

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Darja OBRSTAR

**PROTEOMSKA ANALIZA ODZIVA CELIČNIH LINIJ
KITAJSKEGA HRČKA (CHO) NA SPREMEMBE
FIZIKALNIH PARAMETROV GOJENJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Darja OBRSTAR

**PROTEOMSKA ANALIZA ODZIVA CELIČNIH LINIJ KITAJSGEGA
HRČKA (CHO) NA SPREMEMBE FIZIKALNIH PARAMETROV
GOJENJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**PROTEOMIC ANALYSIS OF CHINESE HAMSTER OVARY CELL
LINES (CHO) TO CHANGED PHYSICAL CULTURING
PARAMETERS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 24. seje Komisije za doktorski študij (po pooblastilu Senata Univerze 20. 1. 2009) z dne 10. 9. 2009 je bilo potrjeno, da Darja OBRSTAR, univ. dipl. inž. biokem., rojena 11. 2. 1980 v Ljubljani, izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti s področja genetike, na doktorskem Podiplomskem študiju bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje genetika. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Branka Javornik.

Doktorska disertacija je bila opravljena v Leku, farmacevtski družbi, d. d., v sodelovanju s Katedro za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica Prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član: Prof. dr. Peter Dovč
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član: Doc. dr. Bojan Doljak
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora: 23. 3. 2016

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu prek Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Darja Obrstar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 606:577.2:576.32/.36:547.963.1(043.3)
KG proteomika/CHO/pCO₂/temperatura/oksidativni stres/anaerobni metabolizem
AV OBRSTAR, Darja, univ. dipl. biokem.
SA JAVORNIK, Branka (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje genetike
LI 2016
IN PROTEOMSKA ANALIZA ODZIVA CELIČNIH LINIJ KITAJSKEGA HRČKA (CHO) NA SPREMEMBE FIZIKALNIH PARAMETROV GOJENJA
TD Doktorska disertacija
OP XII, 120 str., 9 pregl., 19 sl., 131 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo v kombinaciji z masno spektrometrijo smo analizirali proteinske vzorce treh različnih celičnih linij CHO-Der3, gojenih pri fiziološki (37 °C) in znižani (33 °C) temperaturi, ter z 10 % in 20 % parcialnega tlaka CO₂ (pCO₂). Med 72-urno kultivacijo smo spremljali koncentracijo živih celic in viabilnost celic ter koncentracijo glutamina, glukoze in laktata. Ugotovili smo, da pri obeh temperaturah gojenja zvišana vrednost pCO₂ ni vplivala na viabilnost celic, medtem ko je bila metabolna aktivnost zmanjšana. Natančneje, izračunane specifične vrednosti porabe glukoze in nastanka laktata so pokazale, da se je pri zvišani vrednosti pCO₂ metabolizem glukoze spremenil v smer manj učinkovitega anaerobnega metabolizma. Učinek zvišane vrednosti pCO₂ je bil bolj izrazit pri nižji temperaturi gojenja, pri čemer se je upočasnila tudi rast populacije celic. Proteomska analiza je potrdila občutljivost celic na zvišano vrednost pCO₂ pri znižani temperaturi gojenja, kjer smo identificirali povečano vsebnost 12. proteinov, ki sodelujejo pri odzivu celice na oksidativni stres ter 6. encimov glikolize, vključujoč encim L-laktat dehidrogenaza. Tako smo z rezultati proteomske analize potrdili preklop metabolizma glukoze na anaerobno pot izzvan z zvišanjem vrednosti pCO₂. Aktivacija antioksidativnih mehanizmov in preklop metabolizma glukoze na anaerobno pot so celicam v našem poskusu omogočili učinkovito razstrupljanje in ohranjanje energijske ravni, ter s tem ohranitev vitalnosti in funkcionalnosti. Ne glede na temperaturo gojenja se relativna vsebnost produkta v celici z zvišano vrednostjo pCO₂ ni spremenila. S študijo smo dobili globlji vpogled v proteomski odziv celic na znižano temperaturo gojenja in zvišano vrednost pCO₂.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 606:577.2:576.32/.36:547.963.1(043.3)
CX proteomics/CHO/pCO₂/temperature/oxidative stress/anaerobic metabolism
AU OBRSTAR, Darja
AA JAVORNIK, Branka (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Genetics
PY 2016
TI PROTEOMIC ANALYSIS OF CHINESE HAMSTER OVARY CELL LINES (CHO) TO CHANGED PHYSIOLOGICAL CULTURING PARAMETERS
DT Doctoral Dissertation
NO XII, 120 p., 9 tab., 19 fig., 131 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The proteome responses of three different CHO-Der3 cell lines at normal (37 °C) and reduced (33 °C) culture temperatures with normal (10 %) and increased (20 %) pCO₂ were investigated using 2D-DIGE and comparative proteomic analysis. Viable cell density, cell viability, and lactate, glutamine and glucose concentrations were monitored over 72-h cultures. At both culture temperatures the elevated pCO₂ did not affect cell viability, while metabolic activity was reduced. Furthermore, a specific metabolic profile indicated altered glucose metabolism towards less efficient anaerobic metabolism. The effects of elevated pCO₂ on metabolic activity were more pronounced at lower culture temperature where the cell growth was reduced as well. Proteomic analysis confirmed the sensitiveness of cells to increased pCO₂ at lower temperature with identification of significantly increased abundance of twelve proteins involved in anti-oxidative mechanisms, and increased abundance of six proteins involved in glycolysis, including L-lactate dehydrogenase. Proteomic results support metabolic data and the proposed pCO₂ invoked metabolic switch toward anaerobic pathways. Anti-oxidative mechanisms together with anaerobic metabolism allow the cells to detoxify while maintaining sufficient energy levels to preserve their vitality and functionality. The relative intracellular abundance of the product did not change with elevated pCO₂ at either culture temperature. This study provides further insight into the proteome responses of CHO cell lines to increased pCO₂ at the two culture temperatures.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 CELIČNE LINIJE CHO V PROIZVODNJI REKOMBINANTNIH PROTEINOV	3
2.2 VPLIV TEMPERATURE NA CELIČNE LINIJE CHO	6
2.3 VPLIVI ZNIŽANE VREDNOSTI pH NA CELIČNE LINIJE CHO	9
2.3.1 Vpliv zvišane vrednosti pCO₂	9
2.3.2 Vpliv zvišane koncentracije laktata	11
2.4 METABOLIZEM	11
2.4.1 Metabolizem glukoze in pentoza fosfatna pot	11
2.4.2 Cikel TCA in metabolizem glutamina	14
2.4.3 Oksidativna fosforilacija	15
2.5 OKSIDATIVNI STRES V CELICAH SESALCEV	18
2.6 PROTEOMSKE RAZISKAVE CELIC CHO	23
2.7 METODE LOČEVANJA PROTEINOV IN IDENTIFIKACIJA PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO	27
2.7.1 2D in 2D-DIGE	28
2.7.2 Tekočinska kromatografija (LC)	31
2.7.3 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo (MS)	32
3 MATERIAL IN METODE	34
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL	34
3.2 EKSPERIMENTALNO DELO	34
3.2.1 Opis eksperimenta	34
3.2.2 Gojenje celic in vzorčenje kulture	36
3.2.2.1 Odtalitev zamrznjenih celic in priprava vcepka	36
3.2.2.2 Gojenje celic	37
3.2.2.3 Določanje števila in viabilnosti celic	37
3.2.2.4 Merjenje koncentracije substratov glutamina in glukoze ter metabolita laktata	38
3.2.3 Priprava vzorcev za analizo 2D-DIGE	39
3.2.3.1 Priprava celičnih vzorcev za analizo 2D-DIGE	39
3.2.3.2 Izolacija proteinov iz celičnih vzorcev	40
3.2.3.3 Merjenje koncentracije proteinskih vzorcev	41
3.2.3.4 Označevanje proteinov v proteinskih vzorcih	43

3.2.4	Analiza 2D-DIGE	44
3.2.4.1	Izoelektrično fokusiranje	44
3.2.4.2	SDS PAGE	45
3.2.4.3	Slikanje gelov	46
3.2.4.4	Analiza slik gelov in statistična obdelava eksperimenta	46
3.2.5	Priprava preparativnega gela in identifikacija proteinov z masno spektrometrijo	47
3.2.5.1	Priprava preparativnega gela	47
3.2.5.2	Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo	49
4	REZULTATI	51
4.1	RASTNE KRIVULJE CELIČNIH LINIJ IN VIABILNOST CELIC	51
4.2	PRIMERJAVA PORABE SUBSTRATOV IN PRODUKCIJE METABOLITA	53
4.2.1	Primerjava metabolizma glede na trend spremenjanja vrednosti glutamina, glukoze in laktata	53
4.2.2	Primerjava specifičnih vrednosti porabe glukoze in glutamina ter produkcije laktata	55
4.3	MERITVE KONCENTRACIJ PROTEINOV	57
4.4	ANALIZA SLIK GELOV IN STATISTIČNA OBDELAVA EKSPERIMENTA	59
4.4.1	Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 37 °C	60
4.4.2	Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 33 °C	61
4.4.3	Splošna primerjava odziva celic vseh 12 eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO₂	63
4.5	IDENTIFIKACIJA PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO	65
4.6	IDENTIFICIRANI PROTEINI NA PODLAGI STATISTIČNE OBDELAVE EKSPERIMENTA	70
4.6.1	Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 37 °C	70
4.6.2	Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 33 °C	71
4.6.3	Splošna primerjava odziva celic vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO₂	72
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	75
5.1	RAZPRAVA	75
5.1.1	Rast populacije celic, viabilnost celic in metabolna aktivnost celičnih linij pri spremenjenih fizikalnih parametrih gojenja, temperatura in pCO₂	75
5.1.1.1	Rast populacije celic in viabilnost celic	75
5.1.1.2	Metabolizem celic	76
5.1.1.3	Povzetek hitrosti rasti populacije, viabilnosti in metabolizma celic	79

5.1.2	Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 37 °C	80
5.1.2.1	Relativna vsebnost rekombinantnega mAb v celici pri 37 °C in zvišani vrednosti pCO ₂	81
5.1.2.2	Povzetek odziva celic na zvišano vrednost pCO ₂ pri 37 °C	81
5.1.3	Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 33 °C	82
5.1.3.1	Oksidativni stres	83
5.1.3.2	Glikoliza in PFP	88
5.1.3.3	Drugi proteini	91
5.1.3.4	Relativna vsebnost rekombinantnega mAb v celici pri 33 °C in zvišani vrednosti pCO ₂	93
5.1.3.5	Povzetek odziva celic na zvišano vrednost pCO ₂ pri 33 °C	93
5.1.4	Splošna primerjava odziva celic vseh dvajstih eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO₂	94
5.1.4.1	Primerjava odziva celic glede na temperaturo gojenja	94
5.1.4.2	Primerjava odziva celic glede na zvišano vrednost pCO ₂	96
5.1.4.3	Primerjava odziva celic glede na povezani vpliv temperature gojenja in vrednosti pCO ₂ (interakcija)	96
5.1.4.4	Povzetek odziva celic vseh dvajstih eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO ₂	96
5.2	SKLEPI	97
6	POVZETEK (SUMMARY)	100
6.1	POVZETEK	100
6.2	SUMMARY	105
7	VIRI	110
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Preglednica za pripravo standardne krivulje.	41
Preglednica 2: Specifična poraba glukoze in glutamina ter specifična produkcija laktata pri treh celičnih linijah in štirih pogojih gojenja.	56
Preglednica 3: Rezultati meritev koncentracije proteinov v vzorcih.	58
Preglednica 4: Seznam identificiranih proteinov.	67
Preglednica 5: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen pri temperaturi gojenja 37 °C glede na vrednost pCO ₂ (10 % in 20 %), in tistih, katerih relativni povprečni volumen signala ni statistično značilno različen pri isti temperaturi gojenja glede na vrednost pCO ₂ , vendar so predmet diskusije.	70
Preglednica 6: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen pri temperaturi gojenja 33 °C glede na vrednost pCO ₂ (10 % in 20 %), in tistih, katerih relativni povprečni volumen signala ni statistično značilno različen pri isti temperaturi gojenja glede na vrednost pCO ₂ , vendar so predmet diskusije.	71
Preglednica 7: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen glede na temperaturo gojenja (37 °C in 33 °C).	73
Preglednica 8: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen glede na vrednost pCO ₂ (10 % in 20 %).	74
Preglednica 9: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen glede na interakcijo temperature gojenja (37 °C in 33 °C) in vrednosti pCO ₂ (10 % in 20 %).	74

