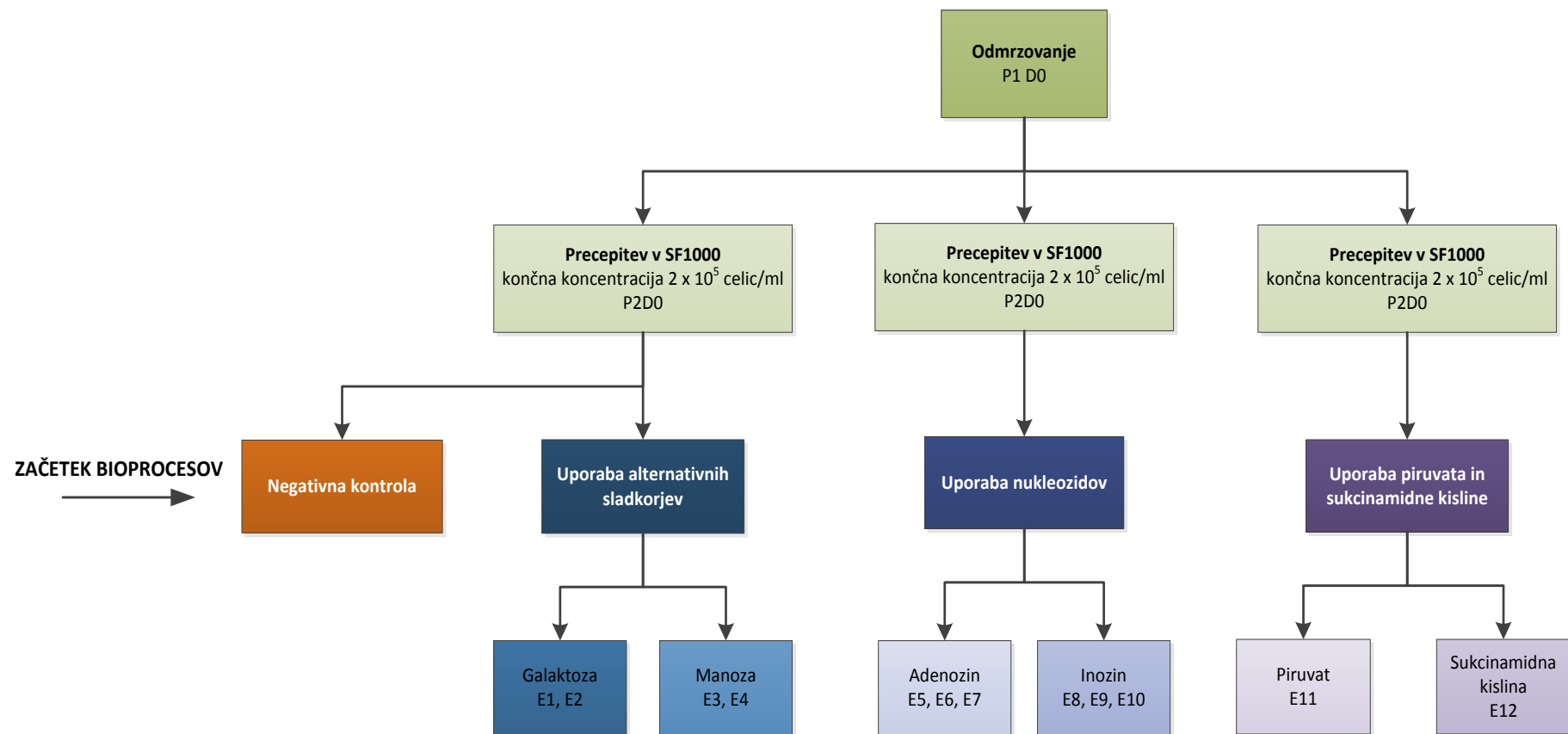
Ker so poznani citotoksični in citostatični učinki nukleozidov, smo ju na začetku dodali v koncentraciji 1 g/l, že po enem dnevu eksperimenta pa smo ugotovili, da je bila izbrana koncentracija previsoka. Poskus smo tako ponovili in uporabili še koncentraciji 0,5 in 0,1 g/l. Povzetek poskusov je razviden iz preglednice 6.

c) Uporaba piruvata in sukcinamidne kisline

Iz analize fenotipa celične linije A je bilo opaziti, da se ob pomanjkanju glutamina v rastnem gojišču poveča sposobnost izkoriščanja piruvata in sukcinamidne kisline. Izvedli smo poskus, pri katerem smo omenjena substrata dodali ločeno v gojišče že na začetku, v koncentraciji 50 % koncentracije glukoze.

Preglednica 6: Povzetek bioprosesov s spremembami rastnega gojišča

Sklop poskusov	Oznaka poskusa	Dodan substrat	Modifikacija gojišča
Negativna kontrola	E0	-	-
Alternativni viri sladkorjev	E1	Galaktoza	K osnovnemu gojišču dodana galaktoza v koncentraciji 50 % koncentracije glukoze
	E2	Galaktoza	Koncentracija glukoze v osnovnem gojišču je razpolovljena, dodana galaktoza. Razmerje glukoze in galaktoze je 1:1
	E3	Manoza	K osnovnemu gojišču dodana manoza v koncentraciji 50 % koncentracije glukoze
	E4	Manoza	Koncentracija glukoze v osnovnem gojišču je razpolovljena, dodana manoza. Razmerje glukoze in manoze je 1:1
Dodani nukleozidi	E5	Adenozin	Koncentracija adenozina 1 g/l
	E6	Adenozin	Koncentracija adenozina 0,5 g/l
	E7	Adenozin	Koncentracija adenozina 0,1 g/l
	E8	Inozin	Koncentracija inozina 1 g/l
	E9	Inozin	Koncentracija inozina 0,5 g/l
	E10	Inozin	Koncentracija inozina 0,1 g/l
Uporaba piruvata	E11	Piruvat	K osnovnemu gojišču dodan piruvat v koncentraciji 50 % koncentracije glukoze.
Uporaba sukcinamidne kisline	E12	Sukcinamidna kislina	K osnovnemu gojišču dodana sukcinamidna kislina v koncentraciji 50 % koncentracije glukoze

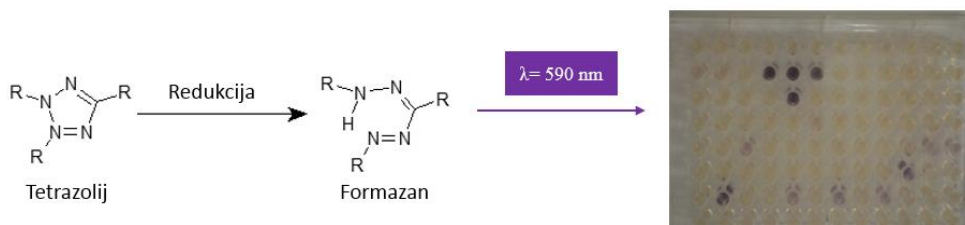


Slika 10: Shema spremembe rastnega gojišča

3.3.6 Analitske metode

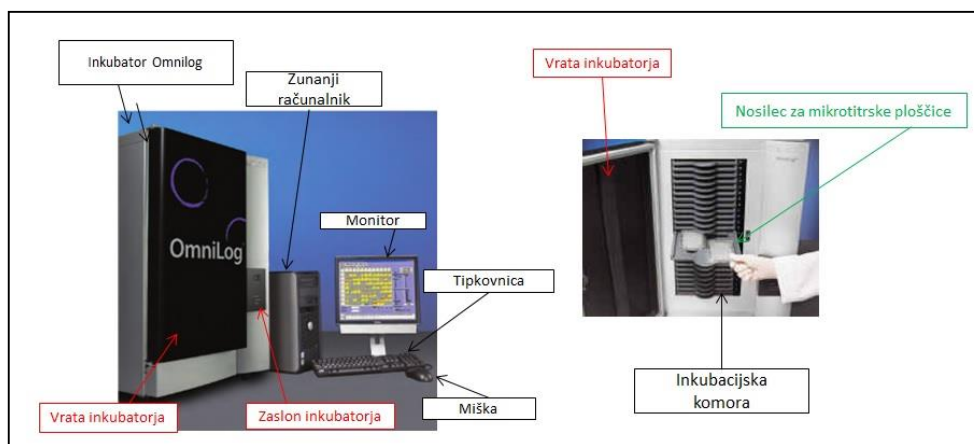
3.3.6.1 Določanje fenotipskih lastnosti s pomočjo mikromrež in naprave OmniLog

Fenotipske lastnosti celičnih linij smo merili s pomočjo fenotipskih mikromrež, opisanih v poglavju 2.3.4. Metoda temelji na zaznavanju metabolne aktivnosti preko kolorimetričnih reakcij. Celični kulturi, nanešeni na mikromreže, dodamo reagent, ki vsebuje mešanico tetrazolijevih soli. V primeru, da je v posamezni vdolbinici na voljo substrat, katerega lahko celica uporablja, le-tega oksidira, pri tem pa nastane reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH). Slednji reagira z barvilom – oksidira tetrazolijeve soli v vijoličen formazan, katerega zazna naprava OmniLog z merjenjem absorbance pri 590 nm (Biolog Inc., 2007b). Reakcija je prikazana na sliki 11.



Slika 11: Redukcija tetrazolijevih soli

Kolorimetrične meritve smo izvedli na napravi OmniLog. Naprava se upravlja preko zunanjega računalnika s pomočjo programa OmniLog Data Collection. Mikromreže z nanešeno celično kulturo in dodanim barvilom smo vstavili v posebne nosilce za mikromreže (slika 12), temperaturo inkubacijske komore pa smo nastavili na 36,5 °C. Naprava je v časovnem intervalu 15 min s pomočjo dveh optičnih kamer odčitavala absorbanco pri 590 nm. Koncentracija nastalega formazana je linearna s količino nastalega NADH (Biolog Inc., 2007b).



Slika 12: Sistem OmniLog (Biolog Inc., 2014: 5)

3.3.6.2 Določanje koncentracije in deleža živih celic

Koncentracijo in delež živih celic smo merili s pomočjo naprave Vi-Cell® XR, proizvajalca Beckman Counter. Metoda temelji na barvanju celic z barvilom tripan modro, v razmerju 1:1. Barvilo prodre skozi celično membrano mrtvih celic, ki se tako obarvajo modro, medtem ko žive celice ostanejo neobarvane. Barvilo ločuje le med mrtvimi in živimi celicami, ne ločuje pa apoptotičnih in nekrotičnih celic (Beckman Coulter Inc., 2014).

3.3.6.3 Določanje koncentracije osnovnih virov ogljika in dušika

Koncentracijo osnovnih virov ogljika in dušika smo merili s pomočjo naprave Bioprofile 400, proizvajalca Nova Biomedical. Naprava meri substrate in metabolite s pomočjo encimskih biosenzorjev. Pri tem se uporabljajo polimerne membrane, na katere so imobilizirani encimi. Le-ti katalizirajo oksidacijo substratov (glukoza, laktat, glutamin, glutamat), pri čemer nastaja vodikov peroksid. Koncentracije natrijevega, kalijevega in amonijevega iona so merjene preko ionsko selektivnih elektrod (ISE), katere merijo ionsko aktivnost. Ko so elektrode v stiku z vzorcem, se razvije električni potencial. Slednji je proporcionalen logaritmu ionske aktivnosti in je merjen glede na referenčno elektrodo (Nova Biomedical, 2002).

3.3.6.4 Določanje koncentracije galaktoze, manoze in piruvata

Za določanje koncentracije galaktoze, manoze in piruvata v naših poskusih smo uporabili hitere teste proizvajalca Megazyme. Kiti temeljijo na uporabi različnih encimov, ki pretvorijo izbrani substrat v lažje merljivo obliko (β -D-galaktoza, glukoza-6-fosfat) ter dodatku oksidanta NAD^+ . Slednji se reducira v NADH, njegova koncentracija pa je izmerjena s pomočjo absorbanca pri 340 nm. Koncentracija NADH je stehiometrična s količino galaktoze, manoze ali piruvata v vzorcu (Megazyme, 2013a, 2013b, 2013c).

Za določanje koncentracije galaktoze smo uporabili encimski kit za merjenje koncentracije laktoze in galaktoze (Lactose & D-Galactose Rapid Assay, kataloška številka K-LACGAR) (Megazyme, 2013a). Za določanje koncentracije manoze smo uporabili encimski test, ki meri D-manozo, D-fruktozo in D-glukozo (kataloška številka K-MANGL), proizvajalca Megazyme (Megazyme, 2013b). Za določanje koncentracije piruvata v naših poskusih, smo uporabili encimski test za merjenje piruvata (kataloška številka K-PYRUV), proizvajalca Megazyme (Megazyme, 2013c).

3.3.6.5 Določanje koncentracije monoklonskih protiteles

Koncentracijo monoklonskih protiteles smo merili s pomočjo visokotlačne tekočinske kromatografije z visoke ločljivosti (HPLC). Metoda temelji na afinitetni kromatografiji, kjer je protein A kovalentno vezan na površino stacionarne faze. Nanj se vežejo monoklonska protitelesa z regijo Fc, stabilnost povezave pa je odvisna od pH vrednosti okolja. Mobilno fazo tako predstavlja pufer, katerega gradient teče od pH 7,5 (vzpostavitev povezave med monoklonskim protitelesom in proteinom A) do pH 2, kjer se povezava poruši in se produkt izpira iz kolone. Pri tem je njegova koncentracija izmerjena preko UV detektorja.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Glavni cilj magistrske naloge je bil preveriti uporabnost fenotipskih mikromrež za proučevanje metabolizma celičnih linij CHO. Če smo želeli doseči ta cilj, smo morali najprej optimizirati inkubacijske pogoje in sestaviti protokol, ki bo omogočal primerjavo različnih celičnih linij. Sledilo je proučevanje metabolizma in primerjava štirih različnih celičnih linij CHO. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo nato spremenili rastna gojišča in preverili vpliv alternativnih substratov na rast in produkcijo celične linije A.

Prvi korak pri razvoju splošnega protokola, potrebnega za potrditev prve hipoteze, je bila določitev optimalne koncentracije celic na mikromrežah in razmerje med volumnom celične kulture ter barvila MB.

Rezultati absorbanc, prikazanih v preglednici 7, so povprečne vrednosti 96-ih meritev. Rezultate smo prenesli v program Design Expert, ki nam je izračunal ustrezeni statistični model za optimizacijo parametrov. Slike ki sledijo, so izvzete iz omenjenega računalniškega programa.

Če želimo opisati povezave med izbranimi parametri (A – koncentracija CHO celic, B – koncentracija glukoze, C – razmerje prostornin celične kulture in barvila) ter odzivi sistema na njihove vrednosti (absorbanca ob času 0 h, 4 h, 8 h in 12 h), potrebujemo matematično povezavo, ki ji pravimo model. Modelne funkcije, pridobljene z metodologijo načrtovanja poskusov, so polinomi različnih stopenj, pri katerih je le-ta odvisna od količine parametrov, s katerimi operiramo in kompleksnostjo njihovega vpliva na sistemski odziv (Zupan, 2009).

4.1 OPTIMIZACIJA INKUBACIJSKIH POGOJEV

Preglednica 7: Seznam nastavitvev parametrov in njihovi rezultati

Seznam nastavitvev poskusa				Odzivi na nastavitve poskusa			
Številka poskusa	Koncentracija živih celic / ml	Koncentracija glukoze [g/l]	Razmerje med barvilom in kulturo	Minimalna absorbanca	Absorbanca po 4 h	Absorbanca po 8 h	Maksimalna absorbanca
1	200000	0,30	0,17	55	89	110	120
2	200000	0,30	0,17	52	102	116	136
3	800000	0,30	0,17	112	286	313	325
4	800000	0,30	0,17	117	284	316	325
5	200000	1,70	0,17	70	111	138	149
6	200000	1,70	0,17	55	99	122	131
7	800000	1,70	0,17	114	289	321	329
8	800000	1,70	0,17	115	288	317	323
9	200000	0,30	0,3	90	192	215	221
10	200000	0,30	0,3	85	178	203	213
11	800000	0,30	0,3	150	332	346	349
12	800000	0,30	0,3	144	335	347	350
13	200000	1,70	0,3	80	178	203	216
14	200000	1,70	0,3	80	181	206	223
15	800000	1,70	0,3	139	338	349	352
16	800000	1,70	0,3	123	341	352	352
17	105179	1,00	0,2	62	88	100	97
18	105179	1,00	0,2	62	78	99	104
19	894821	1,00	0,2	154	332	345	350
20	894821	1,00	0,2	149	333	347	350
21	500000	0,08	0,2	81	215	261	273
22	500000	0,08	0,2	91	209	256	270
23	500000	1,92	0,2	88	253	294	305
24	500000	1,92	0,2	95	251	290	303
25	500000	1,00	0,17	80	186	225	234
26	500000	1,00	0,17	70	224	265	276
27	500000	1,00	0,33	76	283	326	337
28	500000	1,00	0,33	106	314	337	342
29	500000	1,00	0,2	104	256	290	300
30	500000	1,00	0,2	105	245	286	298
31	500000	1,00	0,2	95	253	288	300
32	500000	1,00	0,2	97	247	286	298
33	500000	1,00	0,2	93	240	288	295
34	500000	1,00	0,2	88	240	291	297

Vzpostavitev statističnega modela z uporabo programske opreme Design Expert, poteka po več stopnjah (Stat-Ease, 2001):

a) Izbira statistično ustreznega modela

V prvi stopnji se izbere statistično ustrezen model, kar je prikazano na sliki 13. Programska oprema ponuja štiri možnosti: linearni model, polinomski model prve stopnje, kvadratni in kubični model. Izbira modela se izvede samodejno glede na analizo prilagajanja eksperimentalnih vrednosti odziva s predlaganim modelom, kar je izraženo z vrednostjo faktorja determiniranosti (R^2). Pri metodologiji načrtovanja poskusov se uporabljata dve obliki faktorja determiniranosti: prilagojena vrednost, ang. adjusted value ($\text{Adj } R^2$) in napovedna vrednost, ang. predicted value ($\text{Pred } R^2$). Prilagojena vrednost je izračunana vrednost faktorja, kjer se upoštevajo samo signifikantni parametri in njihove interakcije. To pomeni, da je zato njegova vrednost večinoma nižja od originalne vrednosti faktorja determiniranosti (R^2), kateri upošteva vse spremenljivke in njihove interakcije, tudi če nekatere od teh statistično ne vplivajo na analiziran odziv (Stat-Ease, 2001).

Response	1	Minimalni od Transform:	None		
*** WARNING: The Cubic Model and higher are Aliased! ***					
Summary (detailed tables shown below)					
	Sequential	Lack of Fit	Adjusted	Predicted	
Source	p-value	p-value	R-Squared	R-Squared	
Linear	< 0.0001	0.0017	0.8316	0.8009	
2FI	0.3799	0.0011	0.8327	0.8008	
<u>Quadratic</u>	<u>< 0.0001</u>	<u>0.4185</u>	<u>0.9272</u>	<u>0.8874</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	0.4185		0.9280	0.8550	Aliased

Slika 13: Analiza minimalnega odziva – povzetek

Napovedni faktor determiniranosti nam poda oceno, kako dobro bi se model odrezal pri napovedi novih eksperimentalnih vrednosti, ki se lahko pridobijo pri še neraziskanih kombinacijah parametrov. Tako prilagojen kot napovedni faktor determiniranosti naj bi imel vrednost čim bolj blizu 1 in razlika med obema naj bi znašala manj kot 0,2 enot (Stat-Ease, 2001).

Pri izbiri modela se uporabljata še dva dodatna kriterija: p -vrednost modela (vrednost testa hipotez, s katero ocenimo statistično signifikantnost modela) in p -vrednost prilagajanja modela na eksperimentalne vrednosti (ang. lack of fit p -value). Obe vrednosti temeljita na testu hipotez, kjer glavna hipoteza trdi, da model ni statistično signifikanten za raziskan odziv sistema, alternativna hipoteza pa trdi, da model je statistično signifikanten za raziskan odziv sistema. Kadar je p -vrednost večja od 0,1 obvelja glavna hipoteza, če pa je vrednost nižja ali enaka 0,1 pa obvelja alternativna hipoteza. To pomeni, da je model statistično značilen za raziskan odziv (Stat-Ease, 2001).

Poleg faktorja determiniranosti programska oprema še dodatno izračuna vrednost, ki ocenjuje prilagajanje modela na eksperimentalne vrednosti, to je p -vrednost prilagajanja (ang. lack of fit). Ta se izračuna preko centralnih točk eksperimentalnega načrta, katere so

pogosto 3 oz. čim več. Z vrednostjo prilagajanja se oceni ali srednja vrednost teh centralnih točk sovпада z modelom ali pa je večja oz. manjša od izračunane vrednosti iz modela. Če se vrednost ne sklada z modelom je možno, da je sistemski odziv bolj kompleksen in je potrebno uporabiti bolj napredne eksperimentalne načrte, kot so načrti odzivnih površin (ang. response surface designs) (Stat-Ease, 2001).

S slike 13 je razvidno, da je predlagani model za odziv 1 kvadratne oblike. Sam model je značilen in se zelo dobro prilagaja eksperimentalnim vrednostim.

Naslednja stopnja vzpostavitve modela je ocenjevanje ustreznosti modela in določitev enačbe, s pomočjo ANOVA testa. Gre za analizo variance, pri kateri primerjamo različne vrste varianc med sabo. Osnovna je primerjava med varianco vseh posameznih meritev (ang. pure error) in varianco napovedi modela (ang. lack of fit). Pri tem gre predvsem za vprašanje, ali imata obe skupini podatkov v statističnem smislu enaka standardna odmika ali ne. Pri analizi predstavljenega primera so se upoštevale samo spremenljivke, ki vplivajo na odziv, preostale so se odstranile. Programska oprema omogoča definiranje meje sprejemljivosti za spremenljivke ki se naj vključijo v model (v prikazanem primeru vse ki imajo p -vrednost manjšo ali enako 0,1). Pomembna nastavitev je tudi upoštevanje hierarhičnosti modela. To pomeni, da če imamo interakcijo $A \times B$, ki vpliva na odziv, sama spremenljivka A pa ne, vseeno obdržimo člen A v enačbi, da zagotovimo smiseln model (Stat-Ease, 2001).

Response 1 Minimalni odziv					
Backward Elimination Regression with Alpha to Exit = 0.100					
Forced Terms	Intercept				
	Coefficient	t for H ₀			
Removed	Estimate	Coeff=0	Prob > t	R-Squared	MSE
B-Koncentracija glukoze	0.99	0.57	0.5729	0.9464	56.37
AC	-1.84	-0.66	0.5129	0.9454	55.15
B ²	-2.01	-0.96	0.3467	0.9435	54.99
AB	-2.19	-1.18	0.2483	0.9406	55.76
Hierarchical Terms Added after Backward Elimination Regression					
B-Koncentracija glukoze					
ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]					
	Sum of		Mean	F	p-value
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F
Model	24727.76	6	4121.29	72.15	< 0.0001 significant
A-Koncentracija celic	20320.46	1	20320.46	355.74	< 0.0001
B-Koncentracija glukoze	18.93	1	18.93	0.33	0.5696
C-Razmerje prostornin	2309.30	1	2309.30	40.43	< 0.0001
BC	324.61	1	324.61	5.68	0.0244
A ²	861.51	1	861.51	15.08	0.0006
C ²	1281.20	1	1281.20	22.43	< 0.0001
Residual	1542.27	27	57.12		
Lack of Fit	452.77	8	56.60	0.99	0.4759 not significant
Pure Error	1089.50	19	57.34		
Cor Total	26270.03	33			

Slika 14: Ocenjevanje ustreznosti modela

S slike 14 je razvidno, da koncentracija glukoze v gojišču nima vpliva na višino absorbance ob času 0 h. Prav tako nimajo vpliva interakcije $A \times B$, $A \times C$ in člen B^2 . Člen B, ki ne vpliva na odziv se je obdržal zaradi hierarhičnosti statističnega modela, saj nastopa v interakciji $B \times C$ in kot člen B^2 .

Interpretacija vpliva posameznih členov enačbe izhaja iz F - in p - vrednosti. F -vrednost je rezultat F -testa, s katerim primerjamo varianco modela in varianco meritev. Za potrditev ustreznosti modela mora biti izračunana vrednost manjša od tabelarične vrednosti. Preko F -vrednosti je možno podati tudi p -vrednost, ki bi naj bila manjša ali enaka 0,1 za parametre, ki vplivajo na odziv (Stat-Ease, 2001). S slike 15 je razvidno, da je statistični model značilen in da obstaja samo 0,01 % verjetnost, da je ta vrednost posledica šuma.

Std. Dev.	7.56	R-Squared	0.9413
Mean	96.38	Adj R-Squared	0.9282
C.V. %	7.84	Pred R-Square	0.8985
PRESS	2665.27	Adeq Precisor	27.473

Slika 15: Vrednotenje kakovosti modela za minimalni odziv

V prikazanem primeru so členi A, B, C, $B \times C$, A^2 in C^2 vključeni v statističen model. Členi $A \times B$, $A \times C$ in B^2 pa niso del enačbe, ker nimajo vpliva na odziv. Omeniti velja, da p -vrednost manjša ali enaka 0,1 ne nakazuje kako močno vpliva posamezni parameter, temveč samo ali vpliva na odziv ali pa ne (Stat-Ease, 2001).

Vrednost prilagajanja prikazanega modela je 0,99, kar kaže, da varianca napovedi modela ni signifikantno drugačna od variance posameznih meritev. Verjetnost, da je vrednost prilagajanja posledica šuma je 47,59 %. Varianca napovedi modela mora biti čim nižja, da model lahko čim bolje opisuje eksperimentalne vrednosti (Stat-Ease, 2001).