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz glikolize in cikla PFP.	12
Slika 2: Shematski prikaz cikla TCA in glutaminolize.	15
Slika 3: Shematski prikaz dihalne verige.	17
Slika 4: Shematski prikaz posledic oksidativnega stresa.	18
Slika 5: Siteza glutationa.	19
Slika 6: Ciklični mehanizem redukcije preko GSH v mitohondriju.	20
Slika 7: Osnovna shema antioksidativnega mehanizma GSH.	21
Slika 8: Shema antioksidativnih sistemov GSH in Trx v sesalskih celicah.	22
Slika 9: Shematski prikaz poteka 2D EF.	29
Slika 10: Shematski prikaz 2D-DIGE.	31
Slika 11: Shematski prikaz pasiranja in vzorčenja celičnih kultur med izvedbo eksperimenta.	35
Slika 12: Shematski prikaz obsega eksperimenta.	36
Slika 13: Koncentracija živih celic in viabilnost celic po dnevih za vse tri celične linije.	52
Slika 14: Koncentracija laktata, glutamina in glukoze v gojišču po 72 h gojenja.	54
Slika 15: Proteinski profil treh različnih celičnih linij: a) starševska celična linija CHO-Der3; b) celična linija mAb CHO-Der3 in c) celična linija mAb CHO-Der3-MTX.	59
Slika 16: Grafični prikaz rezultatov analize PCA šestih eksperimentalnih skupin, ki predstavljajo tri različne celične linije, gojene pri 37 °C in dveh različnih vrednostih pCO ₂ .	60
Slika 17: Grafični prikaz rezultatov analize PCA šestih eksperimentalnih skupin, ki predstavljajo tri različne celične linije, gojene pri 33 °C in dveh različnih vrednostih pCO ₂ .	62
Slika 18: Grafični prikaz rezultatov analize PCA dvanajstih eksperimentalnih skupin, ki predstavljajo tri različne celične linije, gojene pri štirih različnih pogojih.	64
Slika 19: Reprezentativna slika analitskega gela.	65

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2D EF	dvodimenzionalna elektroforeza
2D-DIGE	dvodimenzionalna diferencialna elektroforeza
ANOVA	analiza variance
ATP	adenozin trifosfat
BLAST	lastno iskalno orodje za primerjavo zaporedij (Basic Local Alignment Search Tool)
BSA	goveji serumski albumin
BVA	modul programske opreme DeCyder za analizo biološke variacije
CBB	barvilo Coomassie Brilliat Blue
cDNK	ciklična DNK
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonijev]-1-propansulfonat
CHO <i>Der3</i>	sev (derivat) celične linje CHO
CHO	celična linija ovarijskih celic kitajskega hrčka
CO ₂	ogljikov dioksid
CoA	koencim A
CoQ	koencim Q
CV	koeficient variabilnosti
Cy	cianinsko fluorescentno barvilo
Da	dalton
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
Dhfr	dihidrofolat reduktaza
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
EDA	modul programske opreme DeCyder za analizo podatkov
EPO	eritropoetin
ER	endoplazemski retikulum
ESI	ionizacija z elektrorazprševanjem
FAD	flavin adenine dinukleotid
FADH ₂	flavin adenine dinukleotid hidrokinon
FASTA	programska oprema za prileganje zaporedij DNK in proteinov
FT-ICR	ionsko ciklotronska resonanca s Fourierjevo transformacijo
GE	General Electrics
GHT	glicin, hipoksantin in timidin

GPx	peroksidaza GSH
GR	reduktaza GSSH
Grx	glutaredoksin
GS	glutamin sintetaza
GSH	glutation
GSSG	disulfid GSH (oksidirana oblika GSH)
GST	GSH-S-transferaza
H ⁺	vodikov proton
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HC	težka veriga monoklonskega protitelesa
HSP	protein toplotnega šoka
IEF	izoelektrično fokusiranje
IPG	imobiliziran pH-gradient
IT	ionska past
IVCC	integrirana koncentracija živih celic
kDa	kilo dalton
LC	lahka veriga monoklonskega protitelesa
LC	tekočinska kromatografija
mAb	monoklonsko protitelo
MALDI	ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem
mRNK	pranašalna RNK
MS	masna spektrometrija, masni spektrometer
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
Msr	metionin sulfoksid reduktaza
MSX	metionin sulfoksid
MTX	metotreksat
M _w	molekulska masa
NaBu	natrijev butirat
NAD ⁺	nicotinamid adenin dinukleotid, oksidirana oblika
NADH	nicotinamid adenin dinukleotid, reducirana oblika
NADP ⁺	nicotinamid adenin dinukleotid fosfat, oksidirana oblika
NADPH	nicotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirana oblika
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NCBI	Nacionalni center za biotehnološke informacije
NL	nelinearno
O ₂	kisik
OH ⁻	hidroksi radikal

PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCA	analiza glavnih komponent
pCO ₂	parcialni tak ogljikovega dioksida
PFP	pentoza fosfatna pot
pH	merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini
pI	izoelektrična točka
pO ₂	parcialni tak kisika
CSP	protein hladnega šoka
Prx	peroksiredoksin
RNK	ribonukleinska kislina
ROS	reakтивne kisikove spojine
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti SDS-a
SOD	superoksid dismutaza
SPEG	ekstrakcija glikopeptidov na trdni fazi
Std	standard
TCA	Krebsov cikel ali cikel citronske kisline
TOF	čas preleta
tPA	plazminogen aktivator
Trx	tioredoksin
TrxR	tioredoksin reduktaza
UTP/UDP-GNAc	uridin trifosfatom in uridin difosfat–N-acetilheksozamin

1 UVOD

V proizvodnji rekombinantnih terapevtskih proteinov se najpogosteje uporabljo evkariotske celične linije, katerih produkti so z vidika posttranslacijskih modifikacij najustreznejši za humano uporabo. Najpogosteje uporabljen sesalski proizvodni ekspresijski sistem so celice CHO, pri katerih je celoten proces razvoja rekombinantne celične linije dobro vpeljan in okarakteriziran. Celice CHO so varen produksijski sistem, saj ne vsebujejo humanih virusov, vnos rekombinantnih genov v genom celic CHO je relativno preprost, poleg tega pa so celice pri različnih manipulacijah in gojenju robustne in hitrorastoče. Dodatna in nezanemarljiva prednost sta tudi njihova dolgoletna uporaba in zgodovina regulatornih odobritev.

Celične linije CHO se navadno gojijo pri fiziološki temperaturi 37 °C. V zadnjih letih se omenjene celične linije čedalje pogosteje goji pri subfizioloških temperaturnih pogojih (< 37 °C), saj je bila večkrat dokazana pozitivna korelacija med gojenjem celičnih linij CHO pri nižjih temperaturah in zvišano produktivnostjo rekombinantnega proteina. Gijkenje celic pri subfizioloških temperaturnih pogojih rezultira v podaljšanem celičnem ciklu, predvsem faze G1, zakasniti apoteze, ohranjanju velikega deleža živih celic v daljšem časovnem obdobju, upočasnjeni metabolni aktivnosti ter zaželeni večji produkciji rekombinantnega proteina. Nižja temperatura gojenja je neposredno in neizogibno povezana tudi s spremembami topnosti plinov ter tako s spremenjenimi vrednostmi raztopljenih plinov v gojišču, predvsem z metabolnega vidika ključnih, kisika (pO_2) in ogljikovega dioksida (pCO_2).

CO_2 je stranski produkt metabolizma in končni produkt dihanja celic. V normalnih okoliščinah CO_2 prosto difundira iz celic ter se iz njih izloča kot plin. Pri celičnih kulturah z veliko gostoto celic in še posebno v velikih (proizvodnih) volumnih gojenja, kjer je prezračevanje in odstranjevanje plinov tehnološko zahtevnejše, se CO_2 akumulira v gojišču in celicah. Posledica zvišane vrednosti pCO_2 je nižja vrednost pH-gojišča in nižja intracelularna vrednost pH ter posledično nižja vrednost pH v celičnih organelih, kot na primer v endoplazemskem retikulumu in Golgijskem aparatu. Dodaten dejavnik, ki vpliva na (še) zvišano vrednost pCO_2 ali osmolalnost, je uravnavanje vrednosti pH v kulturi. V primeru zniževanja vrednosti pH v kulturi se namreč najpogosteje dodaja plinasti CO_2 , kar zviša vrednost pCO_2 v kulturi, ob zniževanju vrednosti pH v kulturi pa se dodaja baza, ki dodatno povzroči zvišanje osmolalnosti. Omenjeni dejavniki, znižana vrednost pH v celici, zvišana vrednost pCO_2 in osmolalnosti v kulturi ter njihove kombinacije vplivajo na celični metabolizem ter procesiranje in izločanje proteinov, kar se kaže v upočasnjeni rasti

populacije celic, znižani viabilnosti celic (t. j. zmanjšanem deležu živih celic v kulturi) in zmanjšani produkcijski rekombinantnih proteinov.

2D-DIGE je uveljavljena in zanesljiva metoda za primerjavo celičnih odzivov na proteinski ravni. V zadnjem desetletju je bila uspešno uporabljena pri primerjavi odzivov celic na spremenjene pogoje okolja.

Raziskovalne hipoteze

Na osnovi raziskave pričakujemo odgovore na naslednje predpostavke:

- da različne T-gojenja in vrednosti pCO₂ v kulturah celičnih linij CHO **vplivajo na razlike v parametrih rasti,**
- da različne T-gojenja in vrednosti pCO₂ v kulturah celičnih linij CHO **vplivajo na različno izražanje proteinov,**
- da različne T-gojenja in vrednosti pCO₂ v kulturah celičnih linij CHO **vplivajo na razlike v metabolnih poteh.**

Skladno z raziskovalnimi hipotezami naloga zajema:

- gojenje treh celičnih linij CHO pri različnih temperaturah (33 °C in 37 °C) in vrednostih raztopljenega CO₂ (10 % in 20 %),
- spremeljanje parametrov rasti (koncentracije živih celic in viabilnosti celic), koncentracije substratov (glukoze in glutamina) in koncentracije metabolita (laktata),
- izvedbo analize 2D-DIGE in proteomsko analizo proučevanih eksperimentalnih skupin z uporabo statističnih orodij,
- identifikacijo proteinov z masno spektrometrijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELIČNE LINIJE CHO V PROIZVODNJI REKOMBINANTNIH PROTEINOV

Zaradi ustreznih posttranslacijskih mehanizmov se za proizvodnjo rekombinantnih terapevtskih proteinov najpogosteje uporablja evkariotske celične linije. Celice CHO so postale najpogosteje uporabljen proizvodni ekspresijski sistem, pri katerem je tehnologija transfenkcije, amplifikacije in selekcije klena dobro vpeljana in okarakterizirana (Butler in sod., 2005). Dodana vrednost celic CHO je poleg ustreznih posttranslacijskih modifikacij izraženih proteinov in dobre okarakteriziranosti tehnologije tudi varnost, saj ne vsebujejo humanih virusov. Vnos rekombinantnih genov v genom celic CHO je razmeroma lahek, celice so pri različnih manipulacijah pri gojenju robustne in hitrorastoče. Nezanemarljivo vlogo igrata tudi njihova dolgoletna uporaba in zgodovina regulatornih odobritev (Hammond in sod., 2011).