Na sliki 15 je prikazan povzetek statističnega ovrednotenja modela. Prilagojen koeficient determiniranosti na osnovi eksperimentalnih podatkov ($\text{Adj } R^2$) je 0,9282, medtem ko je vrednost napovednega koeficienta determiniranosti ($\text{Pred } R^2$) 0,8985. Njuna razlika je manjša kot s strani programske opreme predlaganih 0,2 (Stat-Ease, 2001).

Statistični pojem Adeq Precision – "Primerna natančnost" meri razmerje med signalom in šumom. Zaželeno je razmerje višje od 4, vrednost predstavljenega modela pa je 27,473, kar kaže na majhen šum oz. majhno variabilnost v eksperimentalnih vrednostih (Stat-Ease, 2001).

Na osnovi povzetka je razvidno, da je statistični model veljaven za opis odvisnosti odziva 1 od treh navedenih parametrov. Prav tako se ga lahko uporabi za optimizacijo sistema.

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned} \text{Minimalni odziv} = & \\ & +93.46 \\ & +29.77 * A \\ & +0.99 * B \\ & +43.73 * C \\ & -6.64 * B * C \\ & +8.30 * A^2 \\ & -34.33 * C^2 \end{aligned}$$

Slika 16: Enačba modela za minimalni odziv.

je razvidno, da ima največji pozitivni vpliv na odziv 1 člen C, s koeficientom 43,73. Največji negativen vpliv na odziv 1 pa ima člen C^2 (Stat-Ease, 2001).

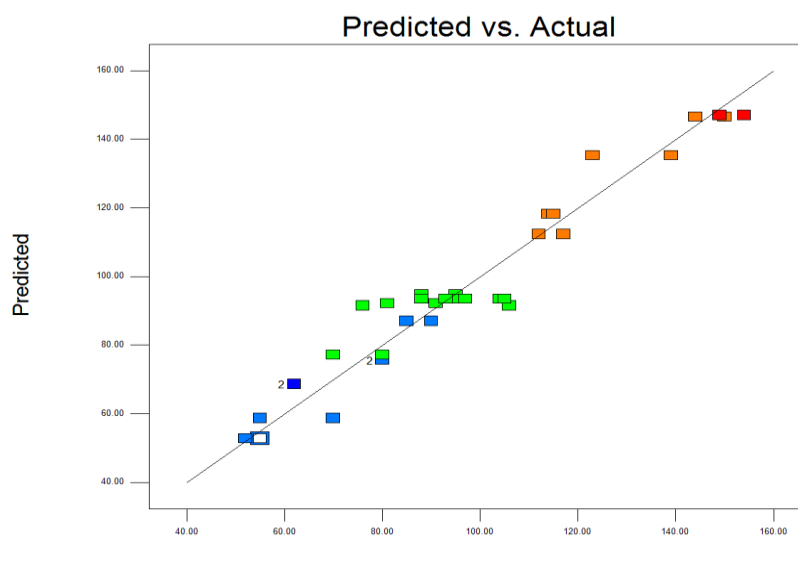
Naslednja stopnja v procesu vzpostavitve modela je grafična analiza razmerja med eksperimentalnimi in izračunanimi vrednostmi. Pogosto je kakšna meritev napačna in se občasno lahko definira kot ubežnik in se tudi potem odstrani iz izračunov za vzpostavitev modela (Stat-Ease, 2001).

Na sliki 17 je prikazana primerjava med točkami, ki jih je izračunal predlagani model (ang. predicted values) in eksperimentalnimi vrednostmi (ang. actual values). Če je eksperimentalna vrednost enaka izračunani vrednosti, bi točka prikazana na sliki 17, morala ležati na diagonali grafa. Odmiki od diagonale nakazujejo, da model podcenjuje ali pa precenjuje realne vrednosti systemskega odziva (Stat-Ease, 2001). V prikazanem primeru so vse točke dokaj blizu diagonale, kar pomeni, da model ustrezno izračuna vrednosti odziva in so te primerljive z eksperimentalno izmerjenimi vrednostmi.

Design-Expert® Software
Minimalni odziv

Color points by value of
Koncentracija celic:

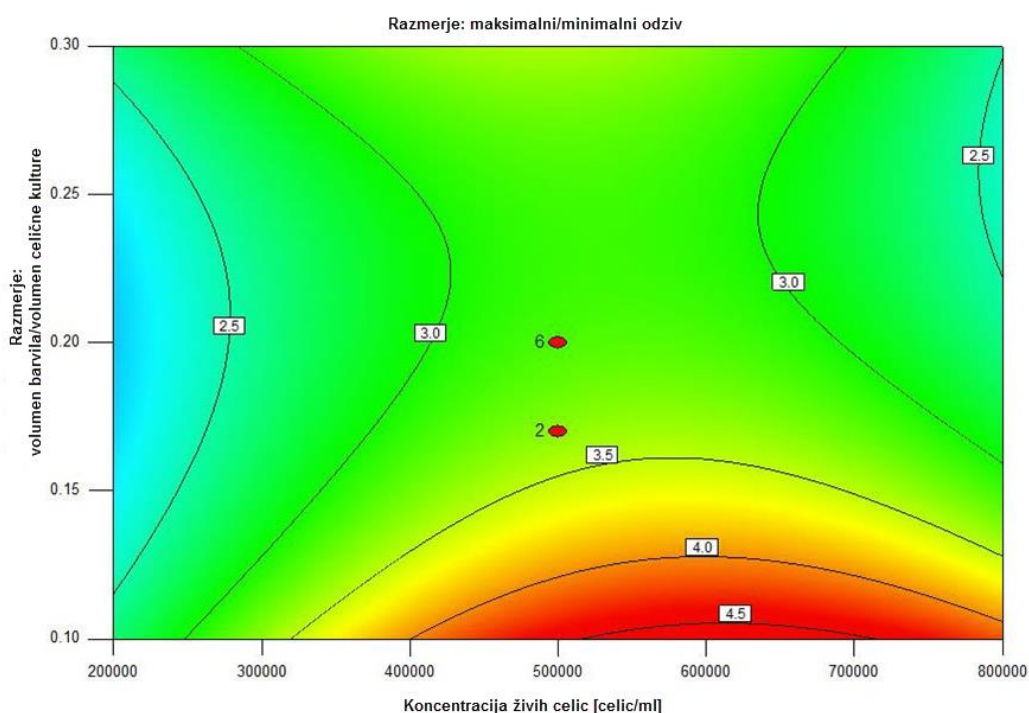
800000
200000



Slika 17: Odnos med eksperimentalnimi vrednostmi ("Actual") in izračunanimi s pomočjo modela ("Predicted")

Zadnja stopnja pri vzpostavitvi modela je interpretacija modela (Stat-Ease, 2001). S slike 18 je razvidna povezava med koncentracijo celic (A), razmerjem prostornine med celično kulturo ter barvilom (C) in doseženo vrednostjo absorbance ob času 0 h. Vrednost člena B je fiksirana na 1 g/l glukoze. Najnižja absorbanca ob času 0 h se pojavi ob nizki koncentraciji celic in nizkem razmerju prostornin. Barvna paleta na grafu predstavlja vrednosti odziva, kjer svetlejša barva prikazuje visoko vrednost odziva, temnejša barva pa nizko vrednost odziva. S povečevanjem obeh parametrov se absorbanca nelinearno povečuje. S slike lahko razberemo, da za čim višje razmerje med maksimalnim in minimalnim odzivom potrebujemo čim več celic in čim manj barvila.

Analiza rezultatov, vzpostavljanje modelov in njihovo vrednotenje, je za vse štiri odzive potekalo na enak način. Pri vseh odzivih je bil vzpostavljen kvadratni model.



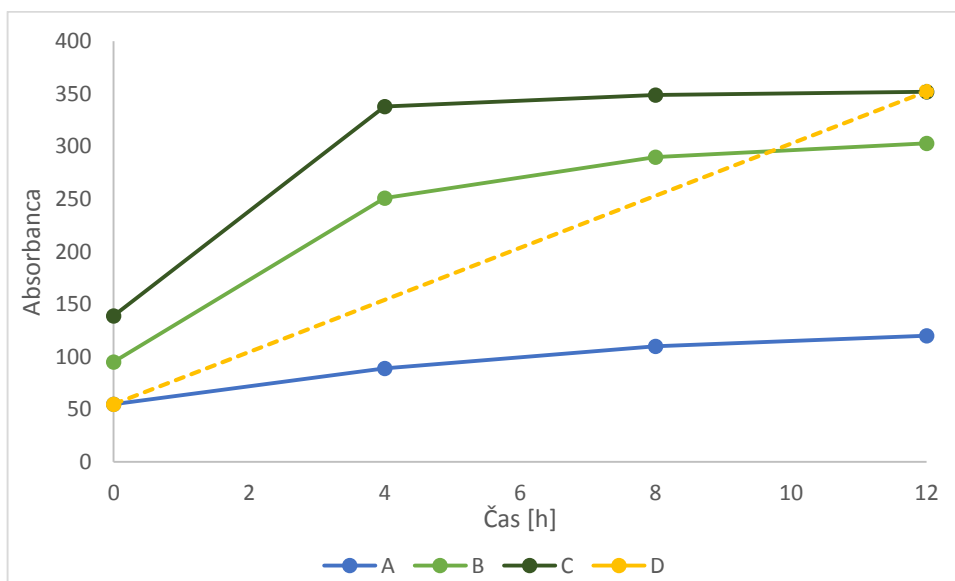
Slika 18: Povezava med koncentracijo celic, razmerjem volumnov celične kulture in barvila ter minimalnim odzivom ob času 0.

b) Optimizacija parametrov

Na podlagi rezultatov našega eksperimenta smo ugotovili, da je koncentracija celic pod 300,000 celic/ml neustrezna, saj je absorbanca prenizka in jo je težko ločiti od šuma barvila. Prav tako smo ugotovili, da se šum barvila povečuje, če le-to dodamo v višji koncentraciji. Pri določevanju sistemskega odziva smo tako določili, da želimo čim nižjo absorbanco ob začetku eksperimenta in čim višjo absorbanco po 12 urah inkubacije. Kot vmesni točki smo določili absorbanco po 4 urah in 8 urah, s katerima smo želeli čim bolj linealizirati krivuljo odziva. Zaželeno je, da je absorbanca čim dlje časa v linearnem območju krivulje, saj bi s tem lahko kvantitativno določali sposobnost porabe različnih substratov na fenotipskih

mikromrežah. Zaželjena krivulja je prikazana na sliki 19, krivulja D. Ker je povezava med koncentracijo tvorjenega NADH-ja in absorbanco linearna le do vrednosti 200, je takšno krivuljo težko doseči. Na sliki 19

so prikazane tudi krivulje (A, B, C), ki smo jih pridobili z našimi poskusi. Krivulja A predstavlja poskus 1, kjer smo na mikrotitrne ploščice nanесли kulturo z najnižjo koncentracijo celic in najnižjim razmerjem med volumenom kulture in dodanim barvilom. Kot je razvidno s slike, so odzivi pri teh nastavitvah prenizki. Krivulja C prikazuje rezultate poskusa 15, kjer smo uporabili kulturo z najvišjo koncentracijo in najvišjim razmerjem. S slike je razvidno, da je odziv prehitel, saj preseže območje linearnosti že v 1 uri. Krivulja B predstavlja rezultate poskusa 23, v katerem smo uporabili sredinske nastavitve parametrov.



Slika 19: Krivulje sistemskih odzivov (A,B,C) in zaželena krivulja (D)

Programska oprema nam omogoča, da določimo mejne vrednosti naših parametrov in vrednosti, ki jih želimo doseči pri sistemskem odzivu. Na sliki 20 so tako prikazane vrednosti, ki smo si jih za tarčni odziv izbrali mi. Kot tarčni odziv smo izbrali razmerje med maksimalnim in minimalnim odzivom, za katerega želimo, da je čim višje. Zaželen sistemski odziv prikazuje krivulja D na sliki 19.

Zahteve					
Parameter	Cilj	Spodnja meja	Zgornja meja		
A:VCD	is in range	200000	800000		
B:Glc	is in range	0.3	1.7		
C:dye/culture r	is in range	0.1	0.3		
Ratio max/min	maximize	1.56452	4.37662		
Rezultati					
Številka	VCD	Koncentracija glukoze [g/l]	Volumen barvila / celične kulture	Maksimalen / minimalen odziv	Zaželjenost
1	648070	0.42	0.11	4.4	1.000
2	648070	1.58	0.11	4.4	1.000
3	616280	1.41	0.10	4.6	1.000
4	663228	0.65	0.10	4.6	1.000
5	663228	1.35	0.10	4.6	1.000

Selected

Slika 20: Predlagane rešitve za doseg sistemskega odziva

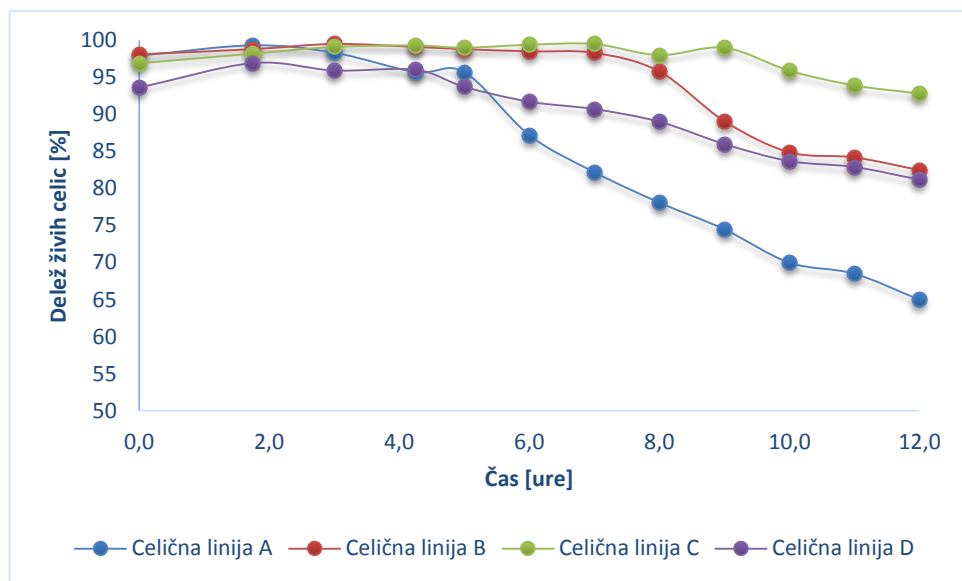
S pomočjo vzpostavljenih modelov je programska oprema preračunala katere so tiste vrednosti parametrov A, B in C, ki nam omogočajo doseg želenega sistemskega odziva. Kot je razvidno s slike 20, nam program ponudi več rešitev.

Za naš sistem smo izbrali delni rezultat prve rešitve, saj zaradi tehničnih omejitev ne moremo doseči razmerja med barvilom in celično kulturo.

Optimalni inkubacijski pogoji v OmniLog® sistemu so tako:

- $6,5 \cdot 10^5$ živih celic/ml
- koncentracija glukoze 0,42 g/l
- razmerje med volumnom celične kulture in barvila MB pa 0,17, kar v praksi pomeni mešanico 60 µl celične kulture/luknjico in 10 µl barvila MB/luknjico

4.2 ČAS PREŽIVETJA CELIČNIH LINIJ V GOJIŠČU OS



Slika 21: Preživetje različnih celičnih linij v gojišču Os

Bistvo spiranja celic z osiromašenim gojiščem, je odstranitev virov energije iz ravnega gojišča. Odzivi na fenotipskih mikromrežah se tako pojavijo le pri tistih substratih, ki jih celice lahko izrabljajo. Če ravnega gojišča ne bi odstranili, bi zaradi prisotnosti glukoze dobili močne odzive na vseh substratih. Prav tako bi dobili odzive tudi, če bi dodali barvilo takoj po nacepiti, saj imajo celice še vedno notranje rezerve energije.

Ker to gojišče nima virov ogljika in energije nas je zanimalo, koliko časa so sposobne različne celične linije preživeti v takšnem gojišču. Podatek je pomemben predvsem pri času pred inkubacije – to je času od nanosa celične kulture na fenotipske mikromreže, do dodatka barvila MB in odčitavanja absorbance. S poskusom smo tako želeli določiti kakšen je časovni okvir pred inkubacije, v katerem bodo celice porabile notranjo energijo, vendar bo delež živih celic še vedno visok. Rezultati so prikazani na sliki 21. Opazimo lahko, da so se med celičnimi linijami začele pojavljati razlike že po štirih urah inkubacije. Najhitreje se je zmanjševal delež živih celic pri celični liniji A, medtem ko je bila celična linija C precej bolj vzdržljiva.

Na podlagi rezultatov na sliki 21, smo določili čas pred inkubacije v Os, ki je pri vseh celičnih linijah 4 ure.

Uspelo nam je razviti splošen protokol (priloga A), ki omogoča analizo lastnosti različnih celičnih linij CHO s tehnologijo fenotipskih mikromrež. Protokol vključuje:

- odmrzovanje celičnih linij z direktno metodo (poglavje 3.3.1)
- namnoževanje celic (poglavje 3.3.1)
- priprava celic za fenotipsko analizo (poglavje 3.3.2)

Z razvojem splošnega protokola smo potrdili prvo hipotezo.

4.3 FENOTIPSKA ANALIZA CELIČNE LINIJE A

S pomočjo splošnega protokola smo izvedli analizo fenotipskih lastnosti. Poglavja 4.3 do 4.7 se nanašajo na preverjanje druge in tretje hipoteze.

Preglednica 8: Rezultati fenotipske analize celične linije A

Dan	Analiza koncentracije celic				Analiza substratov				
	TCD [$\times 10^6$ celic/ml]	VCD [$\times 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Podvojitveni čas [h]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	NH ₄ ⁺ [%]
0	0,22	0,22	99,0	/	100,0	0,0	100,0	0,0	9,3
1	0,46	0,46	99,7	22,6	76,0	3,7	96,5	0,0	16,7
2	1,12	1,12	99,6	18,7	66,1	6,2	90,9	8,8	28,5
3	2,89	2,88	99,4	17,6	47,6	22,5	85,3	11,3	39,8
4	6,39	6,37	99,7	21,0	39,9	18,6	79,1	13,6	50,6
5	12,05	12,01	99,6	26,2	25,6	26,0	71,2	19,2	63,3
6	14,64	14,56	99,4	86,4	15,6	21,1	60,4	19,5	64,2
7	15,07	14,4	95,6	*	0,0	26,5	38,2	17,0	41,7
8	12,1	8,86	73,2	*	5,8	27,7	24,2	10,9	19,3
9	9,22	4,91	53,2	*	11,1	35,0	14,8	6,9	19,5

*podvojevalnega časa ni bilo mogoče izračunati, saj celična kultura preide v fazo odmiranja

Ker je sestava rastnih gojišč last farmacevtske družbe Lek d.d. in je zato zaupne narave, v magistrskem delu nisem navedla koncentracij glavnih virov ogljika in dušika, temveč le relativne deleže, preračunane glede na maksimalno koncentracijo substratov v gojišču. Koncentracija glutamina, glutamata in NH₄⁺ je bila merjena v mmol/l, zato so vse koncentracije preračunane relativno na maksimalno koncentracijo glutamina, ki je predstavljala 100 %. Glukoza in laktat sta bila merjena v g/l, zato so koncentracije preračunane relativno na maksimalno koncentracijo glukoze, ki je predstavljala 100 %. Enot nismo poenotili zaradi nepreglednosti grafikonov, saj bi maksimalna koncentracija glutamina predstavljala 11 % koncentracije glukoze.

Proizvajalec naprave Vi-Cell navaja napako meritve 10 %. Ker je bila biološka variabilnost med tremi paralelkami 2 %, smo za standardni odklon uporabili vrednost, ki jo navaja proizvajalec (Beckmann Coulter Inc., 2011).

Proizvajalec naprave Bioprofile 400 navaja napako meritve 7 %. Ker je bila biološka variabilnost med tremi paralelkami okoli 2 %, smo za standardni odklon v magistrskem delu uporabili vrednost, ki jo navaja proizvajalec (Nova Biomedical, 2014)

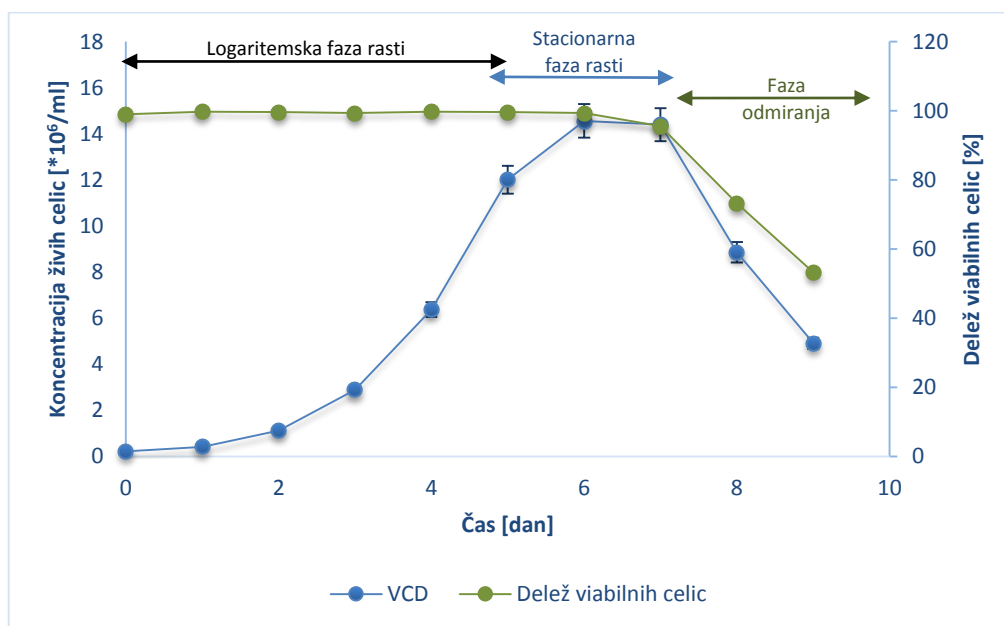
Podvojitvene čase smo izračunali po enačbi 2.

$$t_{gen} = (t_2 - t_1) \times \frac{\log 2}{\log \frac{c_2}{c_1}} \quad \dots (2)$$

Spremenljivka	Enota
t_{gen}	Podvojitveni čas [h]
t_1	Čas meritve koncentracije živih celic v točki 1 [h]
t_2	Čas meritve koncentracije živih celic v točki 1 [h]
c_1	Koncentracija živih celic ob času t_1 [živih celic/ml]
c_2	Koncentracija živih celic ob času t_2 [živih celic/ml]

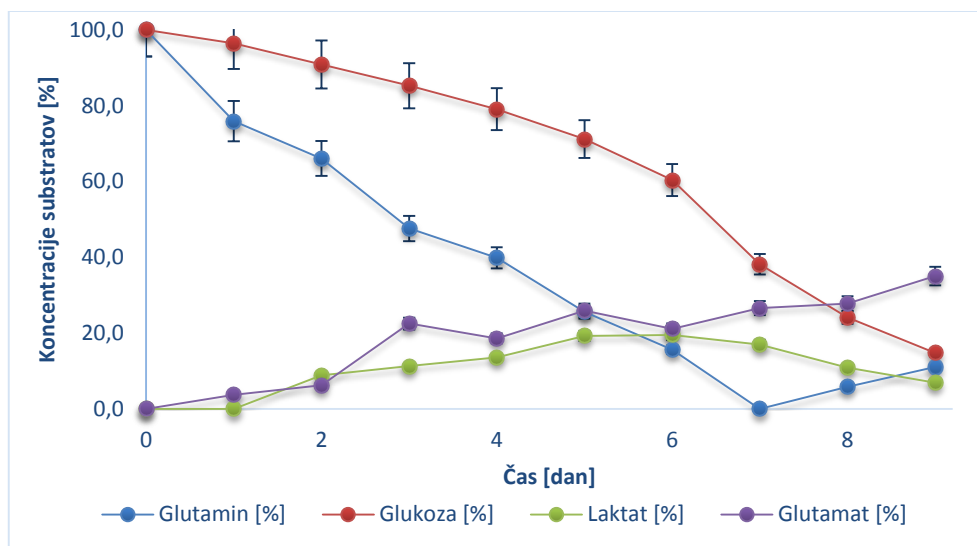
Na sliki 22 je predstavljena rastna krivulja celične linije A. Oblika krivulje je sovpadala s tremi fazami rasti. Od dneva 0 do dneva 5 so bile celice v logaritemski fazi rasti. Njihov podvojitveni čas smo izračunali po enačbi 2.

V logaritemski fazi so celice rastle eksponentno in so sledile kinetiki 1. reda – koncentracija celic se je povečevala s faktorjem 2^n . Prvih pet dni je ta perioda znašala okoli 20 ur. Logaritemska faza rasti je trajala do dneva 5, nato je začelo primanjkovati glutamina, prepolovila pa se je tudi koncentracija glukoze (Slika 23). Celice so na dan 6 tako prešle v stacionarno fazo rasti, v kateri so upočasnile metabolizem. Ta faza je trajala do dneva 7. Na dan 8 so bile celice že v fazi odmiranja, ki je bila posledica dokončnega pomanjkanja glukoze. Celice so bile izstradane, njihovo število pa se je eksponentno zmanjševalo. Na sliki 22 ni moč zaslediti faze prilagajanja, saj smo celice v logaritemski fazi rasti le prenesli v sveže gojišče enake sestave.



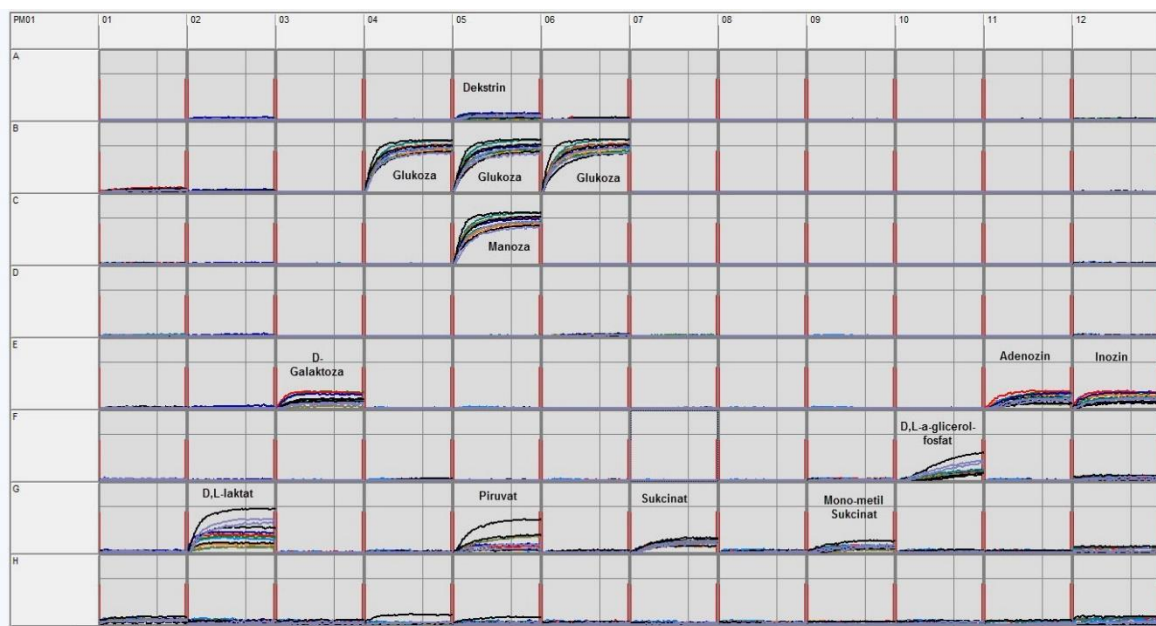
Slika 22: Rastna krivulja in delež živih celic celične linije A

S slike 23 lahko prav tako razberemo, da se je koncentracija laktata med logaritemsko fazo rasti povečevala, ko so celice vstopile v stacionarno fazo pa se je le-ta začel porabljati. Koncentracija glutamata se je povečevala vse do konca bioprocesa. Ko so celice prešle v fazo odmiranja, se je prav tako začela povečevati koncentracija glutamina v gojišču. Iz rezultatov smo sklepali, da bi pojav lahko bil posledica razpadanja odmrlih celic.



Slika 23: Poraba substratov celične linije A

Fenotip celične linije A smo prav tako določali s pomočjo tehnologije fenotipskih mikromrež in naprave OmniLog. Naprava je merila absorbanco vzorcev pri 590 nm, v časovnem intervalu 15 min. Rezultati so bili podani v razponu od 0 - 400 absorbančnih enot. Pridobljene podatke smo nato obdelali s programom PMM Kinetic, ki nam omogoča skupinski ali posamični izbor rezultatov, prikazanih na grafikonu. Za prikaz rezultatov fenotipa celične linije A, smo tako uporabili rezultate vseh mikromrež PM-M1, pridobljenih od dneva 4 do dneva 9. Vse rezultate smo združili v eno mikromrežo, prikazano na sliki 24. Za lažji pregled smo odstranili šum, ki ga je predstavljala povprečna absorbanca treh negativnih kontrol (mesta A1, A2 in A3). Kot pozitivna kontrola so bile upoštevane luknjice na mikromreži, kjer je bila dodana glukoza (mesta B4, B5 in B6). Slednja predstavlja za celice običajen vir energije, zato je bila rast tukaj najboljša. Odsotnost rasti ali slaba rast na pozitivni kontroli bi pomenila neustrezen vzorec in bi zahtevala ponovitev poskusa.



Slika 24: Fenotip celične linije A na mikromreži PM-M1. Vsaka izmed krivulji v posamezni luknjici predstavlja odziv celične linije A na specifičen substrat v posameznem dnevu bioprocesa.

Da bi dobili boljši pregled, smo rezultate izvozili v Excelovo datoteko. Ker celična linija preferenčno koristi glukozo (mesta B4, B5 in B6) in ker je bil odziv na tem substratu najvišji, smo končno vrednost absorbance po 24 urni inkubaciji, določili kot maksimalen odziv v določenem dnevu. Relativno na glukozo, smo preračunali odzive na preostalih substratih v posameznih dnevih. Končni rezultati so zbrani v preglednici 9, v kateri so prikazani odzivi na posameznih substratih, relativno na glukozo. Za boljšo vizualno predstavbo, smo uporabili Excelovo funkcijo pogojnega oblikovanja, v kateri smo izbrali dvobarvno lestvico, kjer minimum odziva (0 %) predstavlja bela barva, maksimum odziva (100 %) pa oranžna barva. Kot kriterij za ocenitev ali je odziv na določenem substratu pomemben ali ne, smo določili 10 % odziva glukoze. Na enak način smo obdelali tudi podatke za preostale celične linije. Ker smo fenotip proučevali 6 zaporednih dni, smo lahko rezultate povezali s koncentracijami substratov v gojišču. Celična linija A je izkoristila 12 različnih virov ogljika, med katerimi je prednostno uporabila glukozo in manozo; odziv je bil tukaj najvišji.

Ne glede na koncentracijo substratov v gojišču, so celice koristile dekstrin, suksinamidno kislino, mono - metil suksinat, in acetoacetat, vendar je bilo njihovo izkoriščanje precej šibko, kar lahko razberemo iz preglednice 9.

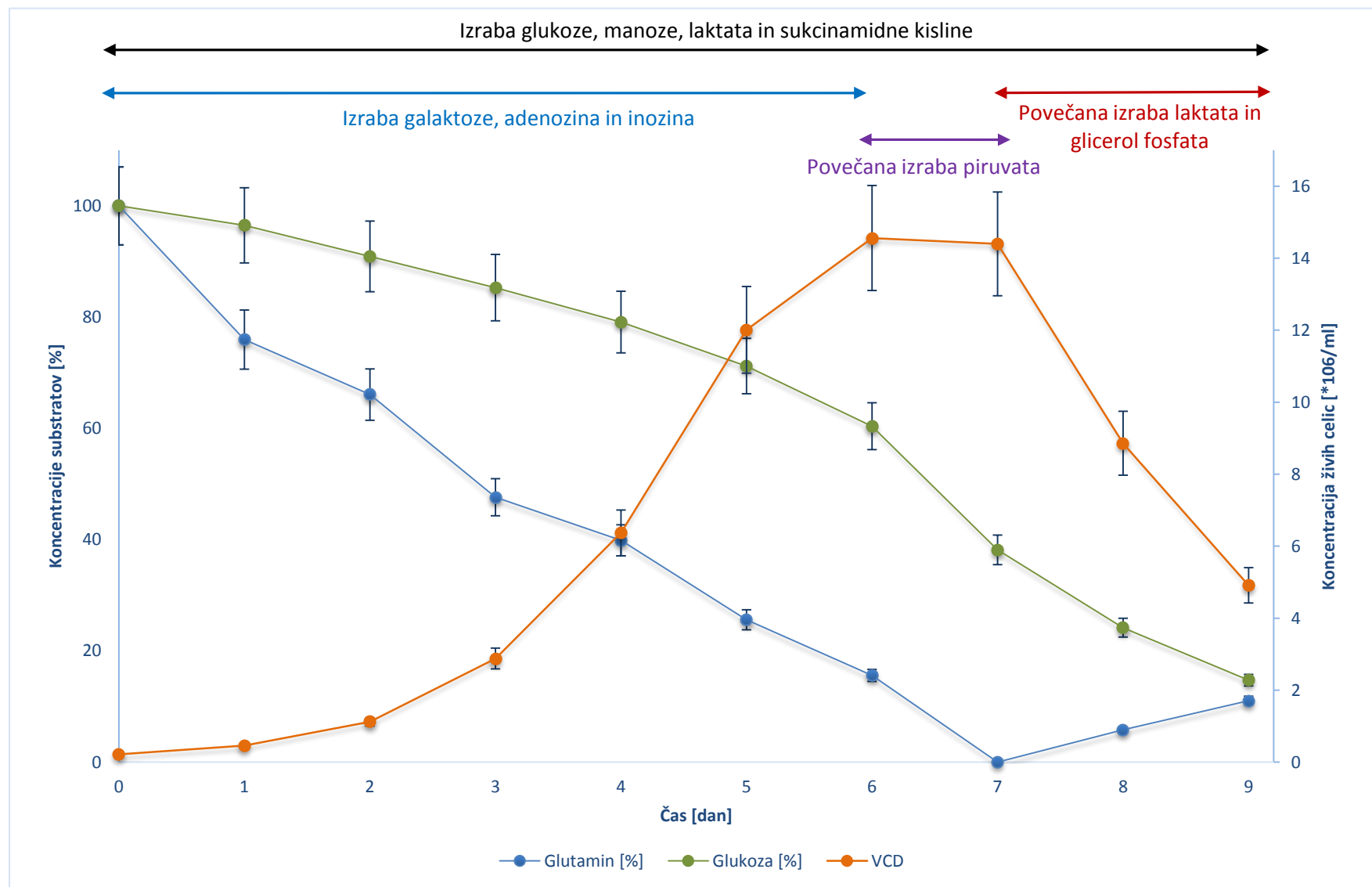
Preglednica 9: Izkoriščanje alternativnih substratov celične linije A tekom bioprocesa, od dneva 3 - 8.
Rezultati so prikazani kot relativne vrednosti glede na glukozo (%)

Analiza fenotipa celične linije A na mikromreži PM-M1						
SUBSTRAT	*D3	D4	D5	D6	D7	D8
Dekstrin	9	1	8	1	10	11
α -D-glukoza	100	100	100	100	100	100
D-manoza	99	97	99	99	99	96
D-galaktoza	36	18	31	8	13	12
Adenozin	34	27	34	14	10	21
Inozin	35	28	35	18	12	23
D,L- α -glicerol fosfat	21	1	21	18	53	45
D,L-laktat	33	20	40	9	84	75
Piruvat	6	6	15	32	63	14
Sukcinat	24	15	22	22	2	25
Mono-metil sukcinat	13	9	13	9	23	16
Acetoacetat	8	11	11	9	16	10

*oznaka za dan

Dokler so imele celice na voljo vsa hranila, so lahko uporabljale tudi galaktozo, adenozin in inozin. Na dan 7, ko jim je zmanjkalo glutamina, pa je začel odziv na teh substratih upadati. S pomanjkanjem glutamina je bilo povezano tudi izkoriščanje piruvata, katero se je povečalo. Zanimivi pa so bili odzivi uporabe laktata. Na dan 6, ko je bila koncentracija glutamina že zelo nizka, se je povečala sposobnost uporabe laktata, nato je na dan 7 upadla, na dan 8 pa je odziv na laktatu dosegel kar 84 % odziva na glukozo. Glede na to, da se je do dneva 6 koncentracija laktata v gojišču povečevala, nato pa se je začel laktat porabljati, smo pričakovali enakomerni odziv od dneva 6 naprej. Na dan 8 se je močno povečala tudi sposobnost izrabe D, L- α -glicerol fosfata.

Če povežemo rezultate rastne krivulje, porabe substratov in sposobnost izrabe drugih virov energije in ogljika opazimo, da se na prehodu iz logaritemske v stacionarno fazo rasti spremeni metabolizem celične linije A. Do spremembe prav tako pride ob prehodu v fazo odmiranja, saj se poveča sposobnost izkoriščanja laktata, piruvata in glicerol fosfata. Ključne substrate, ki določajo metabolno stanje celice, koncentracijo celic in sposobnost izkoriščanja alternativnih substratov, smo povzeli na sliki 25.



Slika 25: Rastna krivulja in izraba substratov celične linije A

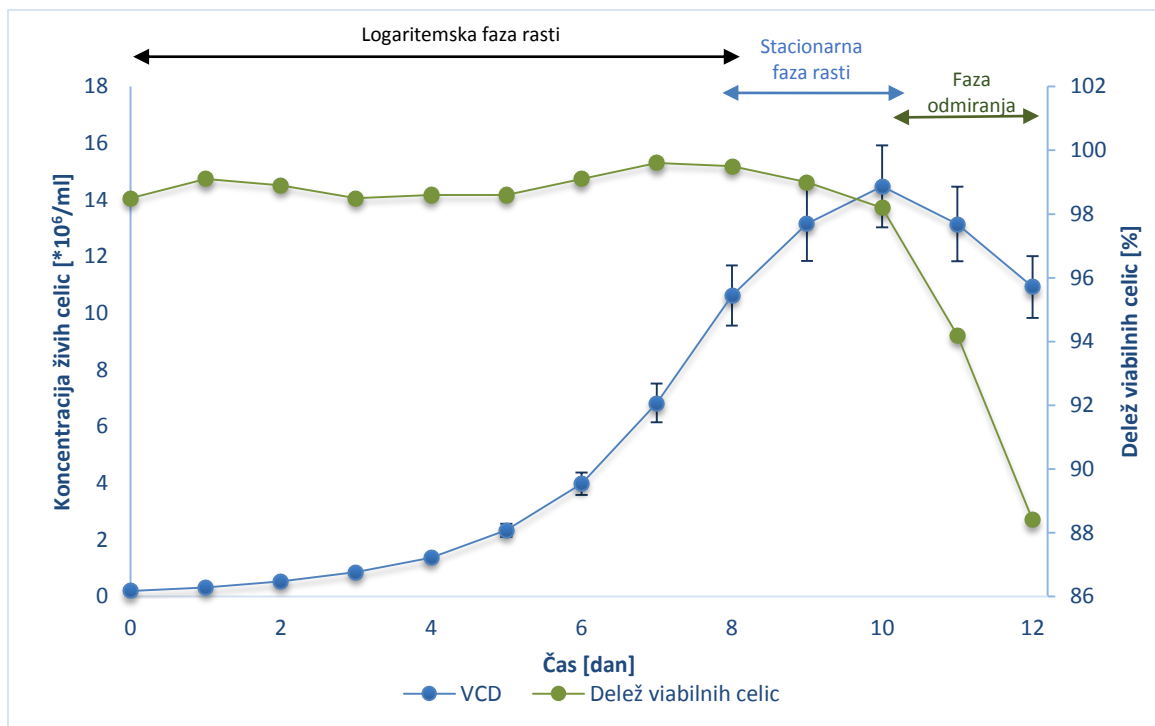
4.4 FENOTIPSKA ANALIZA CELIČNE LINIJE B

Preglednica 10: Rezultati fenotipske analize celične linije B

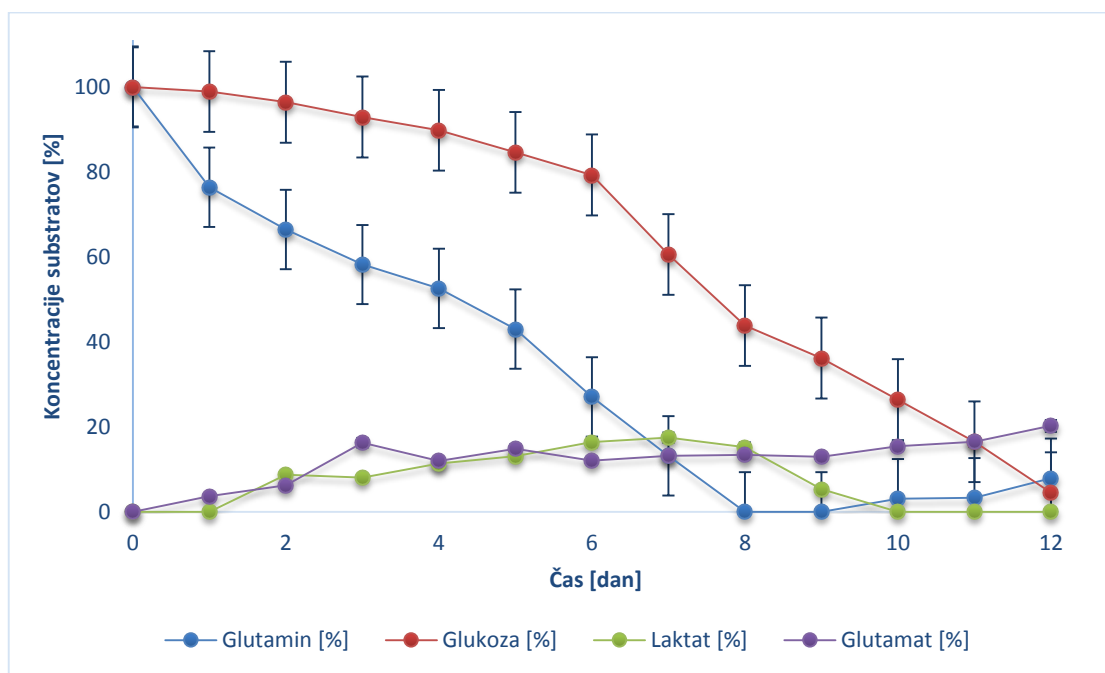
Dan	Analiza koncentracije celic				Analiza substratov				
	TCD [$\times 10^6$ celic/ml]	VCD [$\times 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Podvojitveni čas [h]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	NH ₄ ⁺ [%]
0	0,2	0,2	98,5	/	100,0	0,0	100,0	0,0	9,3
1	0,35	0,32	99,1	35,4	76,4	3,7	98,9	0,0	16,8
2	0,67	0,54	98,9	31,8	66,5	6,2	96,4	8,7	28,6
3	0,85	0,86	98,5	35,7	58,2	16,3	92,9	8,1	32,0
4	1,39	1,37	98,6	35,7	52,6	12,0	89,8	11,4	40,1
5	2,38	2,34	98,6	31,1	43,0	14,9	84,6	13,1	50,1
6	4,02	3,98	99,1	31,3	27,1	12,1	79,3	16,4	54,0
7	6,86	6,83	99,6	31,1	13,2	13,2	60,6	17,5	49,9
8	10,68	10,62	99,5	37,6	0,0	13,4	43,9	15,3	34,5
9	13,3	13,16	99	75,8	0,0	12,9	36,2	5,4	24,7
10	14,74	14,48	98,2	161,8	3,1	15,4	26,4	0,0	33,4
11	13,86	13,15	94,2	*	3,4	16,5	16,5	0,0	47,4
12	14,72	10,93	88,4	*	7,9	20,2	4,5	0,0	49,9

*podvojevalnega časa ni bilo mogoče izračunati, saj celična kultura preide v fazo odmiranja

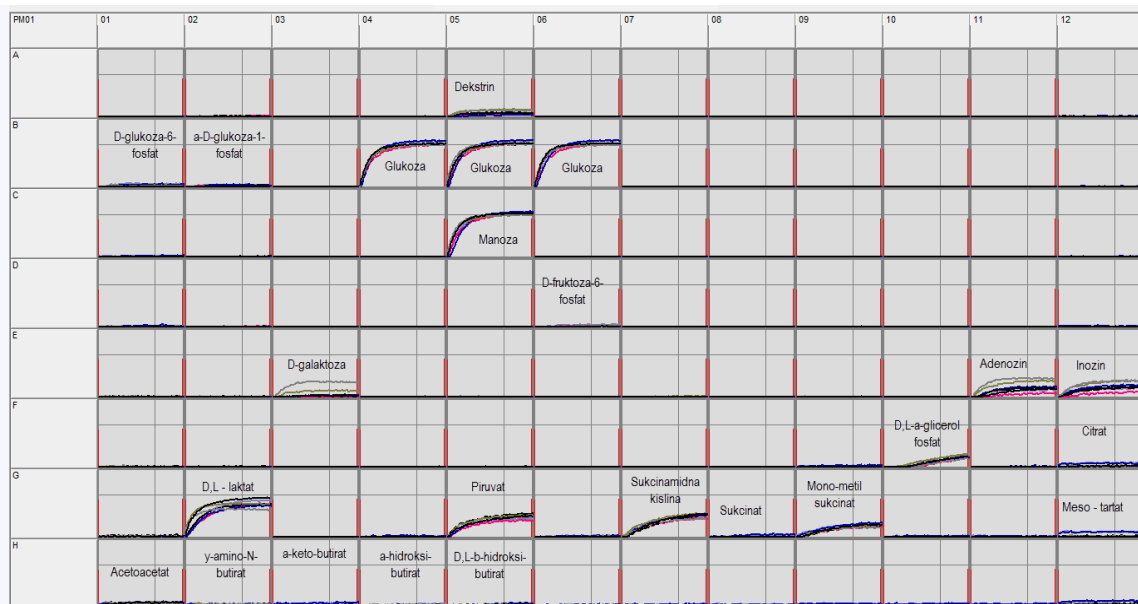
Tudi rastno krivuljo celične linije B smo razdelili na 3 faze, prikazane na sliki 26. Logaritemska faza rasti je trajala 8 dni, povprečni podvojitveni čas je bil okoli 31 ur. Celice so se podvojevale počasi, prav tako je bila počasna poraba metabolitov, razvidna s slike 27. Ko je celicam na dan 8 zmanjkalo glutamina, se je rast začela ustavljati, nastopila je stacionarna faza rasti. V tej fazi so celice začele porabljati tudi nakopičen laktat. Kljub temu, da so celice imele na dan 10 še 25 % glukoze v gojišču, so prešle v fazo odmiranja. Koncentracija glutamata v gojišču je bila bolj ali manj konstantna, povečevati se je začela šele okoli dneva 10, vzporedno s povečevanjem koncentracije glutamina. Tudi pri celični liniji B lahko potrdimo povezavo med povečevanjem koncentracije glutamina in odmiranjem celic.



Slika 26: Rastna krivulja in delež živih celic celične linije B



Slika 27: Poraba substratov celične linije B



Slika 28: Fenotip celične linije B na mikromreži PM-M1. Vsaka izmed krivulj v posamezni luknjici predstavlja odziv celične linije B na specifičen substrat v posameznem dnevu bioprocesa.

Na sliki 28 je predstavljen fenotip celične linije B, ki je nastal z združenjem 8 mikromrež, nacepljenih na zaporedne dneve. Vsaka krivulja predstavlja meritev ob določenem dnevu. Ker so tovrstni rezultati neprimerni za kvantifikacijo odzivov, smo izdelali preglednico 11. Rezultate lahko povežemo s koncentracijo metabolitov v gojišču. Celična linija B je bila sposobna izrabljati 12 različnih virov ogljika na fenotipski mikromreži PM-M1.

Preglednica 11: Izkoriščanje alternativnih substratov celične linije B tekom bioprocesa, od dneva 4 - 11. Rezultati so prikazani kot relativne vrednosti glede na glukozo (%)

Analiza fenotipa celične linije B na mikromreži PM-M1								
SUBSTRAT	*D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11
Dekstrin	11	8	9	6	5	7	6	4
α-D-glukoza	100	100	100	100	100	100	100	100
D-manoza	100	98	99	99	99	97	99	99
D-galaktoza	31	7	33	5	1	4	1	0
Adenozin	37	35	40	24	23	19	13	7
Inozin	41	36	39	23	19	13	7	6
D,L-α-glicerol fosfat	25	27	20	25	22	21	25	42
D,L-laktat	60	68	60	84	68	67	78	82
Piruvat	29	43	41	45	50	42	39	31
Sukcinamidna kislina	51	50	42	52	47	50	45	44
Mono-metil sukcinat	25	23	21	28	26	29	26	24
Acetoacetat	12	9	6	11	8	9	8	11

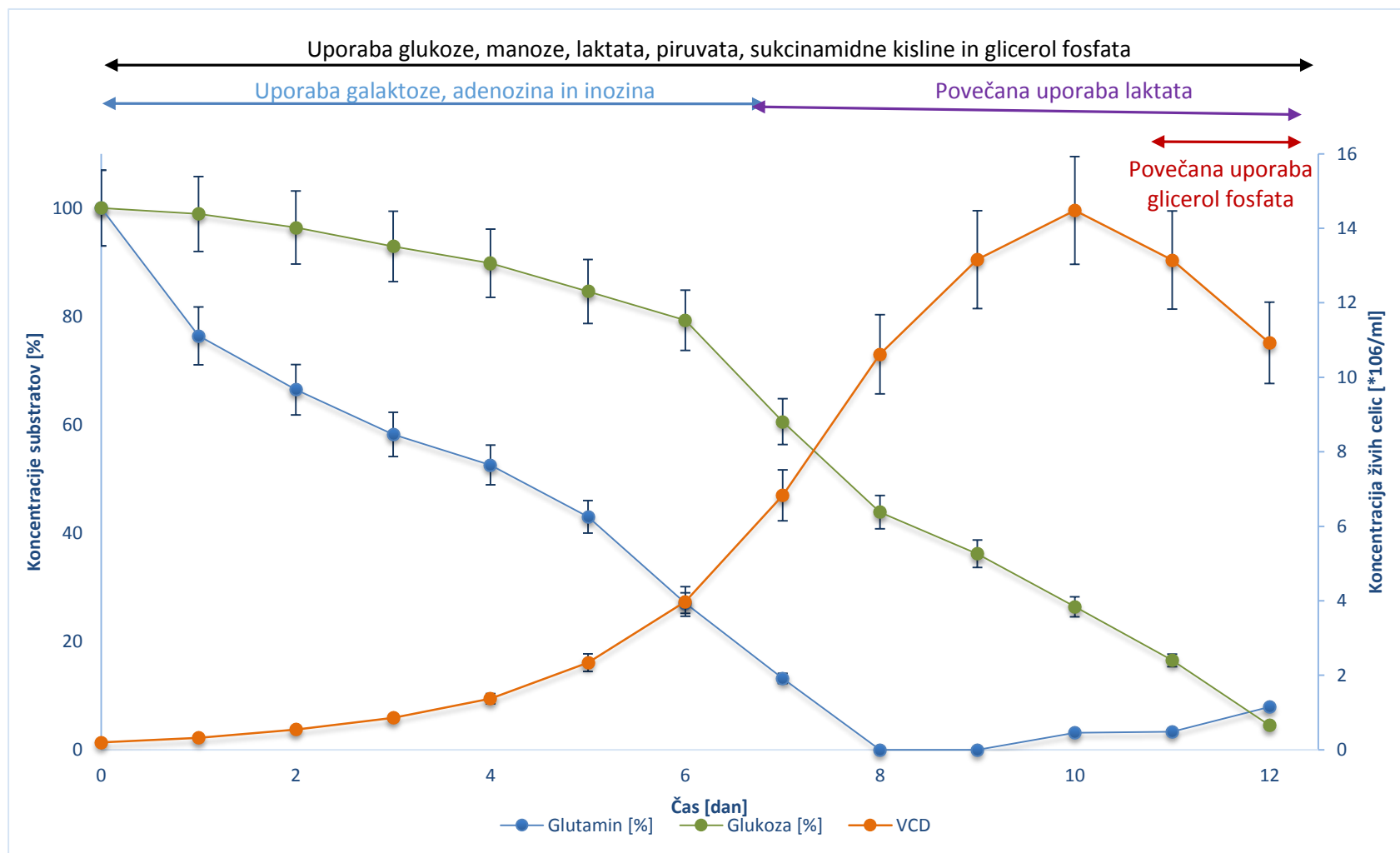
*oznaka za dan

Enakomerne, nizke odzive med dnevi 4 in 11 smo dobili za dekstrin in acetoacetat. Ti odzivi so bili precej nizki in so nakazovali, da jih celica očitno lahko izkoristi, vendar bi verjetno potrebovala še kakšen dodaten substrat.