Po uspešnem vnosu rekombinantnih genov v genom v celice sledita identifikacija in selekcija celic, ki so sposobne proizvodnje velikih količin rekombinantnega proteina. Selekcija temelji na povezavi izraženega seleksijskega označevalca in gena želenega (rekombinantnega) produkta ter uporabi različnih seleksijskih strategij, ki zavirajo oziroma zmanjšajo zmožnost izražanja označevalskega gena v primerjavi z genom želenega produkta. Sesalski seleksijski označevalci, ki se uporabljajo tudi pri celičnih linijah CHO in jih v celice vnesemo skupaj z genom za rekombinantni protein, z istim ali dodatnim vektorjem, se delijo na dominantne in recessivne. Dominantne seleksijske označevalce predstavljajo pretežno bakterijski geni, ki omogočajo odpornost proti različnim antibiotikom (npr. rezistenčni geni proti neomicinu, higromycinu in puromycinu). Z večtedenskim postopnim zviševanjem koncentracije antibiotika preživijo le celice, pri katerih je izražanje genov za odpornost večje, kar pomeni, da se z veliko verjetnostjo v teh celicah dobro izraža tudi želeni protein. Recessivne seleksijske označevalce predstavljajo geni za encime ali proteine, ki so nujni za preživetje celice, vendar jih gostiteljska celica nima ali pa so bili z različnimi genetskimi manipulacijami inaktivirani. Potrebne elemente za preživetje dobi celica iz gojišča, če pa teh v gojišče ne vključimo, preživijo le tiste celice, ki so označevalski gen skupaj z genom za želeni rekombinantni protein prejeli s transfekcijo. Primera najpogosteje uporabljenih recessivnih seleksijskih označevalcev sta encima dihidrofolat reduktaza (DHFR) in glutamin sintetaza (GS) (Shen in sod., 2006).

Celice CHO/*dhfr*^r omogočajo pomnoževanje števila kopij gena želenega proteina s pomočjo označevalca DHFR, ki ima tudi seleksijsko vlogo (seleksijski označevalec). Encim DHFR katalizira pretvorbo folne kisline v tetrahidrofolat, ki ima ključno vlogo pri biosintezi glicina, purinov in timidilne kisline. Pomanjkanje tetrahidrofolata oziroma

nezmožnost omenjene pretvorbe vodi v neustrezno sintezo DNK ter posledično v smrt celice. Celice CHO/*dhfr* potrebujejo za preživetje gojišče, ki vsebuje glicin, vir purinov, npr. hipoksantin, ter timidin (GHT). Avksotropnost celic za omenjene amiokisline je že sama selekcijski sistem, ki omogoča pridobitev stabilnih celičnih klonov, ki vsebujejo gen za rekombinantni protein in gen *dhfr*. V prvi fazi se kultivirajo mutantne celice, ki nimajo encimske aktivnosti DHFR, v gojišču, ki vsebuje GHT. Po transfekciji celic s funkcionalnim ekspresijskim vektorjem za DHFR se lahko v gojišču brez GHT selekcionirajo celice, ki so s transfekcijo pridobile funkcionalni gen za DHFR (Cacciatore in sod., 2010). V drugi fazi dela s celičnimi kulturami za povečanje izražanja rekombinantnega proteina celice izpostavimo učinkovanju metotreksata (MTX), folatnemu derivatu, ki popolnoma in ireverzibilno blokira aktivnost DHFR. Dodatek MTX, inhibitorja DHFR, pomeni dodaten selekcijski pritisk, poleg tega pa spodbudi pomnoževanje gena *dhfr* ter hkrati z njim pomnoževanje gena za rekombinantni protein (Zagari, 2012). V dveh do treh tednih izpostavljenosti MTX večina celic odmre, nekaj celic, ki vsebujejo veliko število integriranih kopij ekspresijske kasete z genom *dhfr*, pa je zaradi relativno večjih količin encima DHFR odpornih proti MTX. Zaradi visoke koncentracije MTX, ki omejuje celično rast, se namreč število genov za DHFR pomnožuje. Preživetje celic pomeni, da so te celice prejele ekspresijsko kaseto z zapisom za DHFR, da so sposobne izražanja ustrezne mRNK in da lahko prenašajo pridobljene informacije na potomce. Ugotovili so, da odporne celice vsebujejo večje število kopij zaporedja plazmida, vključenih v kromosome, kot celice pred izpostavljanjem MTX. Večkratno izpostavljanje celic s postopnim zviševanjem koncentracije MTX vodi do izolacije celic, ki vsebujejo močno povečano število kopij heterolognih genov. Selekcijski sistem z DHFR in pomnoževanje števila kopij heterolognega gena z MTX je najuspešnejše v celicah, ki pred transfekcijo ne vsebujejo endogenega *dhfr*, čeprav je mogoče na ta način pomnoževati integrirani ekspresijski vektor tudi v celicah, ki vsebujejo omenjeni gen oziroma je aktiven (Wurm, 1990; Wurm, 1999).

Današnje celične linije CHO izvirajo iz fibroblastom podobnih celic, ki so bile leta 1958 izolirane iz ovarija kitajskega hrčka (Puck in sod., 1958). S subkloniranjem je bila najprej ustvarjena celična linija CHO-K1, pozneje z mutagenezo pa še celični liniji CHO-DXB11 in DG44. Prva vsebuje delekcijo enega, druga pa delekcijo obeh alelov dihirofolat reduktaze (Zagari, 2012).

Poleg omenjene selekcijske strategije se pri celičnih linijah CHO pogosto uporablja tudi strategija, ki temelji na izražanju gena za glutamin sintetazo (GS). Encim GS katalizira sintezo glutamina iz glutamata in amonijaka. Omenjeni selekcijski označevalec se je prvotno in se še vedno najpogosteje uporablja v mielomskih celičnih linijah, npr. NS0. Sistem podobno kot v primeru celic CHO/*dhfr* temelji na avksotropni lastnosti celic; celice NS0 so auksotropne za glutamin in se jih selekcionira v gojišču brez glutamina. Pri uporabi

selekcijskega označevalca GS pri celičnih linijah CHO, ki vsebujejo endogeni zapis za GS, integracija rekombinantnega gena in njegova amplifikacija temeljita na uporabi inhibitorja GS metionin sulfoksida (MSX). Predhodna mutacija celic CHO torej ni potrebna, poleg tega je v primerjavi s celičnimi linijami, pridobljenimi s selekcijskim označevalcem DHFR, produkcija celičnih linij večja že pred pomnoževanjem gena. Vzrok, da se kljub temu pri celičnih linijah CHO pogosteje uporablja selekcijski označevalec DHFR, je v produksijski nestabilnosti celičnih linij, pridobljenih s selekcijskim označevalcem GS (Cacciatore in sod., 2010). V zadnjem času postaja selekcijski označevalec GS zanimivejši za uporabo pri celičnih linijah CHO, saj v gojišču ni potreben dodatek glutamina, zato je akumulacija amonijaka, produkta razgradnje aminokislin, v kulturi manjša (Seth in sod., 2006; Zagari, 2012).

Zaradi široke uporabe so celične linije CHO že desetletja predmet raziskav z namenom optimizacije gojenja, zvišanja produktivnosti rekombinantnega proteina, izboljšanja ustreznosti profila glikozilacijskih struktur rekombinantnega proteina ter poznavanja njihovega metabolizma in metabolnih odzivov med bioprocесом. Med najpogostejšimi strategijami za zvišanje produktivnosti rekombinantnega proteina sta celični inženiring in podaljševanje živosti celic. Pri zadnjem se predvsem z optimizacijo gojišča in dodatki gojišču poskuša preprečevati negativne vplive limitirajočih komponent in metabolnih produktov, ki se med gojenjem celic akumulirajo v kulturi (Ma in sod., 2009). Eden izmed načinov zvišanja produktivnosti s posrednim podaljševanjem celičnega cikla je gojenje celic pri nižjih temperaturah. Vpliv temperature na celične linje CHO je bil v preteklosti že precej raziskan (Moore in sod., 1997; Kaufman in sod., 1999; Fogolin in sod., 2004; Yoon in sod., 2003a, 2003b). Nižja temperatura gojenja vpliva na celice neposredno in posredno. Z znižanjem temperature se topnost plinov v celičnem gojišču namreč zviša, spremeni se parcialni tlak plinov, to pa v primeru kisika vpliva na oksidativno stanje aerobnih celičnih kultur (hiperoksija) ter je v primeru ogljikovega dioksida povezano z njegovo akumulacijo v kulturi in posledičnim (negativnim) vplivom na celice (Zanghi in sod., 1999; Kumar in sod., 2007).

2.2 VPLIV TEMPERATURE NA CELIČNE LINIJE CHO

Fiziološka temperatura celic CHO je 37 °C, kar je tudi temperatura, pri kateri se celične linije CHO običajno gojijo. V zadnjih letih je bila večkrat dokazana pozitivna korelacija med gojenjem celičnih linij CHO pri nižjih temperaturah in zvišano produktivnostjo rekombinantnega proteina, zato se čedalje pogosteje omenjene celične linije gojijo pri subfizioloških temperturnih pogojih (< 37 °C). Glavne posledice gojenja celic pri subfizioloških temperturnih pogojih so podaljšan celični cikel, predvsem faza G1, zakasnitev apoptoze, ohranjanje velikega deleža živih celic (visoka viabilnost) v daljšem časovnem obdobju, upočasnjenja metabolna aktivnost ter že omenjena večja produkcija rekombinantnega proteina. Vpliv nižjih temperatur je povezan tudi s spremembami raztopljenih plinov v gojišču, predvsem kisika (pO_2) in ogljikovega dioksida (pCO_2).