Ta celična linija je prednostno koristila glukozo in manozo, kjer je bil odziv najvišji, visok odziv pa smo dobili tudi ob dodatku laktata. Sposobnost izkoriščanja slednjega se je povečala za 24 % iz dneva 6 na dan 7, kar lahko povežemo s pomanjkanjem glutamina v gojišču. Na koncentracijo glutamina je bila vezana tudi sposobnost izrabe galaktoze, adenzina in inozina. Galaktozo so lahko celice izrabljale do dneva 6, nato je odziv drastično upadel, medtem ko so se odzivi na adenozinu in inozinu postopno zmanjševali od dneva 7 naprej.

Izkoriščanje piruvata in sukcinamidne kisline je bilo konstantno in je znašalo okoli 50 % odziva na glukozo. Prav tako je bila konstantna uporaba mono-metil sukcinata in D,L- α -glicerol fosfata, ki pa je bila nekoliko nižja – okoli 25 % odziva na glukozo. Pri D,L - α -glicerol fosfatu se je sposobnost izrabe povečala na dan 11, ko je začel delež živih celic upadati.

Tudi za celično linijo B lahko zaključimo, da je sposobnost izrabe metabolitov povezana z fazo rasti celic. Ko začne zmanjkovati glavnega vira ogljika in dušika, se izklopijo/vklopijo nekatere metabolne poti. Ko celice vstopijo v fazo odmiranja, se močno poveča izraba glicerol fosfata. Povezava rastne krivulje, porabe substratov in izkoriščanje alternativnih virov energije je prikazana na sliki 29.



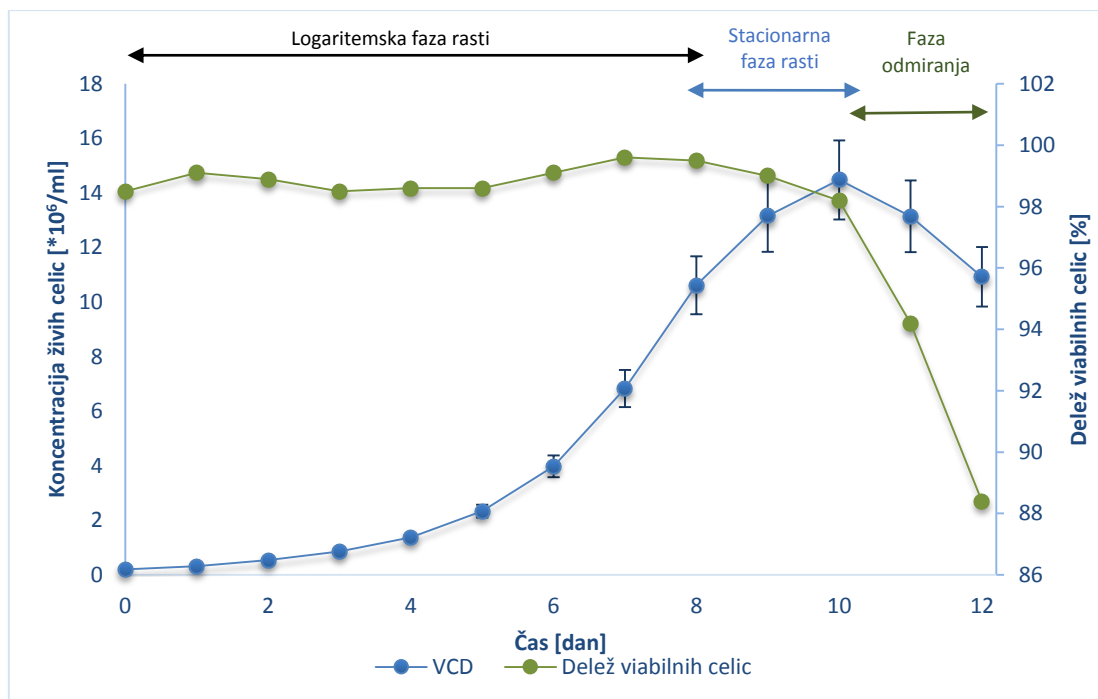
Slika 29: Rastna krivulja in izraba substratov celične linije B

4.5 FENOTIPSKA ANALIZA CELIČNE LINIJE C

Preglednica 12: Rezultati fenotipske analize celične linije C

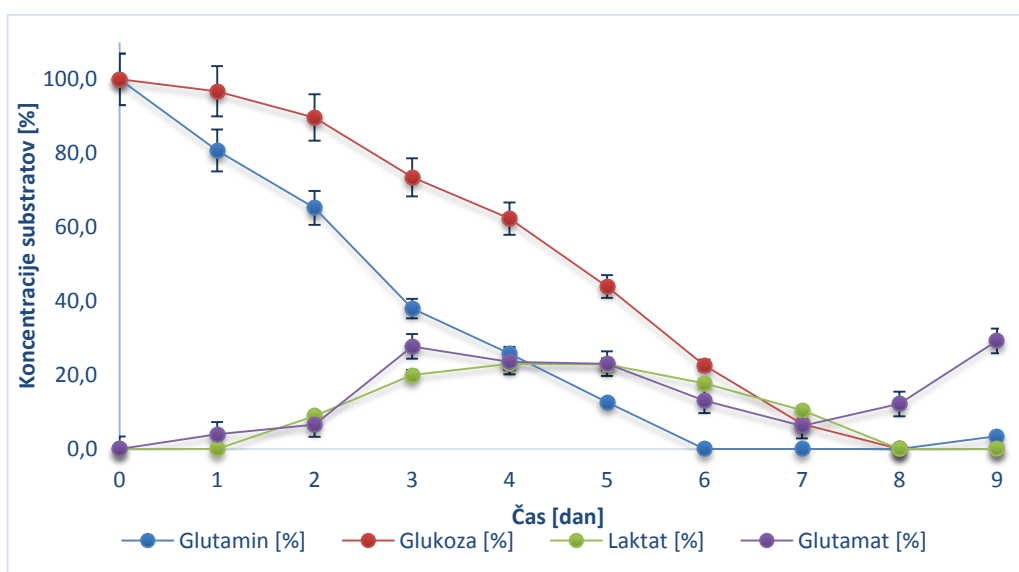
Dan	Analiza koncentracije celic				Analiza substratov				
	TCD [$\times 10^6$ celic/ml]	VCD [$\times 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Podvojitveni čas [h]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	NH ₄ ⁺ [%]
0	0,26	0,25	99,1	/	100,0	0,0	100,0	0,0	9,9
1	0,53	0,53	99,5	22,1	80,8	3,9	96,8	0,0	17,7
2	1,16	1,15	99,2	21,5	65,2	6,6	89,7	8,9	30,3
3	2,12	2,12	98,9	27,2	38,0	27,7	73,5	20,0	52,8
4	4,83	4,83	99,4	20,4	25,8	23,5	62,3	23,0	62,3
5	8,80	8,75	99,5	27,7	12,7	23,0	43,9	22,9	62,4
6	12,97	12,85	99,0	43,3	0,0	13,0	22,6	17,7	27,7
7	13,88	13,62	98,1	*	0,0	6,2	6,7	10,4	17,2
8	10,83	8,86	81,8	*	0,0	12,2	0,0	0,0	33,7
9	5,89	0,60	10,2	*	3,4	29,2	0,0	0,0	38,1

*podvojevalnega časa ni bilo mogoče izračunati, saj celična kultura preide v fazo odmiranja

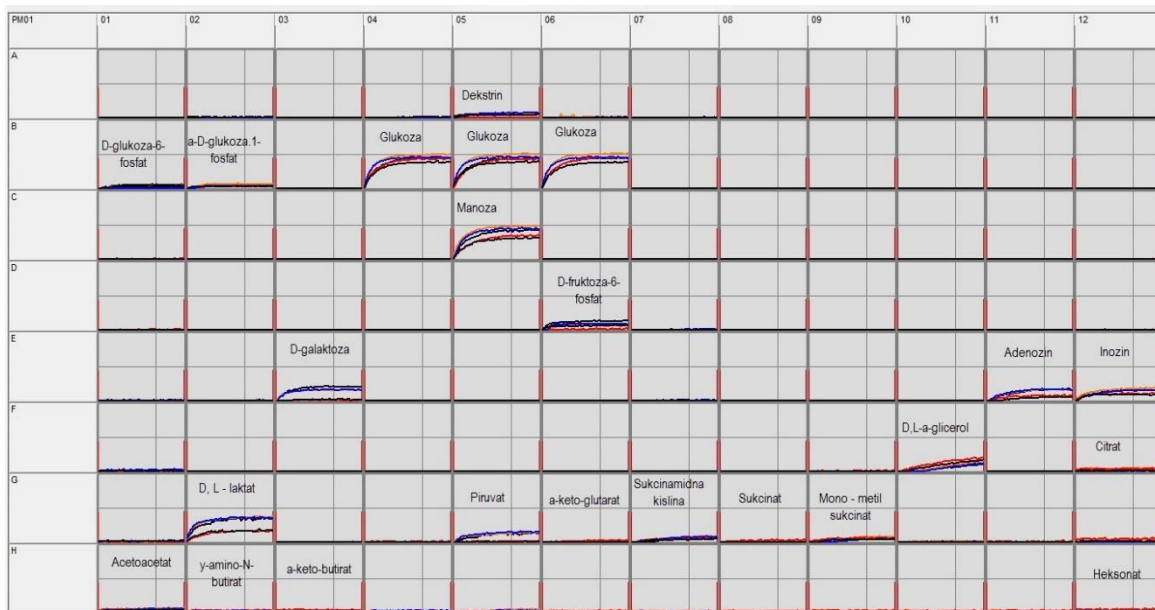


Slika 30: Rastna krivulja in delež živih celic celične linije C

Tudi rastna krivulja celične linije C je imela značilno obliko. Sestavljena je bila iz petdnevne logaritemske faze rasti, v kateri je bil podvojevalni čas okoli 22 ur. Nato je rast celic prešla v stacionarno fazo, kateri je sledila faza odmiranja. Slednja je bila precej nenavadna, saj je delež živih celic iz 81 % na dan 8, upadel na 10 % v dnevu 9. Razlog bi lahko bil v pomanjkanju vseh metabolitov, kar je razvidno s slike 31. Medtem ko je glutamina v rastnem gojišču zmanjkalo že na dan 6, je glukoze in laktata zmanjkalo na dan 8. Temu je sledilo močno znižanje deleža živih celic. Metabolizem laktata je bil vezan z metabolizmom glutamina – ko je slednjega zmanjkalo, so celice začele izrabljati nakopičen laktat. Koncentracija glutamata je naraščala vse do tretjega dneva bioprocesa, nato je začela upadati, skupaj s porabo glutamina. Ko so začele celice odmirati, so se koncentracije teh dveh substratov zopet povečale.



Slika 32: Poraba substratov celične linije C



Slika 31: Fenotip celične linije C na mikromreži PM-M1. Vsaka izmed krivulj v posamezni luknjici predstavlja odziv celične linije C na specifičen substrat v posameznem dnevu bioprocesa.

Celično kulturo smo med dnevi 4 in 8 nanašali na fenotipske mikromreže PM-M1. Rezultate smo združili v fenotip celične linije C, prikazan na sliki 32. Končne vrednosti absorbanc smo prenesli v Excel in izdelali pregledico 13.

Preglednica 13: Izkoriščanje alternativnih substratov celične linije C tekom bioprocasa, od dneva 4 - 8. Rezultati so prikazani kot relativne vrednosti glede na glukozo (%)

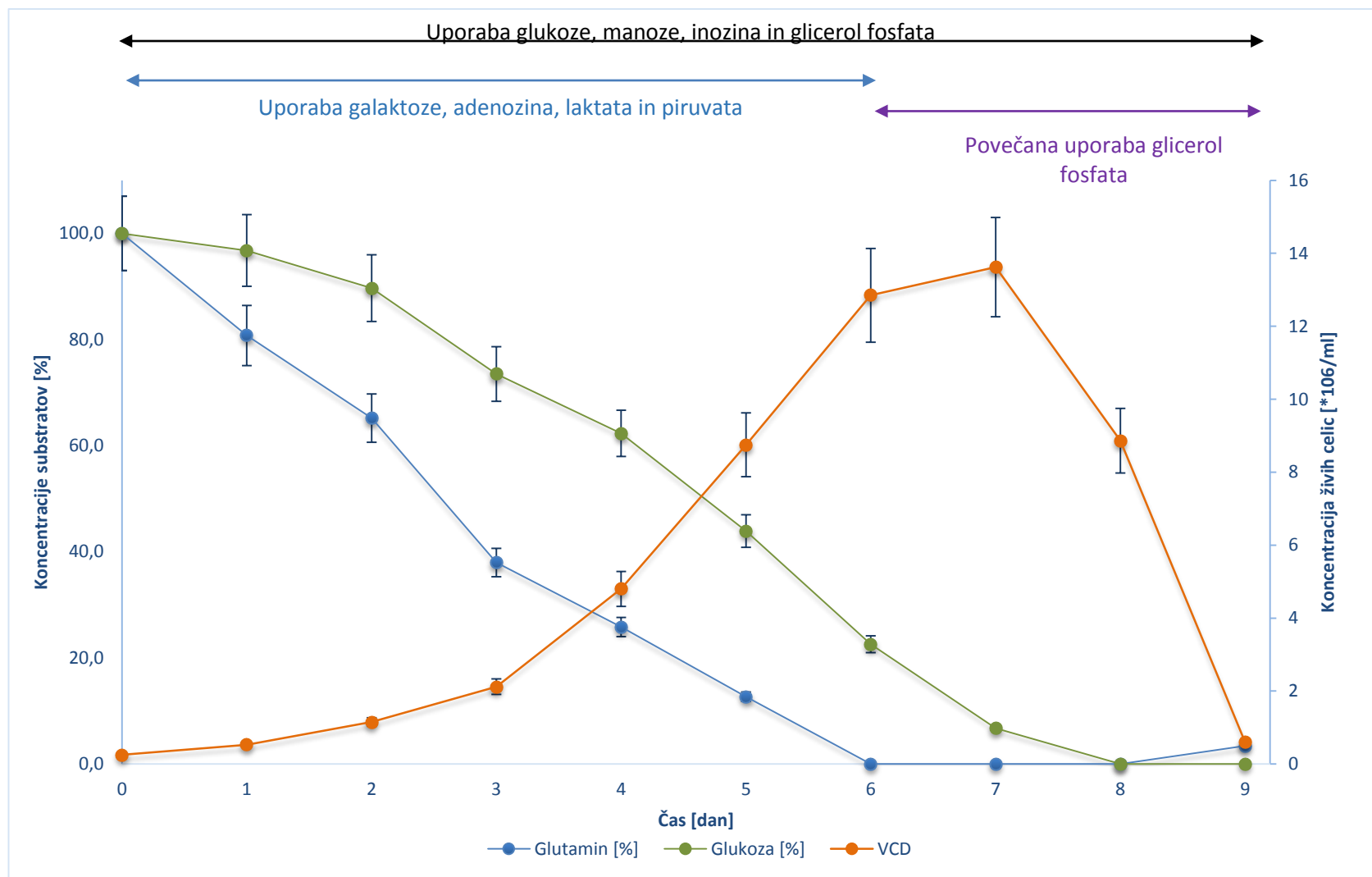
Analiza fenotipa celične linije C na mikromreži PM-M1					
SUBSTRAT	*D4	D5	D6	D7	D8
Dekstrin	12	12	14	7	3
D-glukoza-6-fosfat	14	10	0	8	12
α -D-glukoza-1-fosfat	12	12	12	7	4
α -D-glukoza	100	100	100	100	100
D-manoza	96	96	97	79	91
D-fruktoza-6-fosfat	2	24	17	11	9
D-galaktoza	41	48	34	3	0
Adenozin	34	33	35	17	14
Inozin	34	37	37	25	28
D,L- α -glicerol fosfat	21	25	29	46	129
citrat	4	3	7	6	20
D,L-laktat	74	74	74	41	8
Piruvat	14	28	30	3	4
Sukcinat	11	11	18	13	17
Sukcinamična kislina	2	2	4	4	20
Mono-metil sukcinat	10	9	14	13	22
Acetoacetat	15	13	15	12	27
γ -amino-N-butirat	9	6	7	6	20
α -keto butirat	3	2	6	7	16
heksonat	1	2	7	11	26

*oznaka za dan

Celična linija C je bila sposobna uporabiti 20 različnih virov ogljika. Neodvisno od koncentracije metabolitov v gojišču, so celice z enako sposobnostjo izrabljale dekstrin, D-glukoza-6-fosfat, α -D-glukoza-1-fosfat, sukcinamidno kislino, sukcinat, monometil sukcinat in acetoacetat. Najvišji odziv na fenotipskih ploščah smo zopet dobili na glukozni in manozni, visok odziv pa se je pokazal tudi pri D,L- α -glicerol fosfatu na dan 8, ko so celice že bile v fazi odmiranja.

Metabolizem galaktoze, adenozina in inozina se je začel zniževati na dan 7, ko je celicam že primanjkovalo glutamina. Sposobnost izrabe D-fruktoze-6-fosfata se je pokazala na dan 5, nato pa začela upadati. Zanimivo je, da se je na dan 8 pojavila povišana sposobnost izrabe γ -amino-N-butirata, α -keto butirata, heksonata in citrata.

Povezava rastne krivulje, porabe substratov in izrabe alternativnih virov energije je razvidna s slike 33. Za prikaz smo uporabili le tiste substrate, katerih odziv je presegel 30 %. Uporaba preostalih je razvidna iz preglednice 13.



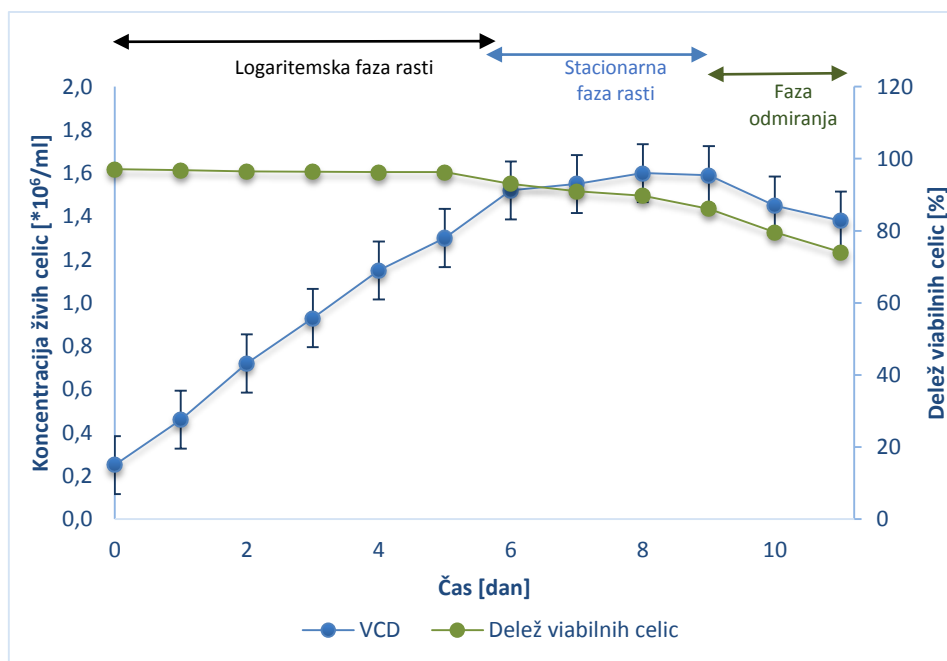
Slika 33: Rastna krivulja in izraba substratov celične linije C

4.6 FENOTIPSKA ANALIZA CELIČNE LINIJE D

Preglednica 14: Rezultati fenotipske analize celične linije D

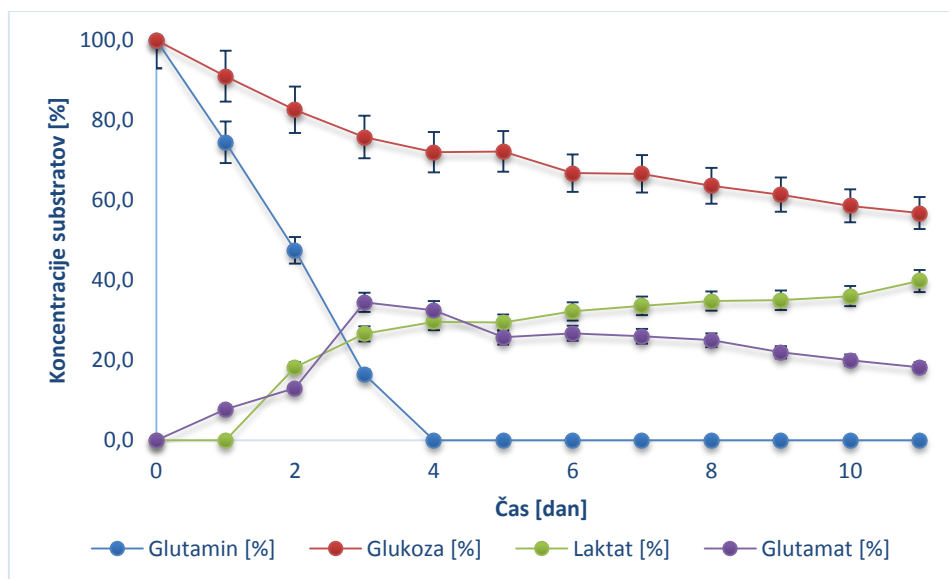
Dan	Analiza koncentracije celic				Analiza substratov				
	TCD [$\times 10^6$ celic/ml]	VCD [$\times 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Podvojitveni čas [h]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	NH ₄ ⁺ [%]
0	0,27	0,25	97,10	/	100,0	0,0	100,0	0,0	19,5
1	0,49	0,46	96,8	27,3	74,5	7,8	91,0	0,0	35,0
2	0,75	0,72	96,5	37,1	47,5	13,0	82,6	18,2	59,8
3	0,96	0,93	96,4	65,0	16,5	34,5	75,8	26,6	93,8
4	1,2	1,15	96,3	78,3	0,0	32,5	72,0	29,6	106,5
5	1,35	1,30	96,3	135,7	0,0	25,8	72,2	29,4	117,8
6	1,64	1,52	93,0	106,40	0,0	26,8	66,8	32,2	120,8
7	1,69	1,57	91,0	513,99	0,0	26,0	66,6	33,6	129,3
8	1,78	1,60	89,7	878,88	0,0	25,0	63,6	34,8	136,5
9	1,86	1,59	86,1	*	0,0	22,0	61,4	35,0	128,5
10	1,82	1,45	79,6	*	0,0	20,0	58,6	36,0	141,8
11	1,86	1,38	74,1	*	0,0	18,3	56,8	39,8	151,3

*podvojevalnega časa ni bilo mogoče izračunati, saj celice preidejo v fazo odmiranja



Slika 34: Rastna krivulja in delež živih celic celične linije D

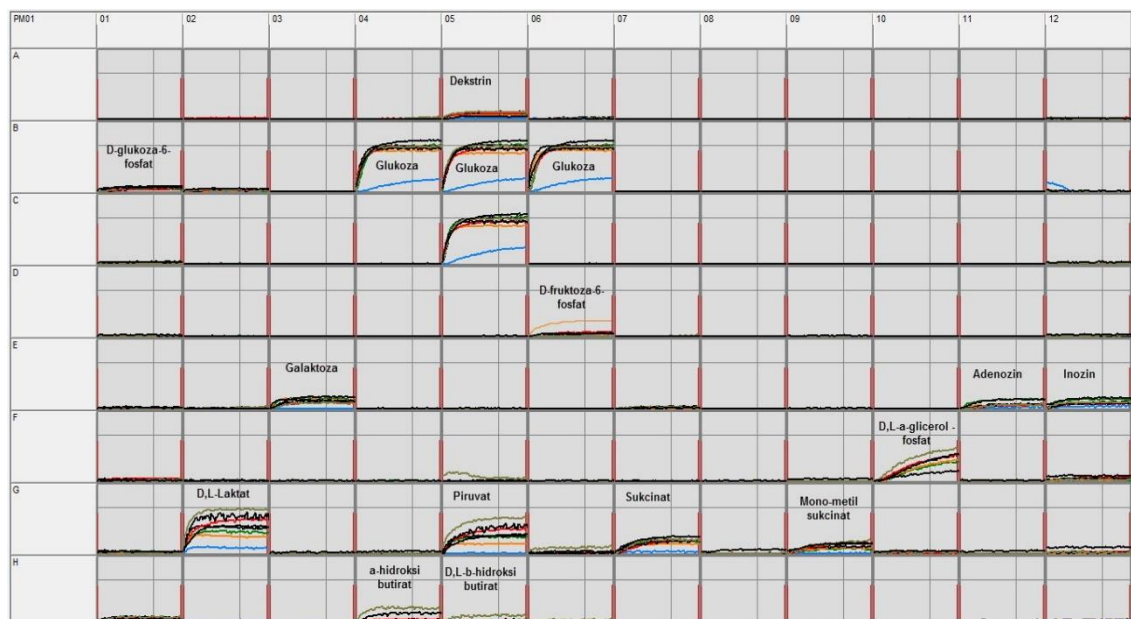
Namnoževanje celične linije D je bilo popolnoma drugačno od preostalih celičnih linij. Podvojitveni čas se je podaljševal z vsakim dnevom, zato težko govorimo o logaritemski fazi rasti. V stacionarni fazi rasti, katero so celice dosegle na dan 6, se koncentracija celic ni več povečevala, zniževati pa se je začel delež živih celic. Po dveh 9 dneh so celice prešle v fazo odmiranja.



Slika 35: Poraba substratov celične linije D

Rastno gojišče celične linije D je vsebovalo polovično vrednost substratov v primerjavi z ostalimi gojišči. S slike 35 je razvidno, da sta se glukoza in glutamin na začetku porabljala z enako dinamiko. Ko je zmanjkalo glutamina, se je ustavila tudi izraba glukoze. Od dneva 4 naprej se je tako porabilo le 10 % glukoze. Vzrok bi lahko bil v sestavi rastnega gojišča, ki je vsebovalo hidrolizate rastlinskih proteinov. Le-te lahko celice razgrajujejo in uporabljajo, vendar jih mi z našimi metodami ne moremo zaznati. Koncentracija glutamata v gojišču je na začetku naraščala, ko je zmanjkalo glutamina, pa je začela upadati. Koncentracija laktata v gojišču je naraščala skozi celoten bioproces. Zaradi hitre porabe glutamina smo z analizo fenotipa na PM-M1 mikromrežah začeli že na dan 3.

Na sliki 36 so predstavljene krivulje odzivov. Izstopa predvsem modra krivulja, ki predstavlja fenotip na dan 10, ko je delež živih celic upadel že na 80 %. Metabolizem celičnih linij je bil očitno že tako okrnjen, da kljub prisotnosti glukoze, le-te niso mogle več učinkovito uporabiti. Številčne vrednosti odzivov relativno na glukozo so predstavljene v preglednici 15.



Slika 36: Fenotip celične linije D na mikromreži PM-M1. Vsaka izmed krivulj v posamezni luknjici predstavlja odziv celične linije D na specifičen substrat v posameznem dnevu bioprocesa.

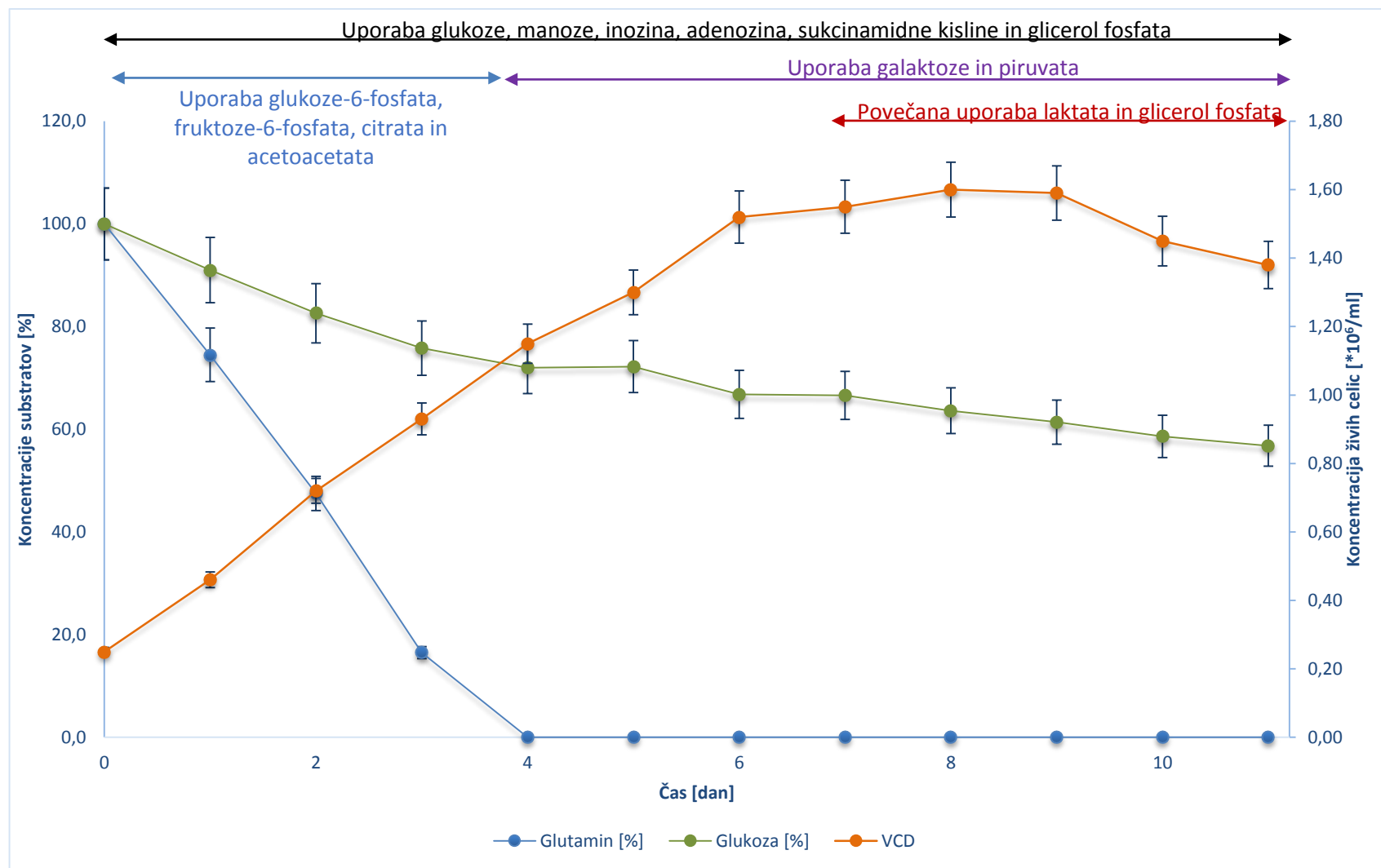
Preglednica 15: Izkoriščanje alternativnih substratov celične linije D tekom bioprocesa, od dneva 3 - 10. Rezultati so prikazani kot relativne vrednosti glede na glukozo (%)

Analiza fenotipa celične linije D na mikromreži PM-M1								
SUBSTRAT	*D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Dekstrin	6	8	8	10	9	3	15	16
D-glukoza-6-fosfat	45	5	10	4	4	5	12	8
α-D-glukoza-1-fosfat	14	2	3	6	4	3	7	4
α-D-glukoza	100	100	100	100	100	100	100	100
D-manoza	124	100	97	99	97	98	99	99
D-fruktoza-6-fosfat	60	5	5	7	7	4	8	6
D-galaktoza	0	21	22	19	14	21	16	14
Adenozin	24	19	14	12	10	16	12	10
Inozin	47	22	17	17	14	18	15	17
D,L - α-glicerol fosfat	212	43	50	53	58	17	60	67
citrat	31	5	5	8	9	8	9	6
D,L-laktat	42	44	44	53	79	53	85	93
Piruvat	5	35	25	35	56	36	63	69
Sukcinat	20	28	25	27	31	32	31	29
Mono-metil sukcinat	15	14	14	16	22	19	25	29
Acetoacetat	43	12	12	17	15	11	21	20
γ-amino-N-butirat	29	5	2	9	3	7	4	6
α-keto butirat	16	3	2	8	6	7	10	9
α-hidroksi butirat	13	8	5	13	16	4	29	35
D,L-β-hidroksi butirat	17	9	4	11	9	6	16	22
γ- hidroksi butirat	15	3	1	6	2	6	5	10

*oznaka za dan

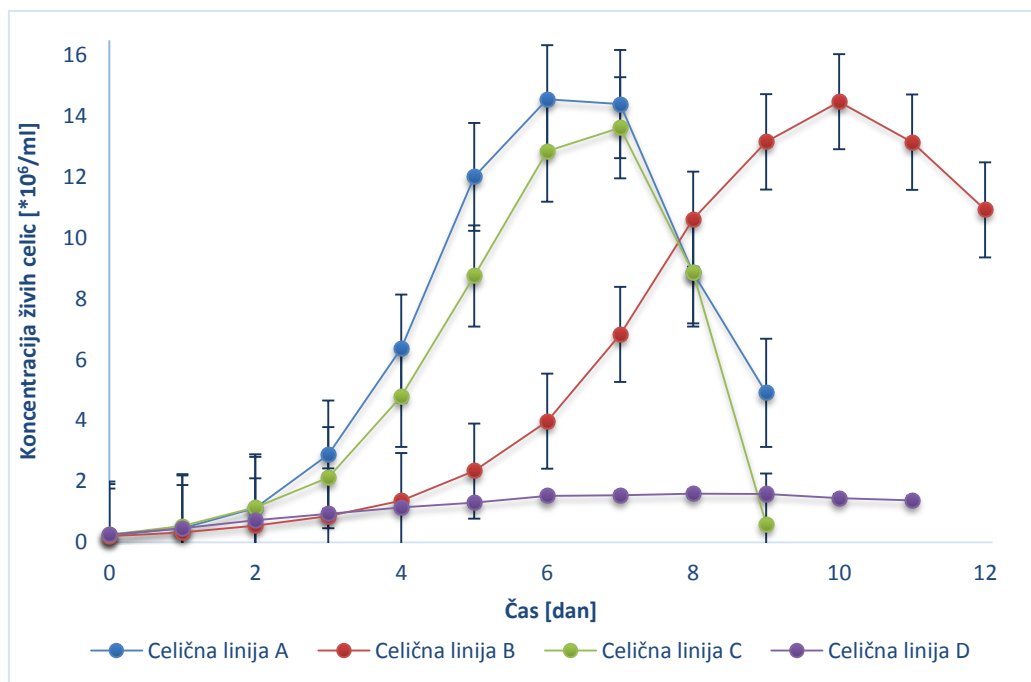
Celična linija D je bila sposobna izrabljati 21 različnih virov ogljika. Iz preglednice 15 je lepo razvidna sprememba fenotipskih lastnosti iz dneva 3 na 4, ko je padla koncentracija glutamina v gojišču pod mejo zaznave. Tretji dan bioprocesa so celice kazale precej višjo sposobnost izkoriščanja D-glukoze-6-fosfata, D-fruktoze-6-fosfata, inozina, D,L - α -glicerol fosfata, citrata, laktata, aceto acetata in γ -amino-N-butirata, kot na preostale dneve. V nasprotju z dnevom 4, pa na dan 3 niso izrabljale D-galaktoze in piruvata. Od dneva 4 naprej se fenotipske lastnosti niso močno spreminjale – poudarek izkoriščanja metabolitov je bil na glukozi in manози, v manjši meri pa so lahko izrabljale tudi številne druge metabolite, prikazane v preglednici 15. Deveti dan se je povišala sposobnost izrabe D,L- α -glicerol fosfata, laktata, piruvata in α -hidroksi butirata.

Povzetek spremembe metabolizma je prikazan na sliki 37. Zaradi večje preglednosti smo uporabili le substrate, katerih odziv je presegal 30 %.



Slika 37: Rastna krivulja in izraba substratov celične linije D

4.7 PRIMERJAVA CELIČNIH LINIJ

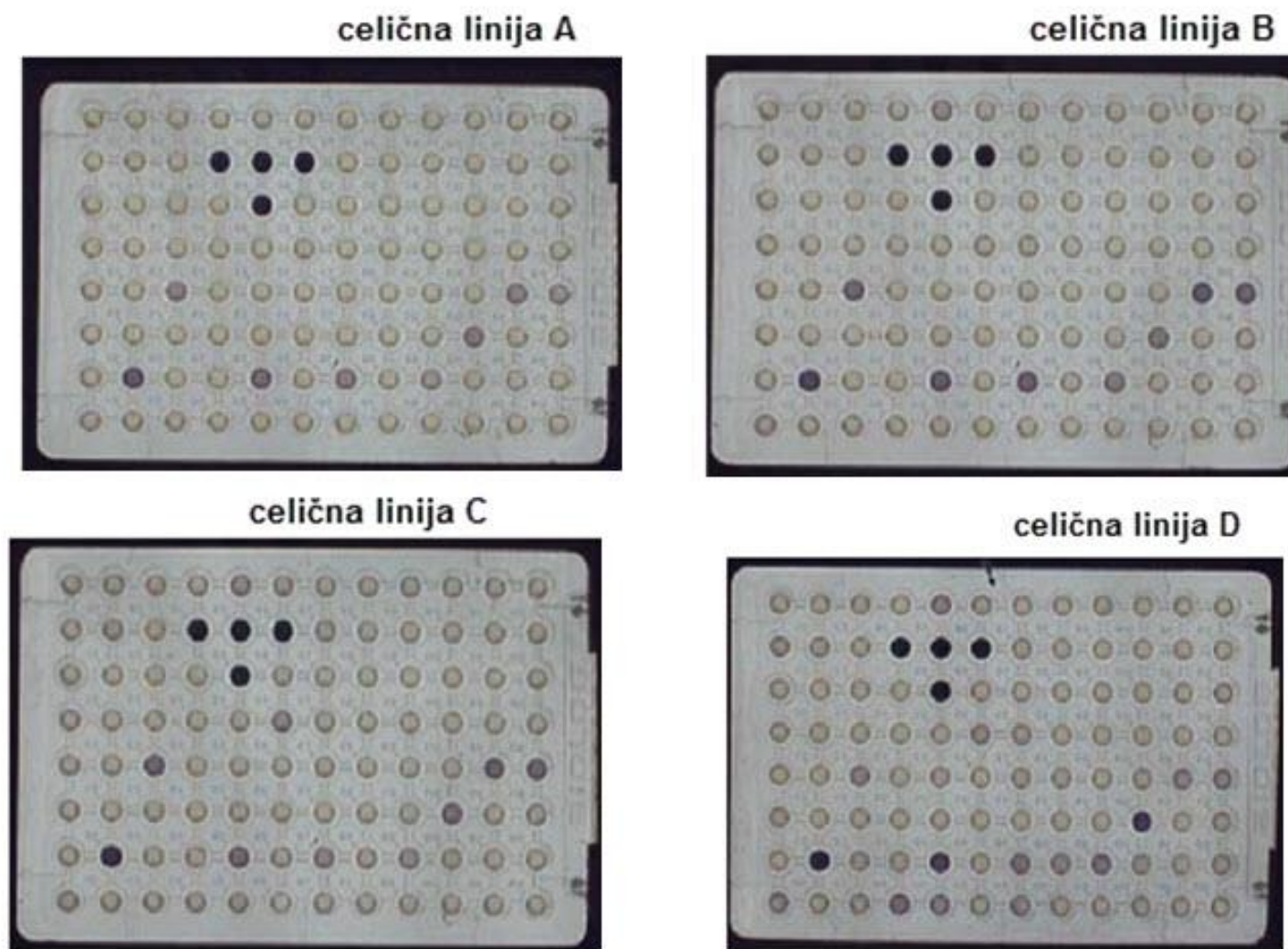


Slika 38: Rastne krivulje štirih celičnih linij

Za lažjo primerjavo celičnih linij smo vse rastne krivulje prikazali na sliki 38. Vidimo lahko, da sta bili rastni krivulji celičnih linij A in C zelo primerljivi, prav tako njuna maksimalna celična gostota. Razlika se je pojavila le pri dinamiki upadanja deleža živih celic, katera je bila pri linji C hitrejša. Celična linija B je v primerjavi s preostalimi rastla nekoliko počasneje, tudi podvojitveni čas je bil nekoliko daljši. Hkrati s počasnejšo rastjo celic je bila nižja tudi izraba substratov. Kljub temu je celična linija B dosegla primerljivo maksimalno gostoto celic. Tako kot so celice počasneje rastle, je počasneje upadal tudi delež živih celic. Razlike so bile posledica upočasnjene metabolizma celične linije B, kar je pomenilo počasnejšo porabo substratov v logaritemski fazi rasti ter dolgotrajnejšo fazo odmiranja, saj pomanjkanje substratov za to celično linijo ni bilo tako usodno.

Rastna krivulja celične linije D ni bila primerljiva z ostalimi. Iz nje niso bile razvidne posamezne faze rasti, tudi maksimalna celična gostota je bila zelo nizka – le $2 \cdot 10^6$ celic/ml.

Fenotipske razlike med celicami so se izrazile tudi v sposobnosti preživetja celic v osiromašenem gojišču Os. Na sliki 21 (poglavje 4.2) smo tako opazili, da je delež živih celic najhitreje upadel pri celični liniji A, medtem ko je lahko celična linija B brez substratov preživela precej dlje časa.



Slika 39: Primerjava celičnih linij na fenotipskih mikromrežah PM-M1

S slike 39 so razvidni rezultati fenotipske analize posameznih celičnih linij, izbranih na dneve, ko so bile celice sposobne izrabljati največ substratov. Opazimo lahko, da so si bile celične linije A, B in C med sabo podobne, so se pa vse razlikovale od celične linije D. Prav tako opazimo, da sta se celični liniji A in B razlikovali od celične linije C. Rezultati so bili pričakovani, saj so celične linije izvirale iz različnih starševskih linij. Osnovni vzorec je bil enak – vse celične linije so najbolje izkoristile glukozo in manozo. Prav tako smo lahko videli pri vseh celičnih linijah odzive na laktatu, galaktozi, piruvatu, sukcinamidni kislini, mono-metil sukcinatu, glicerol fosfatu, adenzinu in inozinu, vendar so se med linijami pojavile razlike v intenziteti vijoličnega obarvanja in s tem v sposobnosti izkoriščanja substratov. Razlike med linijami so se pojavile tudi pri substratih z najnižjimi odzivi, med njimi jih lahko največ koristila celična linija D. Lokacija posameznih substratov na mikromreži PM-M1 je opisana v poglavju 3.2.4.

S poskusom smo dokazali, da je tehnologija fenotipskih mikromrež primerna za primerjavo metabolnih lastnosti različnih celičnih linij. V poskusu smo uporabili 4, po izvoru različne celične linije CHO. Celični liniji A in B izvirata iz enake starševske celične linije CHO-K1, pri čemer je celična linija B izpeljanka celične linije A. Pričakovano je bilo, da si bosta celični liniji A in B fenotipsko precej podobni. Celična linija C izvira iz celične linije CHO-DXB11, ki ima izbrisan en alel za DHFR, drugi pa je inaktiviran, medtem ko celična linija D izvira iz linije CHO-DHFR⁺, ki ima izbrisana oba alela za DHFR (Wurm in Hacker, 2011). Razlika med celičnimi linijami je bila pričakovana, saj se za razvoj visoko produkcijskih celičnih linij uporablja transfekcija, ki pa ni tarčna. Posledično se plazmid s transgenom vstavi v naključno mesto v genom gostiteljske celice, kar lahko rezultira v spremembah genotipskih in fenotipskih lastnosti ter metabolizmu celic. Med razvojem celične linije preko selekcijskih pritiskov prav tako prihaja do delecij, translokacij in prerazporeditev segmentov kromosoma, kar se seveda izraža tudi na fenotipskih lastnostih.

Iz rezultatov fenotipske analize je razvidno, da se celične linije med seboj zelo razlikujejo, kar smo dokazali s pomočjo različnih metod, med drugim tudi s tehnologijo fenotipskih mikromrež. Potrdimo lahko drugo hipotezo. Slika 24, slika 28, slika 32 in slika 36 povezujejo odvisnost fenotipa celičnih linij od koncentracij substratov v gojišču in potrjujejo tretjo hipotezo.

Za potrebe poskusa 3.3.5 in hipoteze 4 smo morali izbrati celično linijo, za katero smo spremenili rastno gojišče. Odločili smo se za celično linijo A, saj so bile celice hitro rastoče, hitro so porabljale substrate, tudi proizvodnja monoklonskih protiteles je bila zadovoljiva. Ko je celicam zmanjkalo substratov, so hitro prešle v fazo odmiranja. Naš namen je bil izboljšati rastne lastnosti, zakasniti fazo odmiranja in povišati proizvodnjo monoklonskih protiteles.

4.8 SPREMEMBA RASTNEGA GOJIŠČA CELIČNE LINIJE A

S pomočjo poskusa spremembe rastnega gojišča, smo želeli potrditi zadnjo hipotezo, ki predpostavlja, da lahko na podlagi rezultatov fenotipske analize s pomočjo mikromrež izboljšamo bioproces. Ker je osrednja metoda magistrskega dela tehnologija fenotipskih mikromrež, smo s tem poskusom želeli le pokazati, da jo lahko uporabimo za izboljšanje bioprosesov. Posledično smo izvedli le nekaj osnovnih poskusov z dodajanjem substratov v rastna gojišča.

Ker je recept za rastna gojišča lastnina farmacevtske družbe Lek d.d., so koncentracije substratov preračunane relativno glede na maksimalno koncentracijo posameznega substrata v gojišču

Iz koncentracije živih celic smo izračunali podvojitvene čase na podlagi enačbe 2. Časovni intervali so znašali 24 ur.

Izračunali smo tudi specifično produktivnost, ki nam pove, koliko produkta je proizvedla ena celica v enem dnevu. Za izračun slednje smo morali najprej izračunati integral živih celic (IVC), ki nam poda površino trapezov pod rastno krivuljo. Izračunan je bil po enačbi 3.

$$IVC = \frac{x_0 + x_1}{2} \times (t_1 - t_0) + \frac{x_1 + x_2}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{x_2 + x_3}{2} \times (t_3 - t_2) + \dots + \frac{x_{n-1} + x_n}{2} \times (t_n - t_{n-1}) \quad \dots (3)$$

Spremenljivka	Enota
IVC	Integral živih celic [(živih celic * dan)/ml]
x_0	Koncentracija živih celic ob času t_0 [živih celic/ml]
x_n	Koncentracija živih celic ob času t_n [živih celic/ml]
t_1	Čas meritve koncentracije živih celic [dan]

Specifična produktivnost je bila izračunana po enačbi 4.

$$Q_p = \frac{P_2 - P_1}{IVC_2 - IVC_1} \quad \dots (4)$$

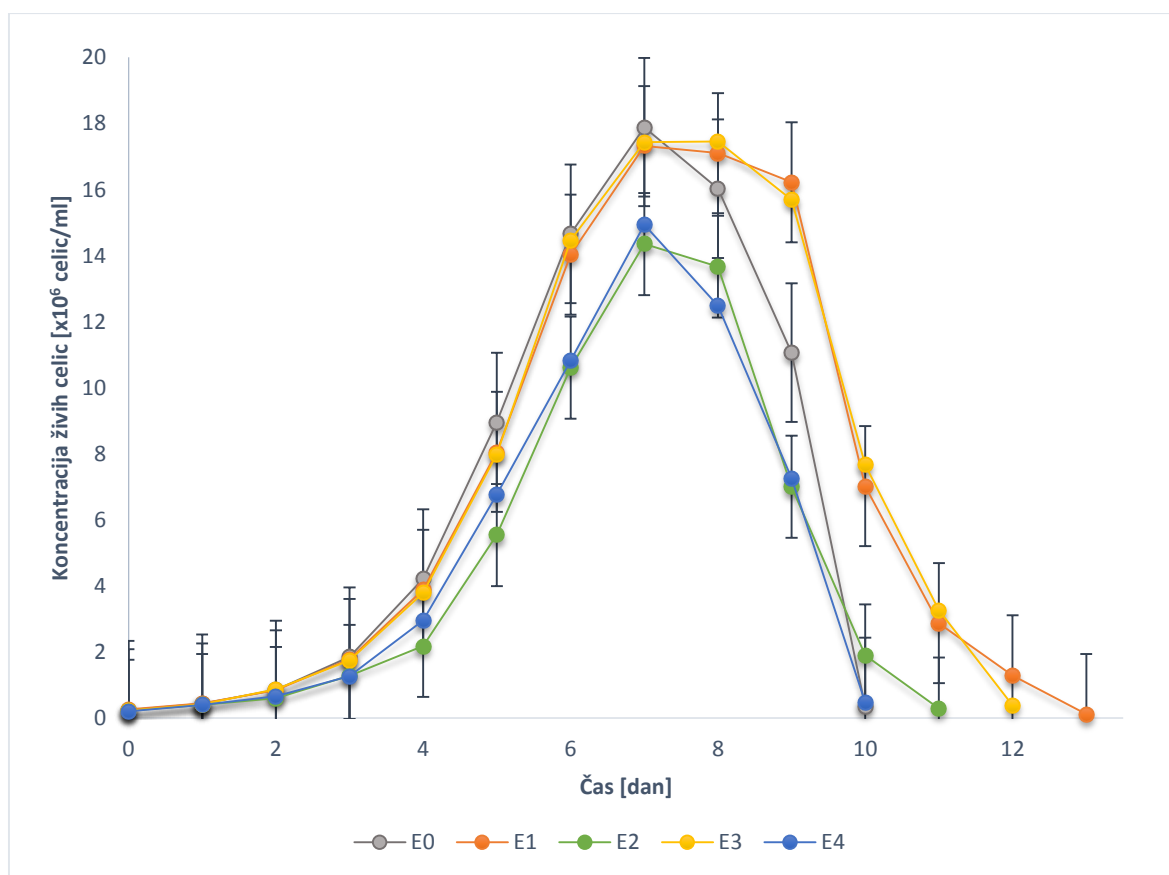
Spremenljivka	Enota
Q_p	Specifična produktivnost [ng/(živih celic * dan)]
P_1	Koncentracija produkta merjena ob času t_1 [mg/ml]
P_2	Koncentracija produkta merjena ob času t_2 [mg/ml]
IVC_1	Integral živih celic ob času t_1 [(živih celic * dan)/ml]
IVC_2	Integral živih celic ob času t_2 [(živih celic * dan)/ml]

4.8.1 Uporaba alternativnih sladkorjev

Preko fenotipske analize na mikromrežah PM-M1 smo ugotovili, da lahko vse celične linije uporabljajo kot alternativna sladkorja galaktozo in manozo. Zato smo izvedli bioprocese (E1 in E3), v katerih smo rastnemu gojišču za celično linijo A, dodali manozo ali galaktozo v polovični koncentraciji glukoze. Naš cilj je bil podaljšati bioproces in povečati proizvodnjo monoklonskih protiteles.