Yoon in sod. (2003b) so poročali, da se je pri kultivaciji rekombinantnih celic CHO, ki proizvajajo eritropoetin, pri 33 °C specifična produktivnost eritropoetina v primerjavi s kultivacijo pri 37 °C zvišala več kot 2,5-krat. Ugotovili so, da je razlog za zvišanje specifične produktivnosti poleg podaljšane živosti celic ter upočasnjenega sproščanja proteolitičnih encimov predvsem povečana transkripcija rekombinantnega proteina. Pri temperaturi gojenja 30 °C tovrstni učinek ni bil opažen. Prav nasprotno, produktivnost celic je bila pri tej temperaturi najnižja. Isti avtor s sodelavci je pozneje poročal o rekombinantni celični liniji CHO, ki proizvira monoklonsko protitelo (mAb), in poudaril, da so nižje temperature gojenja upočasnile rast populacije celic, ustavile celični cikel v fazi G0/G1 in povečale viabilnost celic za daljše obdobje, specifična produktivnost pa v tem primeru ni bila zvišana. Ugotovili so, da je pozitiven vpliv znižane temperature kultivacije odvisen od celične linije, in to pozneje potrdili z raziskavo na dvajstih celičnih klonih. Specifična produktivnost je bila pri nižji temperaturi v osnovi višja, vendar s precejšnjimi razlikami med celičnimi kloni (v razponu od 4- do 25-krat) (Yoon in sod., 2003b, 2004). Pozitiven učinek znižane temperature gojenja na zvišano produktivnost celic CHO je bil, v ločenih študijah, opažen tudi v primeru rekombinantnih proteinov interferona-γ (pri temperaturi gojenja 32 °C) (Fox in sod., 2004) in humanega granulocit-stimulirajočega faktorja makrofagnih kolonij (pri temperaturi gojenja 33 °C) (Fogolin in sod., 2004). V zadnjem primeru je bil opažen učinek povezan s povečano pretvorbo piruvata, produkta glikolize, v malat, s pomočjo rekombinantne malat karboksilaze (povezava glikolize in cikla TCA). Producisce celice pogosto glukoze ne oksidirajo popolnoma do CO_2 in H_2O (aerobni metabolizem), ampak pretvorijo del piruvata v laktat (anarobni metabolizem), posledica pa je neoptimalni energijski izkoristek glukoze in akumulacija laktata v celicah. Pretvorba dela piruvata v malat, posledično pospešen cikel TCA, in popolna oksidacija glukoze za celico pomenita boljši metabolni energijski izkoristek. Podobno so zvišano produktivnost na podlagi povečanega vstopa piruvata prek malata v cikel TCA opazili tudi

pri hibridomskih kulturah. V tem primeru so z delno poškodbo gena za laktat dehidrogenzeno A zmanjšali pretvorbo piruvata v laktat in tako pospešili vstop piruvata prek malata v cikel TCA (Chen in sod., 2000).

Glede na literaturo so bili pri kultivaciji sesalskih celic pri nižjih temperaturah opaženi naslednji pojavi: upočasnjeni rast populacije celic (Fogolin in sod., 2004), podaljšana stacionarna faza celičnega cikla (Fogolin in sod., 2004), vzdrževanje viabilnosti celic v daljšem obdobju (Yoon in sod., 2003b), zmanjšana poraba glukoze in glutamina, upočasnjeno sproščanje proteolitičnih encimov in odpadnih produktov metabolizma (Yoon in sod., 2003b), upočasnjene metabolne poti in časovno odložena apoptoza (Moore in sod., 1997). Fogolin in sod. (2004) so dodatno poročali, da je bila koncentracija celičnega ATP po znižanju temperature gojenja celic CHO sicer zvišana, vendar je skupna energijska bilanca ostala nespremenjena. Upočasnjeno rast populacije in nespremenjeno viabilnost celic CHO pri znižani temperaturi gojenja (30°C) so Moore in sod. (1997) razložili z upadom celične delitve in ustavitevijo celic v fazi G1 celičnega cikla, kar se je pokazalo tudi v znižanju razmerja med uridin trifosfatom in uridin difosfat–N-acetilheksozaminom (UTP/UDP-GNAc). Poraba kisika se je zmanjšala, energijska bilanca celic in koncentracija ATP pa sta ostali nespremenjeni, kar so povezali z upočasnjениm metabolizmom celic.

Na splošno je torej metabolna aktivnost celic, gojenih pri nižjih temperaturah, manjša, v primerjavi z metabolno aktivnostjo celic, gojenih pri 37°C . Zanimivo pa je, da je bil v primeru rekombinantnih celic CHO, ki producirajo eritropoetin, opažen obraten pojav: metabolna aktivnost celic, gojenih pri 33°C , je bila večja kot pri tistih, gojenih pri 37°C (Yoon in sod., 2003b), kar kaže, da je tudi vpliv temperature na metabolno aktivnost odvisen od celične linije ali celičnega klena.

Vpliv nižjih temperatur na metabolno aktivnost celic je nujno povezan tudi s spremembami raztopljenega kisika v kulturi, saj so plini pri nižjih temperaturah bolj topni (Chuppa in sod., 1997; Jan in sod., 1997). Ker sta dejavnika tesno povezana, je težko oziroma skoraj nemogoče ločiti posledice vpliva znižane temperature, skupaj z nastalimi hiperoksičnimi pogoji, od posledic zgolj znižane temperature (Al-Fageeh in sod., 2005). Nasprotno pa se po ponovnem zvišanju temperature koncentracija raztopljenega kisika zniža, kar vodi do hipoksičnih pogojev v celični kulturi in celicah. Predvidevajo celo, da je odziv celic na nižje temperature gojenja in hipoksijo podoben z vidika izražanja obeh glavnih proteinov hladnega šoka (cold shock protein, CSP), RBM3 in CIRP (Wellman in sod., 2004; Al-Fageeh in sod., 2005).

Zaradi ugodnega vpliva nižjih temperatur gojenja celičnih kultur CHO na produktivnost in posledično čedalje pogostejo kultivacijo celičnih linij CHO pri nižjih temperaturah je bil vpliv znižane temperature na fiziologijo in metabolizem sesalskih celic v zadnjih letih raziskan tudi na genomskem, transkriptomskem in proteomskem nivoju.

Na splošno naj bi nižje temperature gojenja, v nasprotju z višjimi, povzročile zmanjšano aktivnost encimov, difuzijo in membranski transport. Zanimivo je, da je odgovor celic na nizke temperature fiziološko podoben odgovoru na visoke temperature in zajema: i) povečano degradacijo in agregacijo proteinov, ii) upočasnjen celični cikel, predvsem faza G1, iii) inhibicijo transkripcije in translacije ter posledično sinteze proteinov, iv) razgradnjo komponent celičnega citoskeleta in v) spremembe v membranski permeabilnosti. Pri nižjih temperaturah se dodatno spremenijo lastnosti lipidnega dvosloja. Nižje temprature povzročijo spremembe v lastnostih lipidnega dvosloja, ki so lahko posledica zgolj nižje temperature (npr. mobilnost lipidov oziroma fazne lastnosti lipidnega dvosloja), lahko pa predstavljajo fiziološki odgovor na znižano temperaturo (npr. spremembe v sestavi membrane z vidika maščobnih kislin). Na izražanje genov nižje temperature vplivajo preko petih znanih mehanizmov: i) upočasnjenja transkripcija in translacija, ii) upočasnjenja degradacija RNK, iii) povečana transkripcija genov, reguliranih preko proteina CIRP, ki se veže na RNK, poleg tega pa predstavlja protein hladnega šoka (CSP), iv) alternativno izrezovanje intronov in spajanje eksonov (splicing) in v) prioritetna in povečana translacija specifičnih mRNA preko vodilnih RNK-sekvenc 5' (interni ribosomske vstopne mesta, IRES) RBM3, ki je prav tako CSP (Sonna in sod., 2002). Omenjena proteina CSP, CIRP in RBM3, spadata v družino z glicinom bogatih RNK-vezavnih proteinov (glycine-rich RNA-binding protein family) (Dresos in sod., 2005). Proteini CSP naj bi vplivali na transkripcijo in translacijo ter pri nižjih temperaturah gojenja delovali kot šaperoni RNK. RBM3 pospešuje translacijo in tako vpliva na izražanje genov pri nižjih temperaturah (Dresos in sod., 2004). CIRP inhibira mitozo in igra ključno vlogo v upočasnjeni rasti celic zaradi hladnega šoka (Baik in sod., 2006).

Analiza izražanja genov celic 3T3 je pokazala, da je bilo kar 10 % od 1176 analiziranih genov reguliranih s temperaturo gojenja (s 37 °C na 32 °C). Spremenilo se je predvsem izražanje genov povezanih s celično delitvijo in sintezo holesterola ter citoskeletalnih genov (Beer in sod., 2003). Vpliv nižje temperature gojenja (33 °C) na celice CHO, ki producira EPO, je bil hkrati ovrednoten z mikromrežami cDNA in proteomsko analizo s pomočjo konvencionalne elektroforeze 2D. Transkriptomski analizi je razkrila predvsem spremembe v izražanju genov metabolizma, transporta in signalnih poti. Proteomska analiza je rezultirala le v nekaj identificiranih proteinih, katerih vsebnost je bila spremenjena pri nižji temperaturi gojenja, in sicer v sedmih z večjo vsebnostjo (PDI, vimentin, NDK B, ERp57, RIKEN cDNA, fosfoglicerat kinaza in protein topotnega šoka

(HSP) 71 kDa) in dveh z manjšo vsebnostjo (HSP90-beta in EF2) (Baik in sod., 2006). 2D-DIGE-proteomska analiza odziva celične linije CHO K1 na znižano temperaturo gojenja (31°C) je razkrila vpliv znižane temperature na regulacijo rasti, translacijo, apoptozo, zgradbo citoskeleta in kontrolo glikozilacije proteinov. Dokazano je bilo, da znižanje temperature gojenja celic CHO vpliva tudi na fosforilacijo tirozinov, kar posledično vpliva na prenos številnih signalov za izražanje genov (Kaufmann in sod., 1999). Kumar in sod. (2008) so poročali o proteomskem odzivu celične linije CHO K1 na znižano temperaturo gojenja (31°C). Identificirani proteini, katerih vsebnost se je glede na analizo 2D-DIGE spremenila, sodelujejo pri različnih celičnih funkcijah, kot so regulacija rasti (heterogen jedrni ribonukleoprotein C), cap-neodvisna translacija (eukariotski iniciacijski faktor-4A), apoptoza (importin- α), citoskelet (vimentin) in kontrola kakovosti glikoproteinov (alfa glukozidaza 2).

2.3 VPLIVI ZNIŽANE VREDNOSTI pH NA CELIČNE LINIJE CHO

2.3.1 Vpliv zvišane vrednosti pCO₂

CO₂ je stranski produkt metabolizma in končni produkt dihanja celic, ki se akumulira v celičnih kulturah z veliko gostoto celic, še posebno v velikih (proizvodnih) volumnih gojenja, kjer je prezračevanje in odstranjevanje plinov tehnološko zahtevnejše. Zvišana vrednost pCO₂ zniža vrednost pH gojišča, intracelularno vrednost pH ter vrednost pH v celičnih organelih, kot na primer v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu. Pri uravnavanju vrednosti pH v kulturi s plinastim CO₂ in bazo se vrednost pCO₂ pri zniževanju vrednosti pH z dodajanjem plinastega CO₂ zviša, z dodajanjem baze pri zviševanju vrednosti pH pa se v kulturi zviša tudi osmolalnost. Znižane vrednosti pH v celici, zvišane vrednosti pCO₂ in osmolalnosti v kulturi in kombinacije omenjenih dejavnikov vplivajo na celični metabolizem, procesiranje proteinov in njihovo izločanje, kar se kaže v upočasnjeni rasti populacije celic, znižani viabilnosti celic ter zmanjšani produkciji rekombinantnih proteinov.