Zanimalo nas je tudi, ali celice če imajo na voljo alternativne sladkorje, preferenčno uporabijo najprej glukozo in nato preklopijo na drug substrat ali ju izkoriščajo skupaj. Zastavili smo poskuse (E2 in E4), v katerih smo rastnemu gojišču zmanjšali začetno koncentracijo glukoze za 50 % ter jo nadomestili z galaktozo oziroma manozo.

Kot negativno kontrolo smo uporabili bioproces E0, ki je bil izveden v običajnem rastnem gojišču celične linije A.

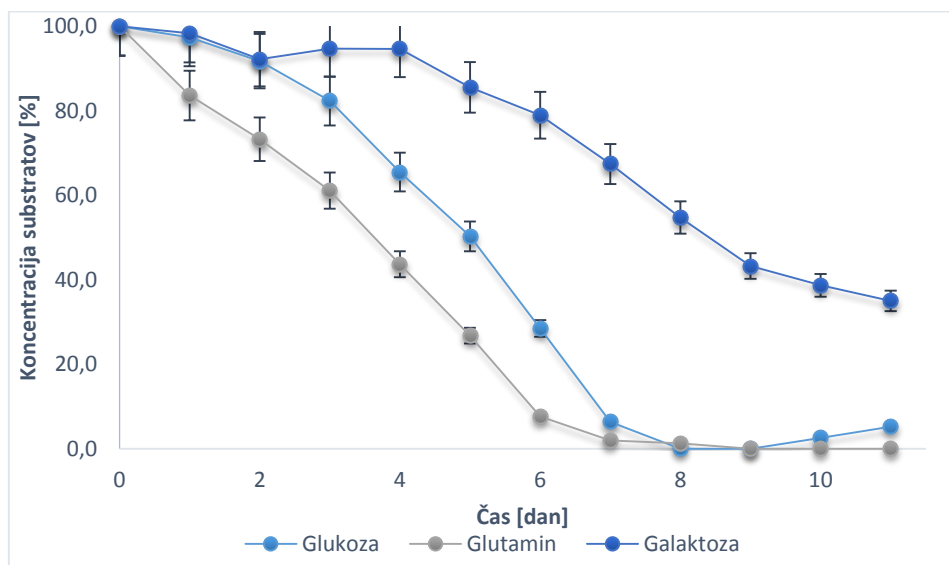


Slika 40: Rastne krivulje bioprocsov z dodano galaktozo (E1, E2), manozo (E3, E4) in negativna kontrola (E0)

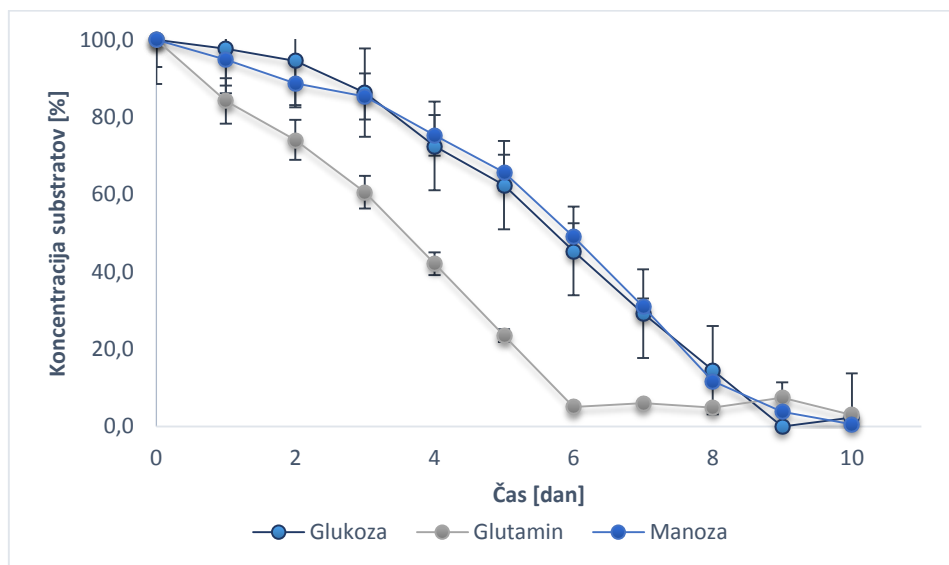
Rastna krivulja bioprocesa z dodano galaktozo (E1) in dodano manozo (E3) je bila zelo podobna rastni krivulji negativne kontrole, podvojevalni časi so bili podobni, prav tako ni bilo razlike v doseženi maksimalni gostoti celic. Pojavila pa se je razlika v fazi odmiranja – bioprocen z dodano galaktozo oz. manozo se je podaljšal za dva dni, delež živih celic pa je upadal počasneje. Do razlike je lahko prišlo tudi zaradi večje koncentracije skupnih sladkorjev v gojišču, zato bi bilo potrebno poizkusiti še z višjimi začetnimi koncentracijami glukoze.

Bioprocen E2, ki je vseboval 50 % glukoze in 50 % galaktoze, se je razlikoval od negativne kontrole. Celice so rasle počasneje, podvojitveni čas je bil daljši, prav tako je bila nižja maksimalna gostota celic. Zanimiva je poraba substratov – glukoza se je začela porabljati šele 3 dan bioprocesa, medtem ko se je izkoriščanje galaktoze začelo dva dni kasneje.

Prav tako lahko vidimo, da so celice v bioprocusu E4 rasle počasneje od negativne kontrole. Iz poskusov E2 in E4 je bilo očitno, da je nižja koncentracija glukoze v gojišču, kljub dodatku alternativnih sladkorjev, vodila v počasnejšo rast celic in posledično nižjo proizvodnjo produkta.



Slika 41: Poraba substratov v bioprocusu E2

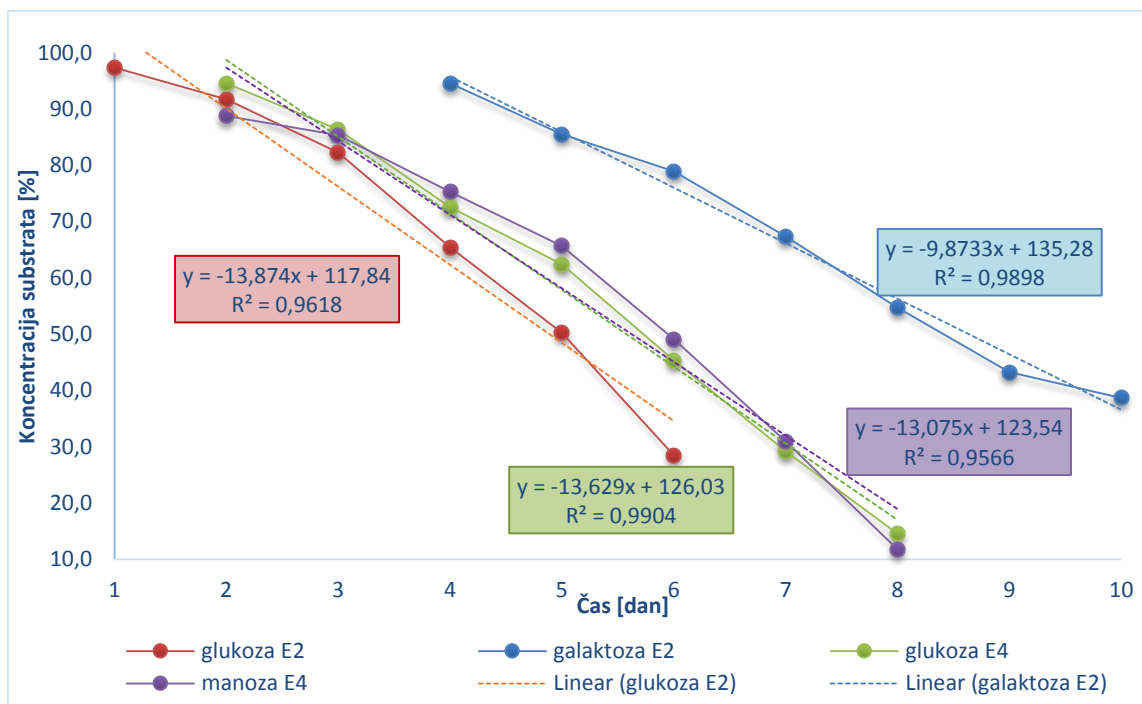


Slika 42: Poraba substratov v bioprocesu E4

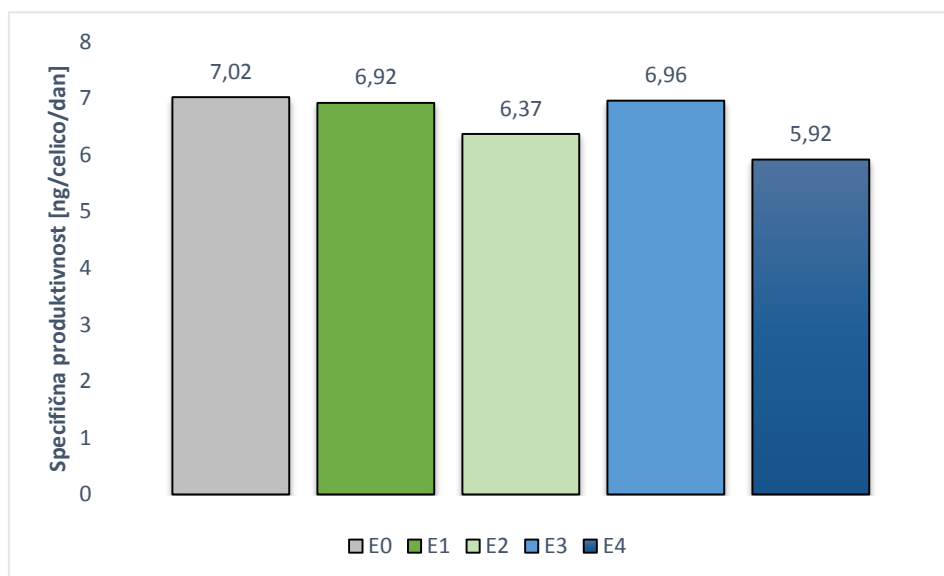
S slike 42 je razvidno, da je bila uporaba manoze in glukoze v rastnem gojišču vzporedna, celična linija A do substratov ni kazala nobene preference. Rezultati so se skladali z fenotipskimi mikromrežami, kjer so bili odzivi na glukozi in manози praktično enaki.

S slike 41 in 42 lahko opazimo, da je bila poraba substratov od dneva 3 naprej linearna. Zato smo iz grafov izvzeli linearne dele in jim dodali trendno črto ter enačbo premice. Rezultati so razvidni s slike 43. Smerni koeficienti premice, ki opisujejo izrabo glukoze in manoze, so si bili med sabo zelo podobni, medtem ko je bil smerni koeficient premice, ki opisuje izrabo

galaktoze nekoliko nižji. Izraba galaktoze je bila tako 30 % nižja. Opazimo lahko tudi, da so celice začele učinkoviteje izrabljati galaktozo dan kasneje kot manozo.



Slika 44: Hitrost izrabe substratov



Slika 43: Specifična produktivnost bioprocesov z alternativnimi sladkorji.

Specifične produktivnosti med bioprocesi se med seboj niso razlikovale drastično. Bioprocesi, pri katerih smo samo dodali alternativne sladkorje, so imeli specifično produktivnost enako negativni kontroli. Nekoliko nižja je bila le pri bioprocesih z zmanjšano koncentracijo glukoze. Smiselno bi bilo preveriti še kakovost pridobljenega produkta.

Poskusi, ki so bili izvedeni, služijo samo kot potrditev, da lahko s pomočjo tehnologije fenotipskih mikromrež izboljšamo rastne in produkcijske lastnosti celičnih linij. V nadaljnjih korakih bi bilo smiselno preveriti kakovost pridobljenega produkta in poskuse izvesti v produkcijskem gojišču. V slednjih bi bilo smiselno popolnoma zamenjati glukozo z galaktozo ali manozo, ter dodajati glukozo in manozo/galaktozo v različnih razmerjih, za kar bi lahko uporabili eno izmed statističnih orodij za načrtovanje poskusov. Za boljšo rast in proizvodnjo celic je pomembno, da se v izrabljenem gojišču kopiči čim manj laktata in amonija, zato bi bilo dobro v nadaljnjih poskusih proučevati tudi vpliv alternativnih oblik ogljika na porabo in proizvodnjo teh dveh metabolitov.

Poskusi, ki smo jih izvedli, so temeljili na običajnem bioprocesu brez dohranjevanja. V industriji se za proizvodnjo rekombinantnih proteinov običajno uporablja bioproces z dohranjevanjem, ki omogoča doseganje visokih celičnih gostot in specifične produktivnosti. Uporabo galaktoze in manoze kot alternativnega vira ogljika, bi bilo tako dobro preizkusiti tudi v obliki substrata za dohranjevanje.

Poskusi z uporabo manoze in galaktoze kot alternativnih virov ogljika so bili na industrijskih celičnih linijah že izvedeni. Leta 2006 so Altamirano in sod. (2006) na celični liniji CHO, ki proizvaja t-PA, preizkusili kombinacijo glukoze in galaktoze v razmerju 1:4. Ugotovili so, da so celice najprej porabile glukozo, čemur je sledila poraba galaktoze in laktata v gojišču. Končni rezultat poskusa je bila izboljšana rast celic. V primerjavi z njihovo celično linijo je naša sposobna hkratnega izkoriščanja glukoze in galaktoze, vendar mi izboljšanja rasti nismo opazili.

Sun in sodelavci (2013) so razvili dohranjevalni proces za celično linijo CHO-DHFR, ki proizvaja monoklonsko protitelo CD20. V bioprocesu je kot dohranjevalni substrat kombiniral glukozo in galaktozo v razmerju 1:1,8. Z ustreznim časovnim intervalom dohranjevanja jim je uspelo izboljšati rast celične linije za 45 %, povečati specifično produktivnost za 143 %, maksimalno koncentracijo laktata v izrabljenem gojišču pa zmanjšati za 55 %. V bioprocesu se je pojavil tudi laktatni premik iz proizvodnje v porabo, ki pa ni vodil v pomanjkanje laktata in kopičenje amonija v izrabljenem gojišču.

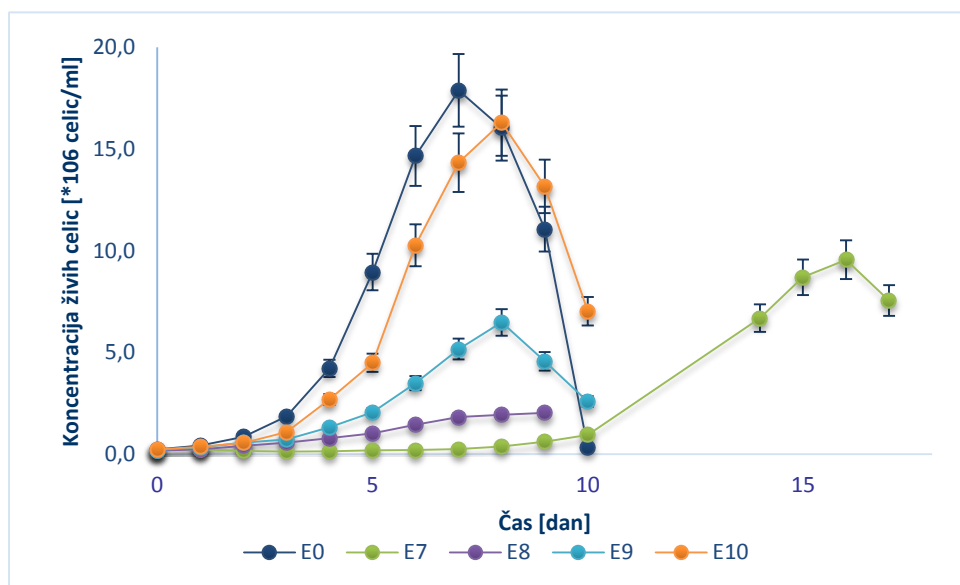
Poskusi so bili izvedeni prav tako na manozni. Berrios in sodelavci (2011) so v produkcijskem mediju za proizvodnjo t-PA v perfuzijskem sistemu nadomestili glukozo z manozo. Opazili so 15-20 % povečanje gostote celic, koncentracije laktata v izrabljenem gojišču pa so bile 25 – 30 % nižje. Volumska produktivnost se je povečala za 30 %, ne da bi se spremenil delež sialične kisline v končnem produktu. Prav tako se je v bioprocesu zmanjšala poraba kisika za 10 – 25 %, kar je omogočilo gojenje celične kulture v 3000-l bioreaktorjih, v primerjavi z glukozo, kjer je možno gojenje le v 80-l reaktorjih. V naših poskusih smo uporabili običajen bioproces, v katerem se rezultati niso razlikovali od negativne kontrole – dodatek manoze ni imel vpliva na gostoto celic in količino produkta, vendar je bila manozna le dodatek in ne glavni vir ogljika.

4.8.2 Uporaba nukleozidov

Nukleozidi so nukleotidi, ki imajo vezano fosfatno skupino. V celici so pomembni gradniki molekul DNA in RNA. Sintetizirani so lahko *de novo* ali pa so samo recikrirani iz nukleinskih kislin. Na fenotipskih mikromrežah so vse celične linije izkazovale sposobnost izrabe adenzina in inozina kot vira energije, zato smo se odločili, da ju bomo preizkusili še v bioprocesih. Ker je poznana citostatična vloga adenzina, smo ju preizkusili v treh koncentracijah: 1 g/l, 0,5 g/l in 0,1 g/l.

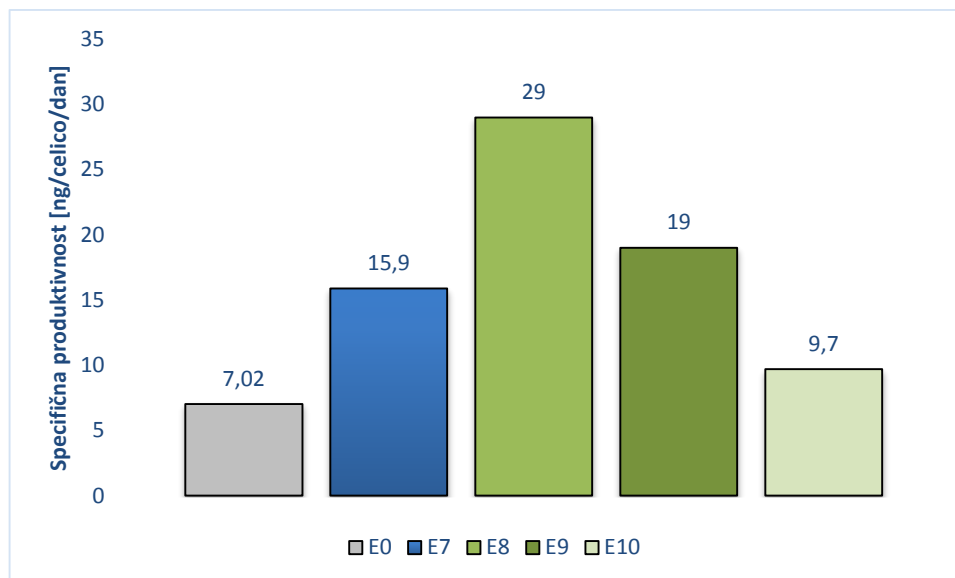
Pri bioprocesih z dodatkom adenzina smo hitro ugotovili, da so dodane koncentracije ne le citostatične, temveč tudi citotoksične. Več kot 4 dni je preživel le bioproces E7, ki je vseboval najnižjo koncentracijo adenzina. S slike 45 je razviden zanimiv učinek adenzina – prvih pet dni je deloval na celice citostatično, nato pa so se celice začele podvajati. Možni razlagi sta dve – ali so celice porabile adenzin ali pa so se nanj prilagodile.

Tudi inozin je imel na rast celične linije citostatični učinek, ki pa je upadal z zniževanjem koncentracije substrata. Medtem ko je bioproces z najvišjo koncentracijo dosegel maksimalno gostoto 2 milijonov celic/ml, desetkrat nižja koncentracija skorajda ni imela vpliva na rast celic in celično gostoto.



Slika 45: Rastne krivulje bioprocesov z dodanimi nukleozidi in negativna kontrola (E0)

Kljub temu, da so dodani nukleozidi upočasnili rast celičnih kultur, pa so bile celice vseeno sposobne proizvodnje monoklonskih protiteles. S slike 46 je razvidno, da je že dodatek inozina v koncentraciji 0,1 g/l povečal proizvodnjo produkta v primerjavi z negativno kontrolo. Koncentracija monoklonskih protiteles je bila ob dodatku inozina 1 g/l kar 4,5 – krat višja od negativne kontrole. S povečevanjem koncentracije nukleozidov v rastnem gojišču smo tako povečali proizvodnjo monoklonskih protiteles.



Slika 46: Specifična produktivnost bioprocsov z dodanimi nukleozidi in negativna kontrola (E0).

Ker v bioprocsovih ni pomembna samo volumska produktivnost, temveč tudi specifična, je pomembna izboljšava bioprocesa povečanje le-te. Kljub manjši celični gostoti, so celice proizvedle enako količino rekombinantnega proteina pri procesu E9 v primerjavi z negativno kontrolo. Manjša koncentracija celic pomeni manjšo porabo substratov in hitrejša ter cenejša zaključna procesa v proizvodnji. Kljub temu pa bi bilo v nadaljnjih korakih smiselno preveriti kakovost proizvedenih produktov.

Prav tako bi bilo smiselno izvesti poskuse v produkcijskem gojišču in v bioprocsov z dohranjevanjem. Izziv bi bil izdelati dohranjevalni substrat glede na to, da je topnost obeh nukleozidov v gojišču le 20 g/l. Učinek dodanih nukleozidov v gojišče bi lahko preverili v različnih koncentracijah z namenom iskanja koncentracije, ki bi povečala produkcijo rekombinantnih proteinov, ne da bi preveč upočasnila rast celične kulture. Za inozin bi to bila lahko koncentracija 0,5 g/l, medtem ko je za adenozin ustrezno koncentracijo še potrebno poiskati.

Uporaba nukleozidov (inozina in adenozina) v bioprocsovih z namenom povečanja specifične produktivnosti v sesalskih celičnih linijah do danes še ni bila uporabljena. So pa že dolgo znani citostatični učinki adenozina na sesalske celice. Že Snyder in sodelavci (1978) so poročali o toksičnosti adenozina na človeške limfoblaste, do katere pride zaradi zmanjšanja koncentracije pirimidinskih ribonukleotidov (citozin, timin, uracil) in NAD^+ , kar povzroči kopičenje orotične kisline v celici. Povečane količine le-te namreč znižajo nivo fosforibozil pirofosfata (PPRP), ki je nujno potreben za nadaljnjo sintezo pirimidinskih nukleotidov. Metabolizem adenozina gre v dve smeri – s pomočjo adenozin deaminaze se pretvori v manj toksičen inozin, preko adenozin kinaze pa se fosforilira v adenozin-5'-monofosfat (AMP). V prisotnosti zunajceličnih koncentracij adenozina, adenozin kinaza le-tega fosforilira, kar rezultira v citotoksičnih količinah AMP (Ishii in sod., 1973).

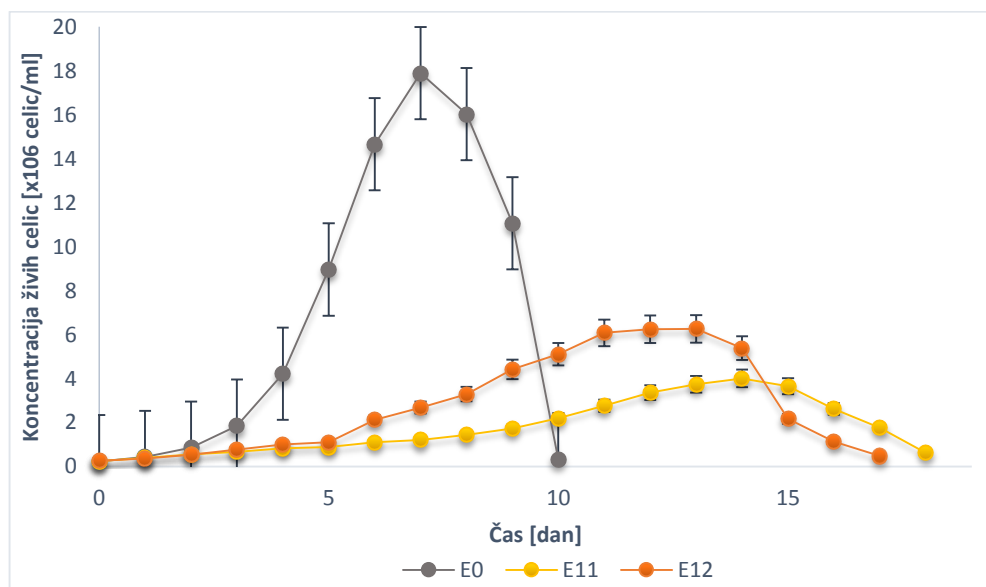
Inozin je v celici lahko pretvorjen v inozin-5-fosfat (IMP) z encimom inozin kinaza, čemur sledi pretvorba s pomočjo IMP dehidrogenaze v ksantozin-5-fosfat. Slednji je nato

pretvorjen do ksantozina. Inozin pa je lahko tudi razgrajen do hipoksantina. Encim IMP dehidrogenaza uravnava sintezo nukleotidov, natančneje PRPP. Ko je v celici inozina preveč, je inhibirana glutamin-5-ribozil-1-pirofosfat amidotransferaza, zaradi česar ne poteče sinteza adenilata in gvanilata (Hedstrom, 2009).