CO₂ je produkt oksidacije piruvata in maščobnih kislin pri nastanku acetil CoA ter produkt cikla TCA, v katerega acetil CoA vstopa. V normalnih okoliščinah stranski produkt metabolizma sesalskih celic, CO₂, prosto difundira iz celic ter se iz njih izloča kot plin. Celice tako v normalnih okoliščinah vzdržujejo fiziološko ravnovesje parcialnega tlaka CO₂ (pCO₂) v območju med 31 mmHg in 54 mmHg (Altman in Dittmer, 1971, cit. po Kimura in Miller, 1996). V celičnih kulturah z veliko gostoto celic in v velikih (proizvodnjih) volumnih gojenja pa je odstranjevanje tako sproščenega CO₂ problematično, zato se ta akumulira v kulturi. Poleg metabolnega CO₂ se za uravnavanje

vrednosti pH v kulturi pogosto dodaja plinasti CO_2 ali NaHCO_3 , ki vrednost pCO_2 še zvišata (Zanghi in sod., 1999). Znano je, da zvišana vrednost pCO_2 negativno vpliva na rast celic in na produkcijo rekombinantnega proteina. V primeru celične linije CHO, ki proizvaja tkivni plazminogen aktivator (tPA), se je v območju vrednosti pCO_2 med 140 mmHg in 250 mmHg specifična rast populacije celic znižala za 30 % in produkcija tPA za 40 % (Kimura in Miller, 1996). Negativen vpliv na rast populacije celic in produkcijo, pa tudi na viabilnost celic, je bil opažen tudi v primeru celične linije CHO DG44, ki proizvaja virusni antigen, in sicer v območju vrednost pCO_2 med 105 mmHg in 150 mmHg (Gray in sod., 1996). Kimura in Miller (1996) prav tako poročata o znižani produktivnosti in upočasnjeni rasti populacije celic CHO v območju vrednosti pCO_2 med 105 mmHg in 150 mmHg ter upočasnjeno rast populacije delno povezujeta tudi s povečano energijsko porabo za vzdrževanje (celic).

Zvišane vrednosti pCO_2 v kulturi znižajo vrednost pH kulture in intracelularno vrednost pH. Pri zvišani vrednosti pCO_2 se intracelularna vrednost pH sicer zniža, vendar jo celice delno kompenzirajo s povečano aktivnostjo ionskih transportcev, kot na primer izmenjevalca ionov Na^+ in H^+ . Kljub regulaciji vrednosti pH kulture in kompenzaciji s povečano aktivnostjo ionskih transportcev se intracelularna vrednost pH pogosto ne vrne na prvotno vrednost. Znižana intracelularna vrednost pH vpliva na aktivnost citosolnih encimov in celični metabolizem. Visoke vrednosti pCO_2 znižajo tudi vrednost pH v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu, kar lahko vpliva na procesiranje proteinov (tudi glikozilacijo) in njihovo izločanje (Kimura in Miller, 1996). Znižano vrednost pH kulture zaradi zvišane vrednosti pCO_2 se običajno uravnava z dodanjem baze (na primer NaOH), kar privede do zvišane osmolalnosti (Kimura in Miller, 1996; Zanghi in sod., 1999). Zvišana osmolalnost negativno vpliva na rast populacije celic in viabilnost celic (Zhu in sod., 2005), produkcijo rekombinantnega proteina (Gray in sod., 1996; Kimura in Miller, 1996) in postranslacijske modifikacije (Zanghi in sod., 1999, Schmelzer in Miller, 2002). deZengotita in sod. (2002) so poročali o vplivu obeh dejavnikov, torej znižane vrednosti intracelularnega pH, kot posledici zvišanega pCO_2 in osmolalnosti na hibridomske celice. Ugotovili so, da zvišan pCO_2 ne vpliva na apoptozo celic, produkcijo rekombinantnega mAb in porabo glutamina, da pa zmanjša aktivnost glikolize, saj nizke vrednosti intracelularnega pH inhibirajo fosfofruktokinazo (Fidelman in sod., 1982), poleg tega pa negativno, preko heksokinaze, vplivajo na vstop glukoze v glikolizo (Miccoli in sod., 1996). Zadnji so poročali, da sta bila razmerje laktat/piruvat in količina ATP pri kisli vrednosti intracelularnega pH znižana.

2.3.2 Vpliv zvišane koncentracije laktata

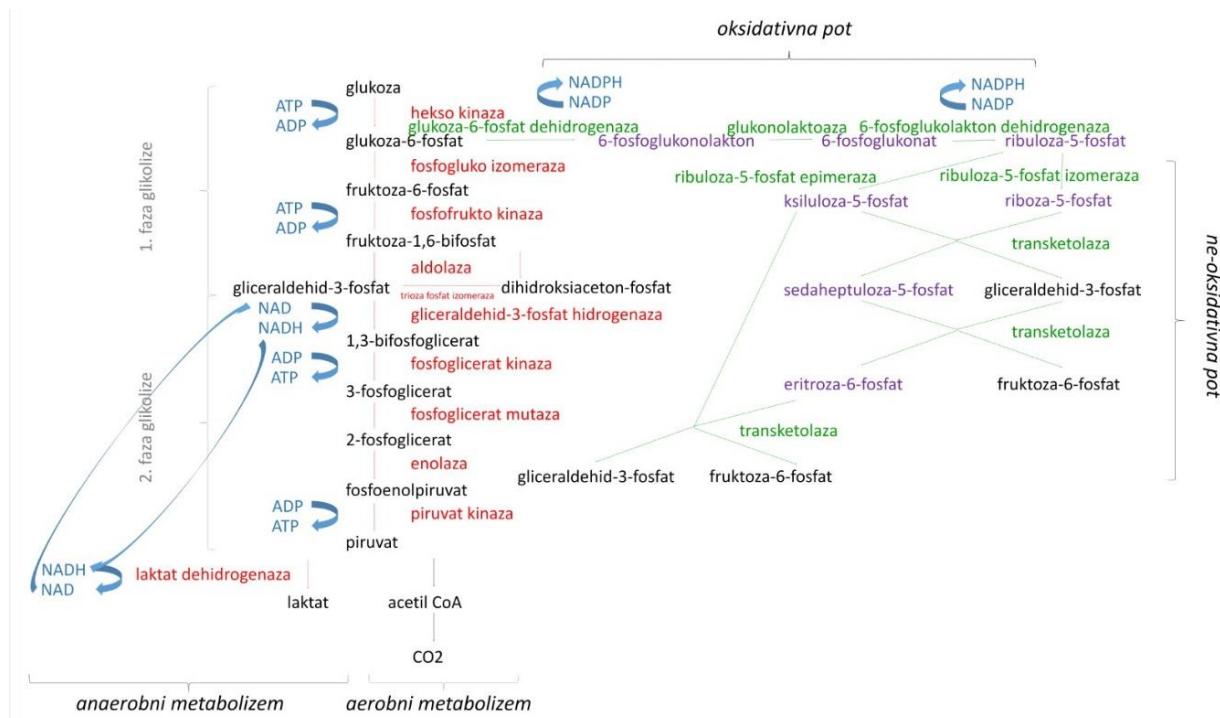
Zvišana koncentracija laktata, ki tako kot zvišana vrednost pCO₂ zniža vrednost pH kulture, je pogost pojav pri gojenju sesalskih celičnih linij. Laktat je produkt anaerobnega procesa glikolize, njegova produkcija pa se lahko poveča tudi pri aerobnih pogojih ob visoki koncentraciji glukoze (Warburg, 1956; Zagari, 2012) ali kot odziv na povečan oksidativni metabolizem v mitohondrijih, pri čemer produkcija laktata predstavlja mehanizem obrambe celic pri oksidativnem stresu (Brand, 1997). Več o vzrokih za povečano produkcijo laktata in mehanizmih obrambe celic pri oksidativnem stresu je opisano v naslednjih dveh poglavjih (2.4 in 2.5). Pri uravnavanju vrednosti pH v kulti se zviša vrednost pCO₂ kot posledica zniževanja previsoke vrednosti pH z dodajanjem plinastega CO₂, ali pa osmolalnost pri dodajanju baze za zviševanje vrednosti pH, ali pa se zvišata obe vrednosti pri uravnavanju vrednosti pH z izmeničnim dodajanjem plinastega CO₂ in baze. Znano je, da imajo laktat (Xing in sod., 2008) in vrednost pCO₂ ter osmolalnost pri zvišani koncentraciji oziroma vrednosti negativen vpliv na rast populacije in viabilnost celic (Zhu in sod., 2005) in produkcijo rekombinantnega proteina (Kimura in Miller, 1996; Gray in sod. 1996).

2.4 METABOLIZEM

2.4.1 Metabolizem glukoze in pentoza fosfatna pot

Razgradnja glukoze v metabolnem procesu glikolize, ki je prvi od treh metabolnih procesov razgradnje glukoze, je glavni vir laktata, saj se produkt glikolize, piruvat, pri anaerobnih pogojih in v hitrorastočih celičnih kulturah tudi pri aerobnih pogojih, preferenčno pretvori v laktat. Anaerobni metabolni proces, ki vodi v sintezo laktata, je tudi eden izmed obrambnih mehanizmov celice pri oksidativnem stresu. Poznavanje vzrokov, ki vodijo v aerobni ali anaerobni metabolni proces glikolize, je ključno za razumevanje problematike zvišanih koncentracij laktata v bioprocесih. Pentoza fosfatna pot (PFP), v katero vstopa substrat iz glikolize (glukoza-6-fosfat), je v celicah inducirana, kadar je njihova potreba po reducirajoči molekuli NADPH povečana. Do tega pride v primeru pospešenih poti oziroma reakcij, kjer NADPH sodeluje; npr. reduktivna biosinteza in redukcija molekul, ki so vključene v obrambne mehanizme celice pri oksidativnem stresu (Stryer, 1997).

Glukoza je monosaharid, ki je glavni vir energije za večino celic. V celicah glukoza vstopa v glikolizno metabolno pot, katere produkt so energija in intermediati za nadaljnjo biosintezo, ter v PFP, kjer se generira energija za celični anabolizem, ter riboza, substrat za sintezo nukleinskih kislin.



Slika 1: Shematski prikaz glikolize in cikla PFP. Glukoza se v glikolizni metabolni poti (levo) oksidira v dve molekuli piruvata, pri tem pa nastaneta po dve molekuli ATP in NADH. Pri aerobnih pogojih produkti glikolize vstopajo v TCA in dihalno verigo, kjer poteče dokončna razgradnja do CO_2 in H_2O . Pri anaerobnih pogojih in Warburgovem efektu se piruvat pretvorji v laktat. V PFP (desno) vstopa glukoza-6-fosfat iz glikolize in se pretvori v ribozo-5-fosfat, pri čemer nastaneta dve molekuli NADPH. Encimi glikolize so označeni rdeče, encimi PFP so označeni zeleno, nastale energijske in reducirajoče molekule pa modro.

Figure 1: Schematic presentation of glycolysis and PFP cycle. Glucose is oxidized in the glycolytic pathway into two molecules of pyruvate (left). Two ATP and two NADHs are generated. An aerobic metabolism leads to degradation of pyruvate from glycolysis to CO_2 and H_2O in TCA and consequent oxidative phosphorylation. Result of an anaerobic glycolysis and Warburg's aerobic glycolysis is conversion of pyruvate into lactate. Glucose-6-phosphate enters PPP (Pentose Phosphate Pathway) and is converted to ribose-5-phosphate (right). Two molecules of NADPH are generated. Glycolytic enzymes are marked in red, PPP enzymes in green, and energy molecules and reducing equivalents in blue.

Pri glikolizi se glukoza oksidira v dve molekuli piruvata, pri tem pa se tvori energija v obliki dveh molekul ATP in dveh molekul NADH (slika 1). Pri aerobnih pogojih produkti glikolize preferenčno vstopajo v citratni cikel (TCA) in nadalje v dihalno verigo, kjer poteče dokončna razgradnja do CO_2 in H_2O , kar je maksimalni energijski izkoristek glukoze. Pri anaerobnih pogojih se piruvat s pomočjo encima laktat dehidrogenaze in NADH pretvorji v laktat (Stryer, 1997). V normalnih okoliščinah se le majhen delež

energije glukoze sprosti preko anaerobnega metabolizma, pri hitrorastočih celicah, ki porabijo velike količine glukoze, pa se večina te kljub aerobnim pogojem pretvorí v laktat. Pojav je znan kot Warburgov efekt aerobne glikolize (Warburg, 1956). Čeprav energijski izkoristek glukoze pri glikolizi ni velik, je v primeru povečane frekvence glikolize nastalega ATP dovolj za potrebe celice, zato dokončna razgradnja prek dihalne verige v mitohondriih ni potrebna (Warburg, 1956). Regeneracija NAD⁺ pri redukciji piruvata v laktat omogoča nemoten kontinuiran potek glikolize (slika 1) (Stryer, 1997).

Sinteza laktata se lahko poveča zaradi povečane porabe oziroma pretvorbe glukoze, zato količina produkta glikolize presega kapaciteto cikla TCA. Presežek piruvata posledično vstopa v anaerobno glikolizo (DeBerardinis in sod., 2008; Zagari, 2012). Ugotovljeno je bilo, da se pri celicah CHO pri hiperoksičnih pogojih povečata poraba glukoze in tvorba laktata, s čimer se kompenzira motena oksidativna fosforilacija (Schoonen in sod., 1990). Pozneje je bilo predpostavljeno, da je povečana anaerobna glikoliza oziroma sinteza laktata mehanizem obrambe celic pri oksidativnem stresu. S preusmeritvijo piruvata v anaerobno metabolno pot se namreč zniža mitohondrijski oksidativni metabolizem, ki generira reaktivne kisikove spojine (reactive oxygen species, ROS) (Brand, 1997). Oksidativni stres in mehanizmi obrambe proti oksidativnim dejavnikom (odstranjevanje ROS) so natančneje opisani v poglavju 2.5.

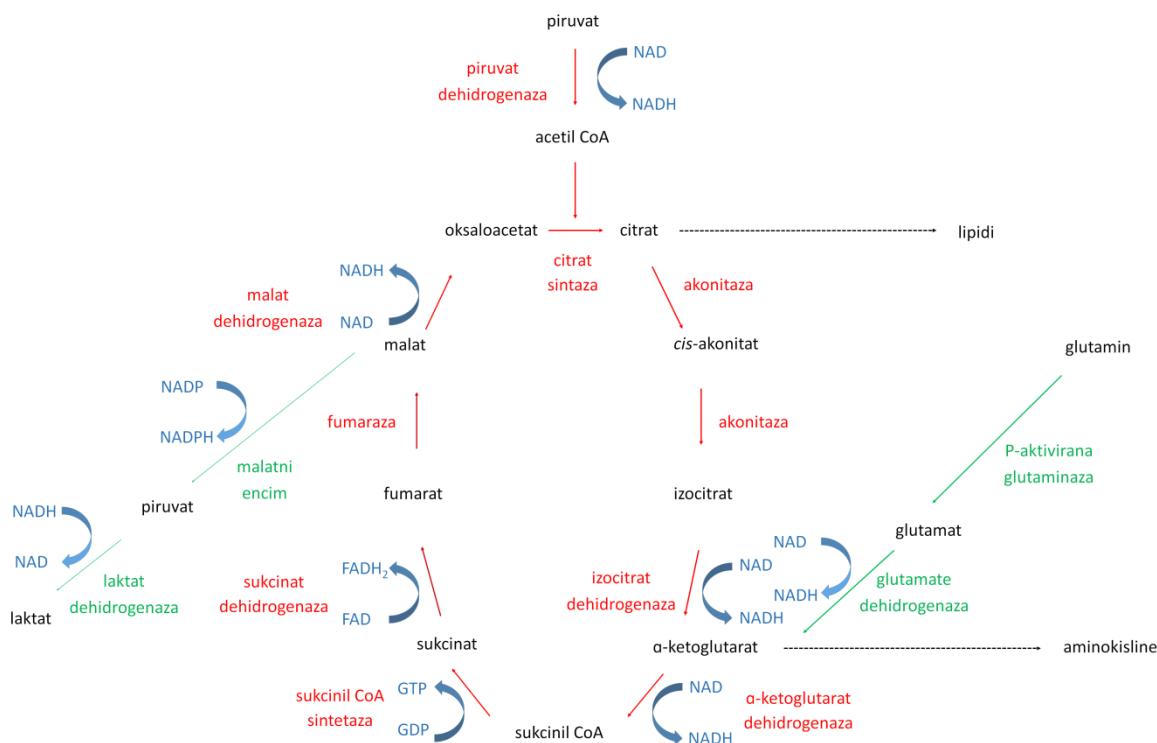
Zaradi pogostega pojava zvišane koncentracije laktata pri gojenju sesalskih celičnih linij, posledičnega znižanja vrednosti pH gojišča in negativnih vplivov na rast populacije celic, viabilnost in produktivnost so razlogi za metabolni prehod v anaerobno glikolizo zanimivi za področje proizvodnje rekombinantnih proteinov.

V PFP vstopa glukoza-6-fosfat iz glikolize in se pretvorí v pentozo, ribozo-5-fosfat, ki predstavlja substrat za sintezo nukleotidov, nukleinskih kislin, ATP, CoA, NAD⁺ in FAD. Pri tem nastaneta dve molekuli NADPH. NADPH je reducirajoča molekula, ki je potrebna pri reduktivni biosintezi, na primer pri sintezi maščobnih kislin, metabolizmu lipidov ali redukciji glutationa (GSH), molekuli, ki sodeluje pri mehanizmu obrambe celice pri oksidativnem stresu. PFP in glikoliza sta povezani prek encimov transketolaza in transaldolaza, ki odvečno ribozo-5-fosfat pretvorita v gliceraldehid-3-fosfat in fruktozo-6-fosfat, ki iz PFP vstopata nazaj v glikolizo. Pri povečani potrebi po reducirajočih molekulah je vstop glukoza-6-fosfata v PFP pospešen oziroma favoriziran (Stryer, 1997).

2.4.2 Cikel TCA in metabolizem glutamina

Cikel TCA je glavni vir energije v celici in vir intermediatov za celični anabolizem. Ker pri hitrorastočih sesalskih celičnih linijah le del piruvata, nastalega v glikolizi, vstopi prek acetil-CoA v cikel TCA, poleg tega pa se del citrata, nastalega v ciklu TCA, porabi za sintezo lipidov, je glutamin nadomestni substrat, ki omogoči nemoteno delovanje cikla in posledično nastanek potrebne energije. Cikel TCA je pomembna regulatorna točka, ki nadzoruje hitrost oziroma frekvenco glikolize in glutaminolize. Poraba glutamina, ki se dodaja gojišču, je eden izmed indikatorjev metabolne aktivnosti celic.

Cikel TCA je glavni vir energije v celici, saj se pri vsakem ciklu generirajo tri molekule NADH in po ena molekula FADH₂ in GTP. Pri aerobnih pogojih piruvat, končni produkt glikolize, preide iz citoplazme v mitohondrij, se tam dekarboksilira v acetil-CoA ter vstopi v cikel TCA (slika 2). Ker se v hitrorastočih sesalskih celičnih linijah večino piruvata, nastalega pri glikolizi, s pomočjo encima laktat dehidrogenaze pretvori v laktat, ga le majhen del vstopi v mitohondrij in preko acetil-CoA v cikel TCA. Glikoliza preko pretvorbe piruvata ni edini vir acetil-CoA, saj ta nastaja tudi pri razgradnji nekaterih aminokislin. Cikel TCA je poleg energetskih molekul tudi vir komponent celičnega anabolizma, saj citrat iz cikla TCA preide nazaj v citosol, kjer sodeluje pri sintezi lipidov (Stryer, 1997). Sinteza lipidov je v primeru hitrorastočih celic oziroma tumorskih celic zelo potratna biosintezna pot. Zaradi manjšega deleža piruvata, ki vstopa v mitohondrij in cikel TCA ter porabe citrata, nastalega v ciklu TCA za sintezo lipidov, je potek cikla TCA v hitrorastočih sesalskih celičnih linijah oviran. Glutamin, nadomestni substrat, omogoči nadaljevanje cikla TCA in nastanek potrebne energije (glutaminoliza, slika 2). Glutamin se preko glutamata v mitohondriju pretvori v intermediat cikla TCA, α -ketoglutarat, pri tem pa se sprostita dve molekuli amonijaka. Glutamin, ki se pretvori s pomočjo glutamat dehidrogenaze, se nadalje oksidira do CO₂, kar je energijsko ugodna varianta, saj iz ene molekule glutamina nastane 27 molekul ATP. V primeru hitrorastočih sesalskih celičnih linij, ki hitro porabljam glutamin, nastane zaradi vstopa večje količine α -ketoglutarata v cikel TCA sprememba v stehiometriji reakcij cikla TCA. Frekvenca pretvorbe sukcinata v malat se namreč poveča, frekvenca pretvorbe oksalacetata v citrat pa ostane nespremenjena. Stehiometrija reakcije med molekulama oksalacetat in acetil-CoA (1:1) je tako porušena, zato se odvečen malat izloči iz cikla TCA, se nadalje pretvori v piruvat in nato v laktat. Primarna vloga glutamina, ki se pogosto dodaja gojišču, je torej zagotovitev intermediata za nemoten potek cikla TCA in posledičnega generiranja potrebne energije. Poleg omenjene vloge je glutamin, in tudi glutamat, pomembna prekurzorska molekula pri sintezi aminokislin (Gòdia in Cairó, 2006). Cikel TCA je povezan z dihalno verigo oziroma oksidativno fosforilacijo (poglavlje 2.4.3).



Slika 2: Shematski prikaz cikla TCA in glutaminolize. Piruvat preko pretvorbe v acetil CoA vstopi v cikel TCA. Glutamin, nadomestni substrat za nemoteno delovanje cikla TCA, se preko glutamata pretvori v α -ketoglutarat in tako omogoči nemoteno delovanje cikla TCA. Encimi cikla TCA so označeni rdeče, encimi glutaminolize so označeni zeleno, nastale energijske in reducirajoče molekule pa modro.

Figure 2: Schematic presentation of TCA cycle. Pyruvate enters the TCA cycle by conversion to Acetyl-CoA. Glutamine, alternative substrate for TCA cycle, is converted to glutamate and further to α -ketoglutarate which enables undisturbed flow of TCA cycle. Enzymes of TCA cycle are marked in red, glutaminolysis enzymes in green, and energy molecules and reducing equivalents in blue.

2.4.3 Oksidativna fosforilacija

Dihalna veriga oziroma oksidativna fosforilacija je zadnji od treh metabolnih procesov, preko katerih se glukoza oksidira do CO_2 in H_2O . Predstavlja glavni vir energijskih molekul ATP v aerobnih organizmih in tudi poglavitni endogeni vir reaktivnih kisikovih spojin (ROS). Zvišana koncentracija ROS, do katere pride zaradi motene oksidativne fosforilacije, povzroči oksidativne okvare celic, kar celicam predstavlja oksidativni stres.