4.8.3 Uporaba piruvata in sukcinamidne kisline

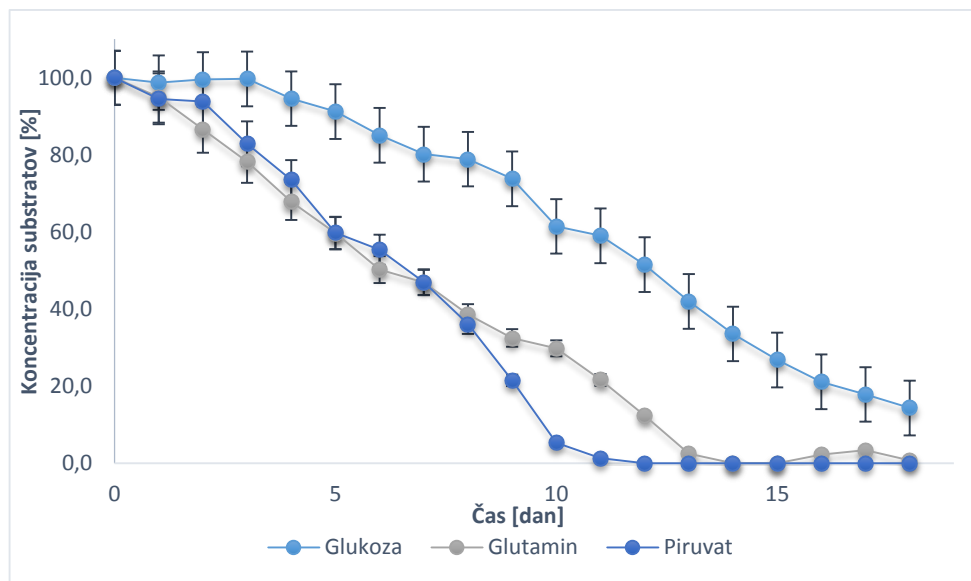
Fenotipska analiza celične linije A je pokazala, da lahko celice izmed intermediatov Krebsovega cikla izrabljajo le piruvat in sukcinamidno kislino, ko jim v rastnem gojišču zmanjka glutamina. Izvedli smo dva bioprocesa:

- **E11** - dodali smo piruvat na začetku v koncentraciji 50 % koncentracije glukoze
- **E12** - dodali smo sukcinamidno kislino na začetku v koncentraciji 50 % koncentracije glukoze



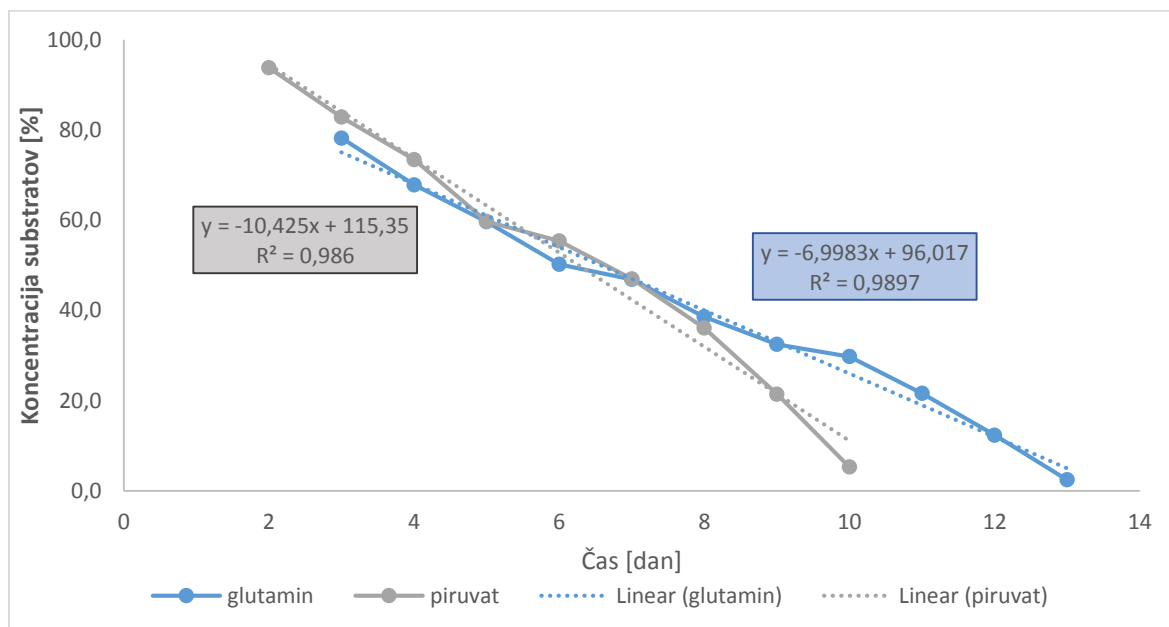
Slika 47: Rastne krivulje bioprosesov z dodanim pirvatom (E11), sukcinamidno kislino (E12) in negativna kontrola (E0)

Iz rezultatov lahko razberemo, da je dodatek piruvata v rastno gojišče deloval citostatično – rast celic se je močno upočasnila, podvojitveni čas je bil okoli 70 ur, medtem ko je bil pri negativni kontroli okrog 20 ur. Najvišja celična gostota je bila 4 milijone celic/ml šele na dan 14. V primerjavi z negativno kontrolo, pa je bioproses trajal enkrat dlje. S slike 48 je opazno, da se je metabolizem močno upočasnil – konzumacija glutamina je bila upočasnjena, piruvat se je začel porabljati na dan 3, glukoza pa na dan 5.



Slika 48: Poraba substratov v bioprocesu E11.

Na sliki 48 je razvidno, da je bila dinamika porabe glutamina in piruvata precej podobna. Da bi ugotovili, kateri substrat celice uporabljajo hitreje, smo iz grafa izvzeli linearne dele porabe substratov in jim dodali trendno črto ter enačbo, kot je razvidno s slike 49. Opazimo lahko, da je bila uporaba piruvata nekoliko hitrejša od uporabe glutamina, saj je bil naklon premice piruvata večji.

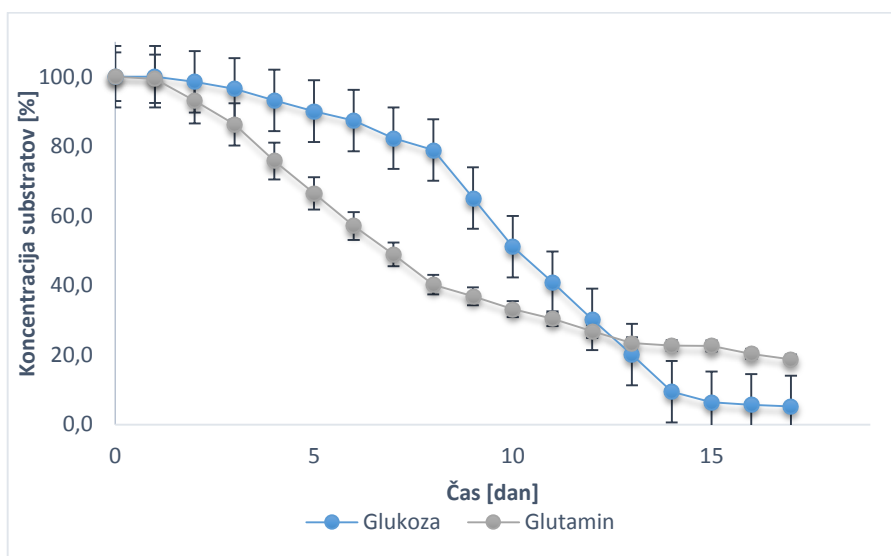


Slika 49: Dinamika porabe substratov

Podobne rezultate smo dobili tudi na bioprocesu E12, vendar je imela dodana suksinamidna kislina manjšo citostatično delovanje, kljub temu pa je podaljšala bioproces za 7 dni.

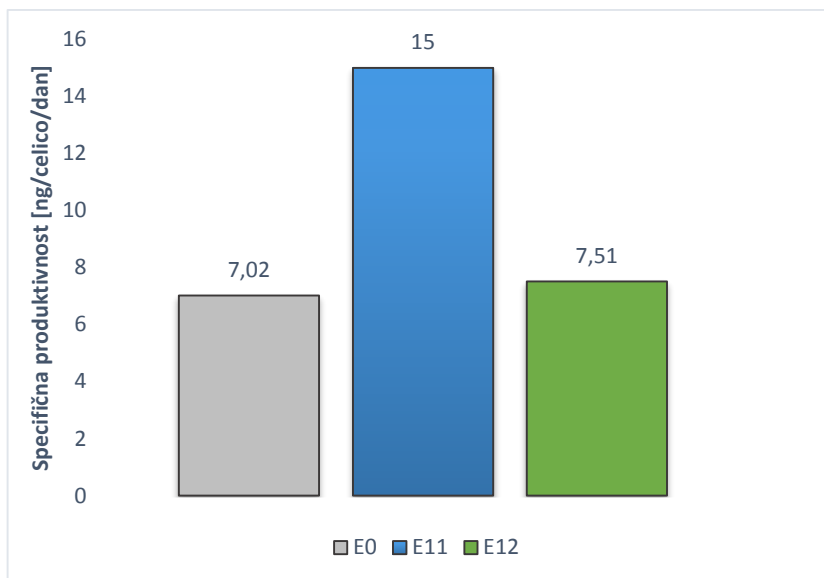
Najvišja celična gostota je bila dosežena na dan 13, ko je bilo v celični kulturi 6,3 milijona živih celic/ml.

Rezultati bioprosesov na sukcinamidni kislini so bili podobni rezultatom bioprosesov s piruvatom. Ker zaenkrat še ne obstaja metoda za merjenje sukcinamidne kisline, nismo imeli podatkov o njeni porabi v bioprosesu. Upočasnjena rast celic je bila posledica upočasnjenega metabolizma. S slike 50 je razvidno, da je bila poraba glutamina zelo nizka, celice so raje porabljale glukozo.



Slika 50: Poraba substratov v bioprosesu E12.

Na sliki 51 so prikazane specifične produktivnosti bioprosesov. Vidimo lahko, da je dodatek piruvata v rastno gojišče povečal specifično produktivnost za faktor 2. Po drugi strani pa dodatek sukcinamidne kisline ni imel izrazitega vpliva na povečanje specifične produktivnosti.



Slika 51: Specifična produktivnost bioprosesov z dodanim piruvatom (E11), sukcinamidno kislino (E12) in negativna kontrola (E0)

V literaturi do danes še nisem zasledila uporabe piruvata za povečevanje specifične produktivnosti v proizvodnji rekombinantnih glikoproteinov s pomočjo sesalskih celic. Genzel in sodelavci (2005) so uporabili piruvat kot nadomestilo za glutamin v rastnem gojišču treh različnih adherentnih celičnih linij (MDCK, BHK21, CHO-K1). Zamenjava je bila uspešna, saj je piruvat omogočal rast celic čez vseh 19 pasaž, brez upočasnitve rasti celic, manjše pa so bile tudi koncentracije laktata in amonija, ki se običajno kopičijo med bioprosesom. V naših bioprosesih je bila opazna močno upočasnjena rast celic v prisotnosti piruvata, kar bi lahko bila posledica prevelike količine dodanega substrata. Vendar smo tekom poskusa opazili, da se piruvat tudi močno porablja, zato bi bilo morda smiselno izvesti poskus, v katerem bi s piruvatom dohranjevali celice med bioprosesom. V naslednjem koraku bi bilo potrebno preveriti tudi kvaliteto proizvedenega produkta in analizirati dinamiko aminokislin tekom bioprosesa v izrabljenem gojišču. S tem bi dobili vpogled v metabolizem aminokislin in bi morda lahko sestavili dohranjevalni substrat, prilagojen metabolizmu piruvata, ki bi imel pozitiven učinek na rastne lastnosti celične linije in specifično produktivnost.

Prav tako v literaturi do danes nisem zasledila uporabe sukcinamidne kisline kot substrata za sesalske celične linije. Glede na naše rezultate ni vidnih prednosti uporabe tega substrata, vendar bi bilo smiselno vseeno preučiti kakovost pridobljenega produkta in analizirati dinamiko aminokislin tekom bioprosesa. Kljub temu, da ta substrat zaenkrat ni perspektiven, gre vseeno za intermediat Krebsovega cikla in bi v kombinaciji z drugimi substrati morda pokazal potencial.

4.9 UPORABA MIKROMREŽ ZA IZBOLJŠANJE BIOPROCESOV

V magistrskem delu smo izvedli pregled lastnosti štirih različnih celičnih linij. Analizo smo izvedli le na fenotipski ploščici PM-M1, ki vsebuje različne vire ogljika. Poleg te plošče je na voljo še 13 drugih, med njimi so za optimizacijo gojišč najbolj uporabne PM-M2, PM-M3 in PM-M4, ki vsebujejo še posamezne aminokisline in dipeptide. Že analiza fenotipa na eni sami plošči je odkrila potencial te tehnologije za proučevanje metabolizma sesalskih celičnih linij in za izboljšavo gojišč, ki bi lahko rezultirala v boljših rastnih in produkcijskih lastnostih industrijskih celičnih linij.

Rezultati fenotipizacije so nam dali veliko idej, kako bi lahko izboljšali obstoječi bioproces, vendar smo zaradi določenega obsega magistrskega dela izvedli le majhen del poskusov, ki pa so potrdili uporabnost tehnologije. Poleg uporabe galaktoze in manoze, ki je bila v literaturi že opisana, smo opazili tudi potencial uporabe nukleozidov, piruvata in sukcinamata, na mikromrežah pa je bilo opaznih še kar nekaj drugih metabolitov, ki bi jih lahko preizkusili.

Tehnologija fenotipskih mikromrež nam omogoča pregled metabolnih lastnosti kadarkoli med bioprosesom, saj zahteva le sterilno odvzeti vzorec, ki se nato centrifugira in nanese na mikrotitrsko mrežo. Tako nam omogoča spremljanje fenotipskih lastnosti med potekom bioprosesa in proučevanje odvisnosti metabolizma od inkubacijskih pogojev. Proučevali bi lahko vpliv temperaturnega in pH premika med dohranjevalnim bioprosesom na metabolizem, saj nam naprava omogoča uravnavanje temperature v inkubacijski komori. Prav tako se tehnologija lahko uporabi že po spremembi gojišča na podlagi analize, saj je povsem mogoče, da je dodaten substrat v gojišču aktiviral dodatne metabolne poti, ki so nato vidne pri ponovni analizi in nam lahko še dodatno izboljšajo gojišče.

Fenotipske mikromreže bi lahko izdelali sami. Uporabimo lahko prazne mikrotitrsko ploščice, ki jih ponuja Biolog, na katere lahko nato nanesemo substrate v različnih koncentracijah in kombinacijah. Pri tem bi bilo smiselno uporabiti statistično orodje na načrtovanje poskusov, saj je kljub temu, da ima naprava zmogljivost pregleda 50 fenotipskih mikromrež naenkrat, dela s pripravo celične kulture in ploščic veliko, če nimamo na voljo robotskega sistema.

5 SKLEPI

S pomočjo rezultatov magistrskega dela lahko potrdimo vse 4 hipoteze:

- Kljub fenotipski raznolikosti celičnih linij CHO nam je uspelo razviti ustrezen splošen protokol, ki omogoča razlikovanje med visoko sorodnimi celičnimi linijami.
- Izbrane celične linije CHO se kljub visoki sorodnosti precej fenotipsko razlikujejo v hitrosti rasti, doseganju maksimalne celične gostote, porabi substratov, proizvodnji metabolitov in sposobnosti uporabe alternativnih virov energije na fenotipskih mikromrežah PM-M1. Vir razlik je razvoj celične linije preko naključne transfekcije in selekcijski pogoji, ki vodijo v delecije, translokacije in prerazporeditve kromosomov.
- S pregledom fenotipskih lastnosti na mikromrežah PM-M1 na različne dneve bioprocesa smo ugotovili, da je metabolizem celičnih linij odvisen od koncentracije substratov v gojišču. Ko v gojišču zmanjka glutamina, so celice sposobne izkoriščati več različnih virov ogljika.
- S pomočjo tehnologije fenotipskih mikromrež lahko izboljšamo rastne in produkcijske lastnosti industrijskih celičnih linij. Izboljšanje je možno predvsem na stopnji razvoja rastnih in produkcijskih gojišč ter dohranjevalnih substratov.

Izbrana sesalska celična linija je kot alternativna vira ogljika sposobna izrabljati galaktozo in manozo, kar pa v prikazanih poskusih ni privedlo do izboljšanih rastnih in produkcijskih lastnosti. Dodatek nukleozidov v rastno gojišče poveča specifično produktivnost izbrane celične linije, vendar je potrebno preveriti kakovost dobljenega produkta. Izziv predstavlja razvoj nukleozidov v obliki dohranjevalnih substratov. Specifično produktivnost izbrane celične linije prav tako poveča dodatek piruvata v gojišče. Potrebno je preveriti dinamiko porabe aminokislin v gojišču, kar bi lahko privedlo do dodatnega izboljšanje bioprocesa. Prav tako je potrebno preveriti dodatek piruvata v različnih koncentracijah in kombinacijah z drugimi substrati v bioprocusu z dohranjevanjem.

6 POVZETEK

Več kot polovico rekombinantnih proteinov v farmacevtski industriji je proizvedenih v sesalskih ekspresijskih sistemih, med njimi največ v ovarijskih celicah kitajskega hrčka. Glavne slabosti teh sistemov so nizke celične gostote in specifične produktivnosti, v primerjavi z bakterijskimi in kvasnimi ekspresijskimi sistemi. Da bi te slabosti odpravili, se posveča precej pozornosti v razvoj produktivnejših celičnih linij, predvsem na področju rekombinantnih tehnik DNA - z izboljšanjem transfekcije, vstavitve plazmidov v transkripcijsko aktivne dele gostiteljskega kromosoma, povečanja števila kopij plazmida v gostiteljskih celicah, višje nivoje transkripcije in translacije ter prelaganja začetka apoptoze. Rast celičnih linij in produktivnost pa je precej odvisna tudi od kemijskih pogojev, ki jih omogoča ustrezno gojišče.

V nasprotju z razvojem številnih orodij za manipulacijo DNA, ki omogočajo izboljšavo bioprocsov na nivoju izboljšanja industrijskih celičnih linij, je razvoj metod spreminjanja gojišč v precejšnjem zaostanku. Če želimo prilagoditi celični liniji gojišče, ki bo omogočilo uporabo njenega celotnega potenciala, moramo poznati njen metabolizem. Večina metod za razvoj gojišč namreč temelji predvsem na slepemu mešanju že obstoječih formulacij ali na analizi izrabljenega gojišča, ki pa je omejeno s številom metabolitov, ki smo jih sposobni zaznati.

Tehnologija fenotipskih mikromrež je primeren kandidat za eno izmed orodij, ki lahko dopolni že obstoječe metode razvoja rastnih in produkcijskih gojišč. Poleg komercialno dostopnih mikromrež za sesalske celične linije, namreč omogoča tudi izdelavo lastnih mikromrež z različnimi koncentracijami in kombinacijami substratov. Medtem ko večina podobnih analiz temelji na zaznavanju rasti celične kulture, fenotipske mikromreže temeljijo na redukciji tetrazolijevih barvil, ki zaznavajo prisotnost celične respiracije ob dodatku posameznega substrata.

V magistrskem delu smo uporabili tehnologijo fenotipskih mikromrež za pregled fenotipskih lastnosti celičnih linij. Kljub njihovi visoki sorodnosti, tehnologija omogoča razlikovanje med njimi in odkriva njihov metabolni potencial. S pomočjo rezultatov smo uspeli ustvariti nove kombinacije rastnih gojišč, ki so povečala specifično produktivnost izbrane celične linije, hkrati pa smo potrdili ugotovitve, do katerih so prišli raziskovalci z drugačnimi metodami.

7 VIRI

- Altamirano C., Illanes A., Becerra S., Cairo J.J., Godia F. 2006. Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, 125: 547 - 556
- Beckman Coulter Inc. 2011. Vi-Cell XR cell viability analyzer. Reference Manual. Brea, Beckman Coulter: 98 str.
<http://www.research.usf.edu/rf/docs/vi-cell-xr-beckman-coulter.pdf> (6. julij 2014)
- Berrios J., Altamirano C., Osses N., Gonzalez R. 2011. Continuous CHO cell cultures with improved recombinant protein productivity by using mannose as carbon source: Metabolic analysis and scale-up simulation. *Chemical Engineering Science*, 66: 2431 - 2439
- Biolog Inc. 2007a. Phenotype MicroArrays™ Panels PM-M1 to PM-M14. Product descriptions and instructions for use. Hayward, Biolog Inc.: 20 str.
<http://biolog.com/pdf/pmmlit/00P134rC%20PMM%20Broch%20PM-M1%20to%20-M14.pdf> (15. junij 2014)
- Biolog Inc. 2007b. Redox dye mixes. Product descriptions and instructions for use. Hayward, Biolog Inc.: 11 str.
<http://www.biolog.com/pdf/pmmlit/00P%20133rC%20Redox%20Dye%20Mix%20Brochure%20JUL07.pdf> (25. junij 2014)
- Biolog Inc. 2014. Microbial characterization. Hayward, Biolog Inc.: 12 str.
<http://www.biolog.com/pdf/milit/00A%20024%20rB%20MicroSystemsBrochure.pdf> (24. junij 2014)
- Bochner B.R., Savageau M.A. 1977. Generalized indicator plate for genetic, metabolic and taxonomic studies with microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 2: 434 - 444
- Bochner B.R. 1989. Sleuthing out bacterial identities. *Nature*, 339: 157 - 158
- Bochner B.R. 2001. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Research*, 11: 1246 - 1255
- Bochner B.R. 2003. New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nature Reviews*, 4: 309 - 314
- Bochner B.R., Giovannetti L., Viti C. 2008. Important discoveries from analysing bacterial phenotypes. *Molecular Microbiology*, 70, 2: 274 - 280
- Bochner B.R. 2009. Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 1: 191 - 205

- Bochner B.R., Siri M., Huang R.H., Noble S., Lei X.H., Clemons P.A., Wagner B.K. 2011. Assay of the multiple energy-producing pathways of mammalian cells. *PloS One*, 6, 3: e18147, doi: 10.1371/journal.pone.0018147: 8 str.
- Chang W.E., Server K., Higgs B.W., Read T.D., Nolan N., Chapman C.E., Bishop-Lilly K.A., Sozhamannan S. 2011 PheMaDB: A solution for storage, retrieval and analysis of high throughput phenotype data. *BMC Bioinformatics*, 12: 109, doi: 10.1186/1471-2105-12-109: 7 str.
- Fraser CM, Gocayne JD, White O. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270:397 - 403
- Feng L., Vijayasankaran N., Shen A.Y., Kiss R., Amanullah A. 2010. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *Landes Bioscience*, 2 ,5: 466 - 478
- Fletcher T. 2005. Designing culture media for recombinant protein production. *Bioprocess International*, 3, 1: 2 - 7
- Gardiner D., Kazan K., Manners J.M. 2009. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 46: 604 - 613
- Guard-Bouldin J., Gast RK., Humphrey T.J., Morales C., Coles K. 2004. Subpopulation characteristics of egg-contaminating *Salmonella enterica* serovar Enteritidis as defined by the lipopolysaccharide O chain. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2756 - 2763
- Hedstrom L. 2009. IMP Dehydrogenase: Structure, mechanism and inhibition. *Chemical Reviews*, 109, 7: 2903 - 2928
- Ishii K., Green H. 1973. Lethality of adenosine for cultured mammalian cells by interference with pyrimidine biosynthesis. *Journal of Cell Science*, 13: 429 - 439
- Jabosen J.S., Joyner D.C., Borglin S.E. 2007. Visualization of growth curve data from phenotype microarray experiments. V: 11th International Conference on Information Visualization (IV07) Zürich, July 4-6 2007. Zürich, IEEE Computer Society: 1 - 10
<http://vis.lbl.gov/Publications/2007/LBNL-63251.pdf> (6.julij 2014)
- Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W.S. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103: 40 - 47
- Lee A.J., Endesfelder D., Rowan A.J., Walther A., Birkbak N.J., Futreal P.A., Downward J., Szallasi Z., Tomlinson I.P., Howel M., Kschischo M., Swanton C. 2011. Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance. *Cancer Research*, 71: 1858 - 1870
- Megazyme. 2013a. Lactose and D-galactose (Rapid) assay procedure. Wicklow, Megazyme International: 15 str.