NADH in FADH_2 sta energetsko bogati molekuli, ki se tvorita pri glikolizi, oksidaciji maščobnih kislin in ciklu TCA. Pri procesu oksidativne fosforilacije se preko štirih proteinskih kompleksov na notranji mitohondrijski membrani elektroni prenesejo iz NADH in FADH_2 na molekularni kisik (O_2), ki nato reagira s protoni vodika in se pretvori v vodo (H_2O). Iz NADH se elektroni prenesejo na kompleks I (NADH koencim Q (CoQ)

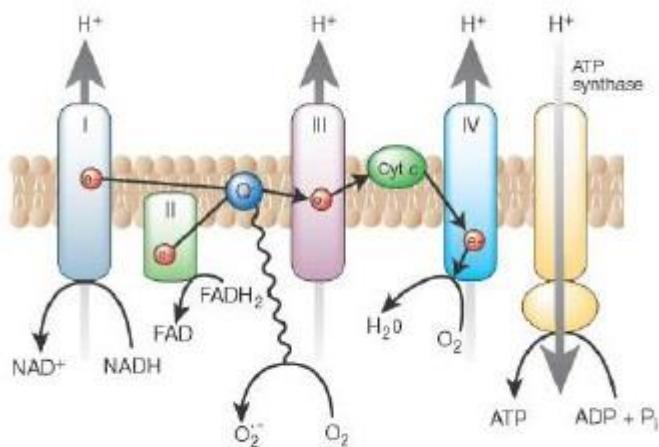
reduktazo), iz FADH₂ pa na kompleks II (sukcinat CoQ reduktazo). Sledi prenos elektronov naprej na kompleksa III (citokrom c reduktazo) in IV (citokrom c oksidazo). Pri tem se sprosti energija, ki se pozneje porabi za sintezo energijsko bogate molekule ATP. Hkrati s prenosom elektronov na notranji mitohondrijski membrani se protoni izločajo iz mitohondrijskega matriksa v intermembranski prostor, pri čemer se ustvari pH-gradient in transmembranski potencial. Protoni se pozneje prenesejo nazaj v matriks, pri čemer se končno sintetizira ATP. V procesu oksidacije glukoze do CO₂ in H₂O preko glikolize, cikla TCA in oksidativne fosforilacije, nastane pri oksidativni fosforilaciji kar 26 od 30 molekul ATP (Stryer, 1997).

V verigi elektronskega transporta se z redukcijo molekularnega kisika generirajo ROS, predvsem superoksidni anioni. Ti se s pomočjo superoksid dismutaze (SOD) pretvorijo v manj reaktivен vodikov peroksid (H₂O₂). Pri interakciji H₂O₂ s kovinskimi ioni (npr. železovimi ali bakrovimi) se tvorijo najreaktivnejši predstavniki ROS, hidroksi radikali (OH⁻) (slika 4) (Noori, 2012).

Znano je, da na proces prenosa elektronov v mitohondrijih vpliva raven raztopljenega kisika, raven respiratornih substratov in transmembranski potencial, ki ga ustvarja prehod H⁺ skozi notranjo mitohondrijsko membrano. Predvideva se, da sta glavni mesti nastanka ROS, predvsem superoksidnih anionov, kompleksa I in III verige elektronskega prenosa. Anion semikinon je produkt redukcije ubikinona (koencima Q) ali oksidacije ubikinola, s hkratnim odcepom dveh protonov in je eden od mnogih radikalnih intermediarov elektronskega transporta ter hkrati nabolj dovzet za redukcijo kisika in tvorbo superoksidnih anionov. Nastanek radikalov aniona semikinon je odvisen od vrednosti pH v mitohondrijih in citosolu ter posledične spremembe membranskega potenciala (Chen in sod., 2003; Selivanov in sod., 2008). Na vrednost pH mitohondrijev in citosola vpliva pH vrednost okolja, torej kulture. Selivanov in sod. (2008) poročajo, da se nastanek ROS z višanjem vrednosti pH kulture do 7,5 povečuje zaradi zniževanja koncentracije protonov (H⁺). Pri vrednosti pH kulture 8 se nastanek ROS sicer zmanjša, vendar je v tem primeru potek dihalne verige moten.

Producija ROS v mitohondrijih se poveča tudi pri zvišanih vrednostih raztopljenega O₂ oziroma hiperoksiji. Zvišane koncentracije ROS inhibirajo delovanje kompleksa I in II, s tem pa posledično negativno vplivajo na energijski metabolizem celice (Turrens, 2003; Selivanov in sod., 2008).

V normalnih okoliščinah se ROS, ki nastanejo v dihalni verigi, s pomočjo antioksidativnega obrambnega mehanizma odstranijo (slike 6 in 8). Če iz kakršnega koli razloga elektroni uidejo nadzoru antioksidativnega obrambnega mehanizma, se ROS v celici akumulirajo in povzročajo oksidativne okvare celice, ki v skrajnem primeru vodijo do celične smrti (St-Pierre in sod., 2002; Chen in sod., 2003).

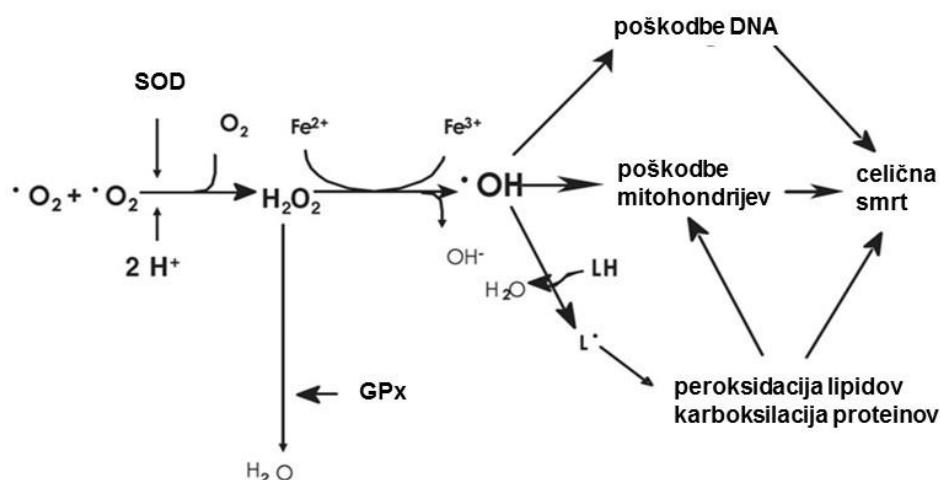


Slika 3: Shematski prikaz dihalne verige (Zagari, 2012).

Figure 3: Schematic presentation of the mitochondrial respiratory chain (Zagari, 2012).

2.5 OKSIDATIVNI STRES V CELICAH SESALCEV

Reaktivne kisikove spojine (ROS) so produkt celičnega metabolizma (endogeni vir) ali pa izvirajo iz zunanjih dejavnikov oziroma komponent (eksogeni vir) (Will, 1999). ROS so zelo reaktivne molekule, ki v primeru neravnovesja v celici poškodujejo njihove strukture, kot na primer ogljikove hidrate, lipide in poteine, ter spremenijo njihovo funkcionalnost. Aerobni organizmi se proti škodljivim učinkom ROS borijo z antioksidativnimi mehanizmi. V skrajnem primeru vodi neravnovesje ROS v celici v smrt celice (slika 4) (Noori, 2012; Moron in Castilla-Cortazar, 2012).



Slika 4: Shematski prikaz posledic oksidativnega stresa. Prosti radikali se reducirajo do H_2O s pomočjo treh glavnih antioksidativnih encimov: SOD in GPx. Tvorba hidroksilnih radikalov vodi do oksidativnih poškodb celice: poškodbe DNK, karboksilacije proteinov in peroksidacije lipidov. Oksidativne poškodbe končno vodijo v celično smrt (prirejeno po Moron in Castilla-Cortazar, 2012).

Figure 4: Mechanisms of oxidative cellular damage. Free radicals are reduced into H_2O with the cooperation of the three main antioxidant enzymes: SOD and GPx. The generation of hydroxyl radicals from hydroperoxide produces the development of oxidative cell injury: DNA damage; carboxylation of proteins; and lipid peroxidation, including lipids of mitochondrial membranes. By these pathways, oxidative damage leads to cellular death (adapted from Moron in Castilla-Cortazar, 2012).

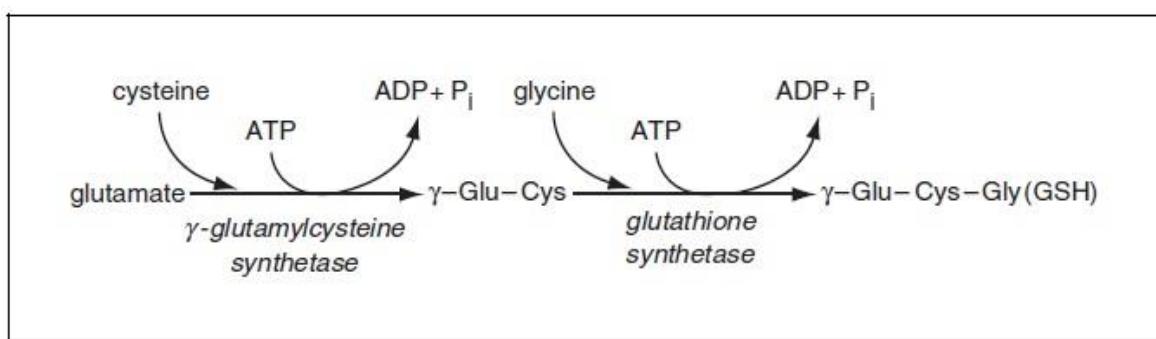
ROS predstavljajo derivate molekularnega kisika, kamor spadajo superoksiidi, hidroksiperoksiidi, singletni kisik, hidroksilni ioni ... Molekularni kisik ima pomembno vlogo pri celicah. V celici poteka celično dihanje oziroma oksidativna fosforilacija, kjer se na osnovi reakcij oksidacije in redukcije procesira O_2 v ATP (Noori, 2012), pri tem pa se generira veliko število ROS, ki jih antioksidativni mehanizmi v normalnih okoliščinah odstranijo (poglavje 2.4.3). Prav celično dihanje je najbolj izpostavljen hiperoksičnim dejavnikom. Hiperoksija se nanaša na povečano raven kisika glede na normalni parcialni tlak kisika (pO_2) (Birben in sod., 2012), pri teh pogojih pa se pospešeno tvorijo in

koncentrirajo ROS v mitohondrijih (Chen in sod., 2003). Koncentriranje ROS inaktivira komponente verige elektronskega prenosa v mitohondrijih (Chen in sod., 2003), kar vpliva na mitohondrijski energijski metabolizem in na glikolizo (Kumuda, 2013).

Že v poglavju 2.2 je omenjeno, da se pri nižji temperaturi gojenja celičnih kultur ter večji topnosti plinov pri nižjih temperaturah poveča količina raztopljenega kisika, torej zviša vrednost pO_2 , in se vzpostavijo hiperoksični pogoji (Chuppa in sod., 1997; Jan in sod., 1997). Zaradi tesne povezanosti obeh dejavnikov je zelo težko ločiti posledice vpliva znižane temperature, skupaj z nastalimi hiperoksičnimi pogoji, od posledic zgolj znižane temperature (Al-Fageeh in sod., 2005).

Oksidativni stres predstavlja neravnovesje med produkcijo in detoksifikacijo kisikovih radikalov. Poglavitni endogeni oziroma intracelularni vir ROS je mitohondrijski transport elektronov in oksidaze NADPH. Celice vsebujejo dva glavna redoks regulatorna sistema, ki delujeta na osnovi tiolnih skupin: glutationski (GSH), imenovan tudi glutaredoksinski (Grx) in tioredoksinski (Trx) (Will, 1999).