- Megazyme. 2013b. D-mannose, D-fructose and D-glucose assay procedure. Wicklow, Megazyme International: 19 str.
- Megazyme, 2013c. Pyruvic acid assay procedure. Wicklow, Megazyme International: 10 str.
- Nova Biomedical. 2002. Bioprofile reference manual. Waltham, Nova Biomedical: 320 str.
- Nyberk G.B., Balcarcel R.R., Follstad B.D., Stephanopoulos G., Wang D.I. 1999. Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 62, 3: 324 - 335
- Stat-Ease. 2001. Design-expert 6 user's guide. Statistical details – design selection. Minneapolis, Stat-Ease Inc: 30 str.
<http://www.statease.info/dx6files/manual/DX11-Details-Design.pdf> (7. julij 2014)
- Snyder F.F., Hershfield M.S., Seegmiller J.E. 1978. Cytotoxic and metabolic effects of adenosine and adenine on human lymphoblasts. *Cancer Research*, 38: 2357 - 2362
- Sun Y., Zhao L., Zhaoyang Y., Fan L., Liu X., Tan W. 2013. Development of fed-batch cultivation for antibody-producing cells based on combined feeding strategy of glucose and galactose. *Biochemical Engineering Journal*, 81: 126 - 135
- Van Dyk TK, Templeton LJ, Cantera KA, Sharpe PL, Sariaslani FS. 2004. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve. *Journal of Bacteriology*, 186: 7196–7204
- Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 584 - 640
- Wurm F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22, 11: 1393 - 1398
- Wurm F.M., Hacker D. 2011. First CHO genome. *Nature Biotechnology*, 29, 8: 718 - 720
- Zhang J. 2010. Mammalian cell culture for biopharmaceutical production V: Manual of industrial microbiology and biotechnology. 3rd ed. Baltz R.H., Davies J.E., Demain A.L. (eds.). Washington, DC, American Society for Microbiology Press: 157 - 178
- Zhou L., Lei HX., Bochner BR, Wanner BL. 2003. Phenotype MicroArray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *Journal of Bacteriology*, 185: 4956 - 4972
- Zupan J. 2009. Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov. Ljubljana, Kemijski inštitut: 173 - 197

ZAHVALA

Zahvaljujem se podjetju Lek d.d., ki mi je omogočilo opravljanje magistrskega dela ter celotni ekipi oddelka Razvoj bioprocsov za potrpežljivost in podporo. Še posebej se zahvaljujem delovnemu mentorju Vatroslavu Spudiću za vse strokovne nasvete, komentarje, za spodbujanje raziskovalne žilice in za priložnost samostojnega dela. Hvala tudi Aleksandru Seljaku za vse učne ure, Igorju Dabižjeviću za iskrene nasvete ter Izidorju Štefančiču za nezdravo mero humorja. Še posebej velika zahvala gre dr. Juretu Strnadu, ki mi je močno olajšal spoznavanje in razumevanje statističnih metod. Čas preživet z vami je bil neprecenljiv.

Najlepša hvala tudi mentorici prof. dr. Mojci Narat za vse napotke, razlage ter popravke pri pisanju magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Poloni Jamnik za hiter in učinkovit pregled magistrskega dela ter prof. dr. Alojzu Ihanu za hiter odziv in sodelovanje.

Posebna zahvala gre mojim staršem za oporo, svetovanje, spodbujanje in nenazadnje tudi financiranje moje študijske poti. Hvala za veliko mero razumevanja ob mojem preživljanju vikendov za študijsko literaturo, daleč od doma. Hvala za potrpežljivost in prenašanje vseh mojih dobrih in slabih idej. Hvala, ker sta mi omogočila, da najdem samo sebe v tem velikem svetu. Hvala za vso ljubezen in podporo.

Sašo, hvala za neizmerno podporo in potrpežljivost, za obilico dobre volje in optimizma, ki sem ga še kako potrebovala. Brez tebe danes ne bi bila kjer sem.

HVALA

PRILOGE

PRILOGA A: Protokol za fenotipizacijo celičnih linij CHO s pomočjo mikromrež

Delo s celicami poteka v sterilni mikrobiološki komori. Za razkuževanje se uporablja sterilen 70 % izopropanol. Gojišča se segrevajo v vodni kopeli, na temperaturi 37 °C, za 1 l gojišča potrebujemo vsaj 30 min. Inkubacije potekajo v CO₂ stresalniku na temperaturi 36,5 °C, 10 % CO₂, 200 rpm, ročica 50 mm. V fazah namnoževanja celic se uporabi za celično linijo specifično rastno gojišče, v fazi priprave celic za fenotipsko analizo pa se uporabi osiromašeno gojišče Os.

1. ODTALJEVANJE CELIC

- 49 ml na 37 °C ogretega specifičnega rastnega gojišča prenesemo v SF250.
- Kriovialo prenesemo iz kriobanke v termoblok, ogret na 37 °C.
- Po 3 – 4 min v termobloku, odtaljeno kriovialo s celično kulturo prenesemo v mikrobiološko komoro. Odstranimo pokrovček in vsebino krioviale s 5 ml pipeto prenesemo v 49 ml ogretega gojišča.
- Nežno premešamo vsebino SF250 in z novo 5 ml pipeto prenesemo 1 ml celične kulture v epico.
- Epico s celično kulturo prenesemo v napravo Vi-Cell XR za določevanje koncentracije in deleža živih celic. Pri uspešnem odmrzovanju mora biti delež živih celic vsaj 80 %.
- SF250 s celično kulturo prenesemo v CO₂ stresalnik.
- Inkubiramo 4 dni, na standardnih pogojih.

2. NAMNOŽEVANJE CELIC

- Po 4 dneh namnoževanja celic, celično kulturo zopet vzorčimo (1 ml) in določimo koncentracijo celic s pomočjo naprave Vi-Cell XR.
- Po spodnji enačbi izračunamo volumen vcepka in svežega gojišča.
Zaželena koncentracija živih celic v celični kulturi je $2 \cdot 10^5$ celic/ml, končni volumen celične kulture pa 250 ml.

$$V_{\text{vcepka}} (\text{ml}) = \frac{\text{zaželena koncentracija živih celic } \left(\frac{\text{celic}}{\text{ml}}\right) \times \text{končni volumen celične kulture (ml)}}{\text{izmerjena koncentracija živih celic } \left(\frac{\text{celic}}{\text{ml}}\right)}$$

$$V_{\text{svežega gojišča}} (\text{ml}) = \text{končni volumen celične kulture (ml)} - V_{\text{vcepka}} (\text{ml})$$

- Izračunan volumen svežega rastnega gojišča, ogretega na 37 °C, prenesemo v SF1000.
- S pipeto, ki ustreza volumnu vcepka, premešamo celično kulturo in ustrezen volumen prenesemo v SF1000, katerega smo že napolnili s svežim gojiščem.
- SF1000 z novo nacepljeno celično kulturo prenesemo v CO₂ stresalnik.
- Inkubiramo vsaj 3 dni, na standardih pogojih. Trajanje inkubacije je odvisno od hitrosti rasti celic, porabe substratov in zaželene faze rasti, v kateri želimo določiti fenotip celične linije.

3. PRIPRAVA CELIC ZA FENOTIPSKO ANALIZO

- Ko želimo izvesti fenotipsko analizo celične linije, celično kulturo zopet vzorčimo (1ml) in določimo koncentracijo celic s pomočjo naprave Vi-Cell XR.
- Po zgornji enačbi zopet izračunamo volumen vcepka. Zaželena koncentracija živih celic v celični kulturi je $6,5 \cdot 10^5$ celic/ml, končni volumen celične kulture pa je odvisen od števila mikromrež, ki jih želimo napolniti. Za eno mikromrežo se običajno porabi 7 ml celične kulture, upoštevajoč rezervo in izgube pri prenosu celic.
- Izračunan volumen vcepka prenesemo iz SF1000 v 50 ml mikrocentrifugirko. Celično kulturo centrifugiramo 5 min na sobni temperaturi in 180 rpm.
- Po prvem centrifugiranju iz mikrocentrifugirke odstranimo supernatant, celično usedlino pa resuspendiramo s 40 ml na 37 °C ogretega gojišča Os.
- Resuspendirano kulturo zopet centrifugiramo, pri enakih pogojih kot prej.
- Po drugem centrifugiranju zopet odstranimo supernatant in celično usedlino resuspendiramo z ustreznim volumenom gojišča Os, ki ga potrebujemo za nacepitev mikromrež.
- V primeru, da je končni volumen večji od 50 ml, celično usedlino resuspendiramo s 40 ml ogretega gojišča Os in prenesemo v SF250. Nato dodamo preostali volumen gojišča Os.

4. NANOS CELIC NA MIKROMREŽE

- Mikromreže en dan pred uporabo prenesemo na sobno temperaturo v mikrobiološko komoro. Na dan uporabe odstranimo folijo in jih ustrezno označimo.
- Inkubator Omnilog nastavimo na temperaturo 36,5 °C.
- Pripravljeno celično kulturo v gojišču Os (v mikrocentrifugirki ali SF250) dobro premešamo in prelijemo v sterilne plastične kadičke, z volumnom 50 ali 100 ml. Če z isto kulturo polnimo več mikromrež, je smiselno celično kulturo sprti dodajati v kadičko, da se ohrani homogenost kulture.
- Celično kulturo čim hitreje s pomočjo multikanalne pipete nanesemo na mikromreže. V vsako luknjico na mikromreži dodamo 60 µl celične kulture.
- Ko je mikromreža napolnjena, jo zapremo s priloženim plastičnim pokrovčkom in prenesemo v inkubator Omnilog.
- Inkubiramo 4 ure.
- Stekleničko z barvilom MB premaknemo iz hladilnika na sobno temperaturo.

5. DODATEK BARVILA

- Po 4 urni inkubaciji, mikromreže iz inkubatorja Omnilog prenesemo nazaj v mikrobiološko komoro.
- Na sobno temperaturo segreto barvilo MB prelijemo v sterilno plastično kadičko.
- S pomočjo multikanalne pipete napolnimo mikromreže z barvilom. V vsako luknjico dodamo 10 µl barvila MB.
- Ko je mikromreža napolnjena, jo prelepimo s plastično folijo, ki preprečuje okužbe celične kulture ter izhlapevanje, hkrati pa omogoča optično odčitavanje absorbance v sistemu OmniLog.
- Tako pripravljene mikromreže prenesemo v inkubator Omnilog in jih razporedimo na ustrezna mesta. Uporabljamo nosilce 6 – 20.
- Zaženemo program Omnilog Data Collection, ki omogoča vpis podatkov o celični liniji na posameznih mestih.
- Sledi zagon optičnega branja absorbance, ki traja 24 ur, v časovnih intervalih 15 min.

PRILOGA B: Podatki pridobljeni iz bioprocesov na podlagi katerih smo izračunali podvojitvene čase, IVC in specifične produktivnosti ter izrisali grafe porabe substratov

PRILOGA B1: Rezultati poskusa E0

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Podvojitveni čas [h]
0	0,25	0,24	97,9	100	81,1	100,0	0,0	
1	0,44	0,44	98,9	98,2	71,3	96,6	0,0	27,90
2	0,86	0,85	99,2	84,6	87,9	93,1	24,6	24,74
3	1,87	1,86	99,3	68,4	100,0	85,0	55,8	21,44
4	4,24	4,22	99,6	45,6	29,5	68,2	82,6	20,23
5	8,99	8,96	99,6	15,6	34,1	37,8	100	22,11
6	14,71	14,66	99,6	0,0	32,9	26,3	86,3	33,78
7	18,07	17,88	98,9	8,8	46,2	20,1	65,3	83,74
8	17,01	16,03	94,2	1,4	53,4	4,3	17,3	-151,98
9	14,41	11,06	76,7	6,4	60,2	0,0	0,0	-44,84
10	10,42	0,34	3,3	0,0	76,9	0,0	0,0	27,90
Integral živih celic [IVC]					70552883			
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]					$7,02 \cdot 10^{-9}$			

PRILOGA B2: Rezultati poskusa E1

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Galaktoza [%]	Podvojitveni čas [h]
0	0,27	0,27	99,1	100	83,7	100	0,0	100	
1	0,45	0,44	99,3	93,7	83,5	96,2	0,0	100	32,6
2	0,85	0,84	98,9	83,2	86,2	93,6	33,4	99,6	26,1
3	1,80	1,79	99,4	66,6	100	86,8	55,5	93,7	22,0
4	3,90	3,88	99,6	44,4	30,9	74,1	80,8	99,3	21,5
5	8,09	8,06	99,6	19,4	29,6	48,5	100	90,0	22,8
6	14,08	14,03	99,7	0,0	33,2	35,3	98,1	74,8	30,0
7	17,40	17,32	99,5	0,0	35,0	27,2	83,2	59,3	79,1
8	17,30	17,11	98,9	4,4	37,0	19,1	64,0	44,5	-1336,1
9	17,03	16,22	95,2	5,8	48,3	13,7	46,3	34,9	-313,4
10	14,28	7,02	53,0	1,6	48,0	3,3	42,8	27,0	-19,9
11	8,15	2,87	27,8	8,1	61,3	18,7	5,1	20,1	-18,6
12	6,60	1,29	15,0	0,0	74,4	1,1	0,8		-20,9
13	4,10	0,12	2,9	0,0	73,0	0,0	0,0		-7,0
Integral živih celic [IVC]					717197167				
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]					$6,92 \cdot 10^{-9}$				

PRILOGA B3: Rezultati poskusa E2

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Galaktoza [%]	Podvojitev ni čas [h]
0	0,22	0,22	98,8	100	100	100	0,0	100	
1	0,41	0,40	98,3	83,6	82,9	97,4	0,0	98,3	28,05
2	0,62	0,61	98,4	73,3	94,2	91,7	20,5	92,2	39,61
3	1,29	1,28	99,3	61,1	27,3	82,3	54,0	94,7	22,29
4	2,20	2,18	99,2	43,7	32,6	65,5	75,2	94,6	31,24
5	5,56	5,54	99,7	26,8	37,1	50,3	92,9	85,5	17,86
6	10,64	10,61	99,7	7,7	44,7	28,5	100	78,9	25,61
7	14,47	14,35	99,2	2,0	53,7	6,4	73,6	67,4	55,06
8	14,39	13,67	94,9	7,3	68,1	0,0	23,9	54,7	-339,35
9	10,23	7,00	68,4	0,0	85,4	0,0	0,0	43,3	-24,89
10	7,11	1,90	24,5	0,0	108,7	2,6	0,0	38,7	-12,74
11	6,32	0,29	4,58	0,0	118,0	5,2	0,0	35,0	-8,85
Integral živih celic [IVC]						52251133			
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]						$6,37 \cdot 10^{-9}$			

PRILOGA B4: Rezultati poskusa E3

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Manoza [%]	Podvojitev ni čas [h]
0	0,23	0,23	99,6	100	73,4	100	0,0	100,0	
1	0,42	0,42	99,1	96,5	75,5	97,7	6,7	98,6	27,8
2	0,88	0,88	99,4	85,1	76,3	98,4	30,3	97,5	22,4
3	1,76	1,75	99,6	68,0	100,0	91,6	54,6	88,7	24,1
4	3,81	3,80	99,5	47,0	30,0	79,7	81,8	80,4	21,5
5	8,01	7,99	99,7	21,4	32,8	55,8	100	66,1	22,4
6	14,51	14,48	99,7	0,0	35,2	42,7	97,5	56,5	28,0
7	17,53	17,44	99,5	0,0	36,7	31,2	78,8	52,3	89,3
8	17,72	17,46	98,5	0,0	41,6	22,6	61,8	35,5	14610,5
9	16,93	15,69	92,7	7,3	46,7	16,2	51,2	16,5	-156,2
10	14,09	7,66	56,8	1,7	46,3	5,3	55,5	11,1	-23,2
11	9,80	3,27	29,3	0,0	68,5	0,8	52,0	1,5	-19,5
12	8,18	0,39	4,7	0,0	75,6	1,7	45,0	0,0	
Integral živih celic [IVC]					72156266				
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]					$6,96 \cdot 10^{-9}$				

PRILOGA B5: Rezultati poskusa E4

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Manoza [%]	Podvojitve ni čas [h]
0	0,21	0,21	99,7	100	87,9	100	0,0	100	
1	0,40	0,40	99,1	84,2	71,5	97,7	0,0	94,86	24,79
2	0,67	0,66	98,6	74,1	92,3	94,6	26,7	88,80	33,37
3	1,29	1,28	99,0	60,6	27,2	86,4	53,8	85,39	25,28
4	2,97	2,96	99,5	42,1	31,3	72,6	75,1	75,33	19,79
5	6,79	6,77	99,7	23,5	32,6	62,4	92,6	65,71	20,08
6	10,88	10,83	99,5	5,0	39,5	45,4	100,	49,12	35,40
7	15,11	14,94	98,8	6,0	45,1	29,2	85,3	30,99	51,72
8	13,73	12,48	90,9	4,9	66,3	14,6	68,1	11,78	-92,52
9	10,39	7,26	69,9	7,5	84,8	0,0	51,2	3,84	-30,73
10	6,82	0,48	7,0	3,0	100,0	2,4	55,8	0,57	-6,11
11	0,21	0,21	99,7	100	87,9	100,0	0,0		24,79
Integral živih celic [IVC]						54049466			
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]						$5,92 \cdot 10^{-9}$			

PRILOGA B6: Rezultati poskusa E5

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Podvojitve ni čas [h]
0	0,24	0,24	99,5	100	52,1	100,0	0,0	
1	0,22	0,20	91,3	99,9	93,8	96,8	0,0	-91,2
2	0,32	0,27	72,8	98,6	95,8	99,6	57,5	55,4
3	0,13	0,05	36,2	87,7	100,0	95,8	100	-9,6

PRILOGA B7: Rezultati poskusa E6

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Podvojitve ni čas [h]
0	0,21	0,21	100	100	70,8	100	0,0	
1	0,26	0,25	95,4	93,8	75,0	99,3	0,0	95,4
2	0,16	0,10	62,5	84,5	89,6	99,8	0,0	-17,8
3	0,14	0,01	36,8	74,9	100,0	98,5	100	-5,6

PRILOGA B8: Rezultati poskusa E7

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Podvojitveni čas [h]
0	0,20	0,20	99,5	100	22,7	100	0,0	
1	0,25	0,24	94,4	94,3	26,1	99,9	0,0	91,2
2	0,18	0,16	85,5	80,4	30,2	98,7	0,0	-41,0
3	0,19	0,13	68,3	74,5	32,3	99,5	13,2	-80,1
4	0,18	0,14	69,3	63,0	30,6	98,2	21,4	224,5
5	0,25	0,19	73,7	58,1	34,0	97,9	24,8	54,5
6	0,28	0,21	76,1	51,9	38,8	99,5	27,8	166,2
7	0,35	0,26	76,0	24,9	79,4	76,1	62,4	77,9
8	0,47	0,38	81,5	44,3	44,3	97,5	41,7	43,8
9	0,81	0,61	75,2	37,9	52,6	96,4	47,4	35,1
10	1,08	0,9	87,2	34,0	54,6	91,7	59,0	38,5
14	6,87	6,69	97,3	3,6	73,9	48,5	100	25,4
15	8,99	8,70	96,7	0,0	82,5	37,0	90,6	63,3
16	10,13	9,56	94,4	0,0	90,0	27,4	76,3	176,5
17	10,22	7,56	73,9	11,9	100,0	14,8	83,5	-70,9
Integral živih celic [IVC]						54049466		
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]						$5,92 \cdot 10^{-9}$		

PRILOGA B9: Rezultati poskusa E8

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Podvojitveni čas [h]
0	0,18	0,18	98,93	100	15,3	100	0,0	
1	0,25	0,25	98,77	94,0	29,2	97,9	0,0	56,1
2	0,42	0,41	98,87	85,9	31,1	96,3	23,0	32,2
3	0,59	0,56	95,80	72,1	34,2	91,6	43,4	53,7
4	0,81	0,78	96,00	59,0	40,8	88,7	61,3	50,5
5	1,09	1,03	94,33	42,0	44,8	81,1	75,8	60,8
6	1,58	1,45	91,53	32,0	57,1	76,5	83,3	48,6
7	2,06	1,83	88,87	23,4	69,9	73,2	91,5	71,5
8	2,34	1,94	82,57	14,4	100	67,1	95,0	293,6
9	2,77	2,04	73,37	14,0	98,0	61,1	100	330,4
Integral živih celic [IVC]						9363333		
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]						$29,0 \cdot 10^{-9}$		

PRILOGA B10: Rezultati poskusa E9

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Podvojitve ni čas [h]
0	0,21	0,21	100	100	14,6	100	0,0	
1	0,33	0,33	98,9	90,1	18,2	99,8	0,0	36,8
2	0,58	0,57	98,0	77,1	18,2	96,8	17,6	30,4
3	0,73	0,72	98,0	65,1	21,6	92,8	36,4	71,2
4	1,35	1,32	97,8	48,6	25,7	86,6	55,6	27,4
5	2,10	2,06	98,2	36,3	33,7	79,3	70,7	37,4
6	3,61	3,50	97,00	24,1	45,6	72,7	82,4	31,4
7	5,38	5,17	96,0	25,0	56,1	75,4	69,0	42,6
8	7,12	6,48	91,0	5,8	75,5	48,5	82,4	73,7
9	6,47	4,57	70,6	0,0	94,2	35,8	80,8	-47,6
10	5,3	2,6	49,0	6,3	100	27,1	100	
Integral živih celic [IVC]						22540000		
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]						$19,0 \cdot 10^{-9}$		

PRILOGA B11: Rezultati poskusa E10

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Podvojitveni čas [h]
0	0,24	0,24	100	100	13,1	100	0,0	
1	0,37	0,37	98,7	91,4	17,8	99,6	0,0	38,4
2	0,56	0,55	98,2	79,6	20,2	94,8	20,7	42,0
3	1,09	1,09	99,6	65,8	23,8	93,1	43,2	24,3
4	2,70	2,69	99,6	45,8	26,5	80,7	68,5	18,4
5	4,51	4,49	99,6	28,6	31,4	66,7	91,3	32,5
6	10,34	10,27	99,3	5,1	40,4	49,9	100	20,1
7	14,46	14,33	99,1	0,0	58,6	34,5	83,8	49,9
8	16,81	16,30	96,9	0,0	66,9	17,2	55,6	129,1
9	15,39	13,16	85,5	0,0	85,9	3,4	32,8	-77,7
10	12,0	7,0	58,5	4,1	100,0	0,0	19,1	
Integral živih celic [IVC]						56790000		
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]						$9,7 \cdot 10^{-9}$		

PRILOGA B12: Rezultati poskusa E11

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Piruvat [%]	Podvojitveni čas [h]
0	0,25	0,25	99,1	100	65,9	100	0,0	100	
1	0,39	0,39	99,2	95,0	66,4	98,7	0,0	94,5	36,5
2	0,56	0,55	98,4	86,6	74,8	99,5	0,0	93,8	47,3
3	0,69	0,68	98,1	78,2	89,5	99,7	0,0	82,9	80,7
4	0,85	0,84	97,9	67,9	27,6	94,6	9,3	73,5	79,1
5	0,92	0,89	96,7	59,7	30,7	91,2	21,4	59,8	265,8
6	1,15	1,11	96,5	50,2	35,1	85,1	26,0	55,4	76,4
7	1,26	1,21	95,6	46,9	45,3	80,2	36,6	47,0	186,4
8	1,51	1,43	94,8	38,6	48,7	78,9	45,8	36,1	36,10
9	1,85	1,73	93,7	32,5	70,1	73,8	62,8	21,5	88,9
10	2,34	2,19	93,5	29,8	56,2	61,4	68,8	5,3	70,1
11	2,98	2,77	92,9	21,6	64,6	59,0	86,4	1,4	71,4
12	3,63	3,37	92,7	12,4	80,8	51,5	88,3		85,2
13	4,09	3,74	91,4	2,5	74,2	42,0	91,2		157,2
14	4,66	4,00	86,0	0,0	77,1	33,5	92,2		244,7
15	4,74	3,66	77,2	0,0	83,9	26,8	89,3		-183,9
16	4,34	2,62	60,4	2,2	81,1	21,1	91,2		-50,0
17	3,95	1,76	44,7	3,4	85,9	17,9	94,3		-41,9
18	3,57	0,63	17,6	0,8	100,0	14,3	100		-16,1
Integral živih celic [IVC]						23011750			
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]						15,0 $\cdot 10^{-9}$			

PRILOGA B13: Rezultati poskusa E12

Čas [dan]	TCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	VCD [$\cdot 10^6$ celic/ml]	Delež živih celic [%]	Glutamin [%]	Glutamat [%]	Glukoza [%]	Laktat [%]	Piruvat [%]	Podvojitveni čas [h]
0	0,26	0,26	99,2	100	57,6	100	0,0	100	
1	0,38	0,37	98,6	99,4	57,6	100	0,0	94,5	48,7
2	0,55	0,54	98,2	93,1	57,6	98,5	0,0	93,8	42,9
3	0,79	0,78	98,2	86,3	61,4	96,5	0,0	82,9	46,0
4	1,02	1,00	98,5	75,8	17,5	93,2	0,0	73,5	66,1
5	1,13	1,11	98,4	66,5	18,2	90,1	9,6	59,8	158,0
6	2,16	2,13	98,5	57,1	21,1	87,4	10,2	55,4	25,6
7	2,72	2,68	98,5	48,9	22,6	82,3	26,1	47,0	72,6
8	3,36	3,30	98,2	40,2	25,6	78,9	39,1	36,1	80,4
9	4,51	4,42	97,9	36,9	36,3	65,1	51,9	21,5	56,7
10	5,28	5,10	96,7	33,2	36,9	51,1	59,2	5,3	115,7
11	6,43	6,08	94,6	30,4	46,2	40,9	75,8	1,4	95,0
12	6,85	6,24	91,1	26,8	70,8	30,2	84,4		638,8
13	7,45	6,25	83,9	23,4	77,8	20,2	91,5		7167,4
14	7,61	5,39	70,8	22,7	82,5	9,5	100		-111,7
15	7,05	2,17	30,3	22,6	82,8	6,4	94,8		-18,3
16	6,84	1,14	17,1	20,4	89,9	5,7	90,1		-25,7
17	7,18	0,48	6,7	18,8	100,0	5,2	85,1		-19,3
Integral živih celic [IVC]						42831816			
Specifična produktivnost [ng/celico/dan]						8,01 ·10 ⁻⁹			