Prvi sistem temelji na GSH, ki ga sestavljajo glutamat, cistein in glicin. GSH je najpomembnejši celični antioksidant in je v celici prisoten v velikih količinah (milimolarne koncentracije!). Molekula vsebuje visok redukcijski potencial, poleg tega pa je zaradi γ -glutamil amidne vezi odporna proti hidrolizni cepitvi običajnih proteaz. Sinteza GSH (slika 5) poteče s pomočjo encimov glutamat-cistein ligaza in GSH sintetaza, regulirana pa je z intracelularno koncentracijo cisteina in s povratno inhibicijo intracelularnega GSH (Will, 1999; Lu, 2013; Sikalidis, 2014).

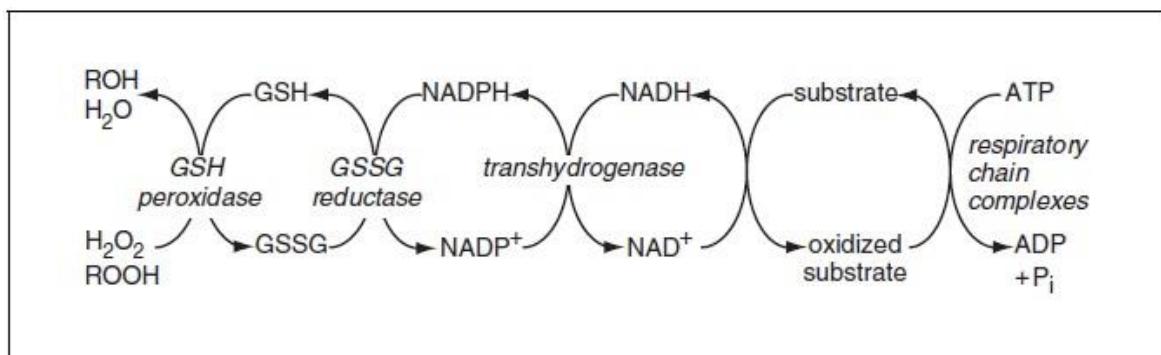


Slika 5: Siteza glutationa (Will, 1999).

Figure 5: Synthesis of glutathione (Will, 1999).

Molekula GSH v antioksidativnem mehanizmu GSH predstavlja reducirajoči se substrat. Dve molekuli GSH (reducirana oblika) preko tiolnih skupin cisteinov s pomočjo peroksidaze GSH (GPx) tvorita disulfid GSH (GSSG, oksidirana oblika) (slika 7)

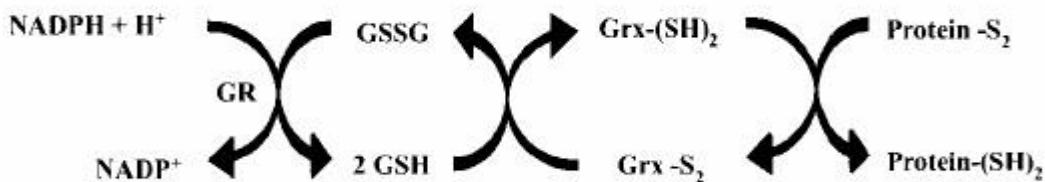
(Fernandes in Holmgren, 2004, Winyard in sod., 2005). Razmerje med reducirano in oksidirano obliko je ključno pri ohranjanju redoks ravnovesja v celici in je regulirano s pomočjo reduktaze GSSH (GR), ki katalizira razcep GSSG nazaj v GSH. Molekula GSH v antioksidativnem mehanizmu GSH služi kot donor elektronov, s pomočjo GSH-S-transferaze (GST) pa se lahko tudi neposredno poveže z različnimi elektrofilimi in toksičnim substancam prepreči nadaljnje reakcije preko prostih radikalov (Winyard in sod., 2005). Redoks cikel GSH je ključni antioksidativni mehanizem v mitohondriih (sliki 6 in 8), kjer v dihalni verigi kot produkt normalnega metabolizma nastajajo ROS (Will, 1999; Chen in sod., 2003; Lu and Holmgren, 2014). Encimi, ki so še vpleteni v antioksidativni mehanizem GSH, so GPx, GST in glutaredoksin (Grx). GPx omogoča pretvorbo GSH v GSSH (Fernandes in Holmgren, 2004, Winyard in sod., 2005), glavna vloga sedmih različnih encimov GST, ki spadajo v družino GST, je konjugacija GSH z elektrofilnimi komponentami (npr. z lipidnimi hiperoksiidi) (Will, 1999), Grx, tiol-disulfid oksidoreduktaze, pa s pomočjo hkratne pretvorbe GSH v GSSG katalizirajo redukcijo disulfidov v prisotnosti NADPH in GR (slika 7) (Will, 1999; Mieyal in sod., 2008, Fernandes in Holmgren, 2004).



Slika 6: Ciklični mehanizem redukcije preko GSH v mitohondriju (Will, 1999).

Figure 6: Mitochondrial GSH redox cycle (Will, 1999).

Pomemben del antioksidativnega mehanizma GSH so tudi encimi, ki katalizirajo redukcijo NADP⁺ v NADPH. Redukcija GSSH v GSH, ki jo katalizira GR, je namreč povezana s hkratno oksidacijo NADPH v NADP⁺. NADPH v celici v glavnem tvori ozioroma obnavlja izocitrat dehidrogenazo (IDH), manj pa tudi malat dehidrogenazo (MDH), glukoza-6-fosfat dehidrogenazo (G6PD) in fosfoglukonat dehidrogenazo (6PGD) (Will, 1999). Prva dva encima v mitohondriih sodelujeta v ciklu TCA (St-Pierre in sod., 2002; Varela in sod., 2004; Chen in sod., 2003), druga dva pa v citosolu v PFP (Stryer, 1997).



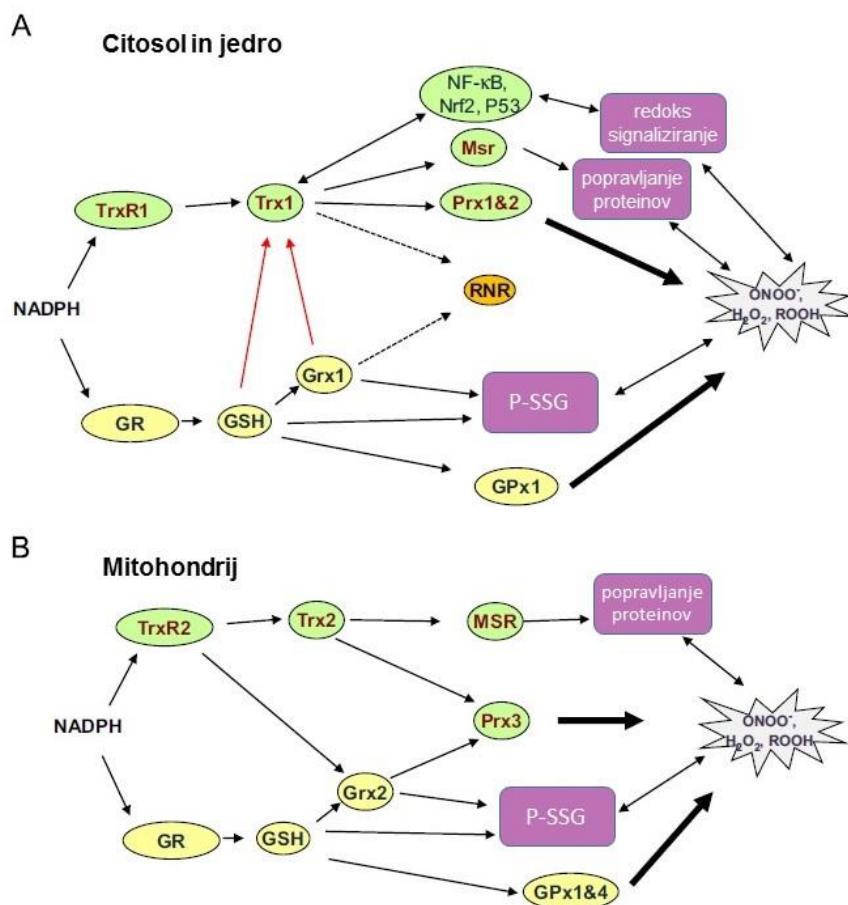
Slika 7: Osnovna shema antioksidativnega mehanizma GSH (Fernandes in Holmgren, 2004).

Figure 7: Basic scheme of GSH antioxidative mechanism (Fernandes and Holmgren, 2004).

Podobni redoks procesi, na podlagi katerih deluje antioksidativni mehanizem GSH, se na molekularni ravni odvijajo tudi v drugem najpogostejšem antioksidativnem mehanizmu, pri čemer igra glavno vlogo reducent tioredoksin (Trx). Tioredoksin (Trx) so majhni (12 kDa) multifunkcionalni proteini dveh oblik, katerih delovanje je ločeno tudi lokacijsko: Trx1 kot citokin ali kemokin deluje v citosolu, Trx2 pa deluje v mitohondrijih. V primerjavi z GSH imajo Trx nižji redoks potencial (Winyard in sod., 2005).

Glavni akterji pri antioksidativnem mehanizmu Trx so Trx, Trx reduktaza (TrxR) peroksiredoksin (Prx) in metionin sulfoksid reduktaza (Msr). Trx reagirajo s številnimi proteini, sodelujejo pri sintezi DNK, reducirajo metionin sulfoksid reduktazo ter imajo pomembno vlogo pri regulaciji nekaterih ključnih transkripcijskih faktorjev (npr. faktorja kB in aktivatorskega proteina-1). Primarni vlogi Trx sta prenos elektronov na Prx in popravljanje oksidiranih proteinov s pomočjo reducirajočega ditiolnega aktivnega mesta, ki se posledično oksidira v disulfid. Trx vsebujejo dve ditiolni mesti, od katerih eno predstavlja aktivno mesto, s pomočjo katerega reducirajo oksidirane proteine, za drugo pa se predpostavlja, da ima pomembno vlogo pri redoks celičnem signaliziranju (s pomočjo prenosa elektronov na Prx v prisotnost H₂O₂). Redukcijo oksidirane disulfidne oblike aktivnega mesta nazaj v ditiolno katalizira TrxR, in sicer s prenosom elektronov iz NADPH ali FADH₂. Redukcijo oksidirane disulfidne oblike neaktivnega mesta pa omogoča mehanizem GSH/Grx. Ditiolni mesti nista aktivni hkrati, inaktivacija posameznega mesta pa je reverzibilna (Winyard in sod., 2005; Du in sod., 2013).

V dužino proteinov Prx spada šest Prx, od katerih je pri petih njihovo katalitično delovanje odvisno od Trx, pri enem pa od GSH (PRDX1). PRDX1 je tudi edini Prx, ki ima dvojno katalitično funkcijo: peroksidazno, kot preostalih pet, in fosfolipazno (A₂). Peroksidazna katalitična funkcija omogoča redukcijo hiperoksidnih lipidov, fosfolipazna pa ima vlogo pri hidrolizi nativnih fosfolipidov in fosfolipidnem katabolizmu pri nizki vrednosti pH. Glavna funkcija Prx je redukcija peroksidov (Rhee in sod., 2012).



Slika 8: Shema antioksidativnih sistemov GSH in Trx v sesalskih celicah. Zgornja polovica sheme (A) prikazuje tiolni redoks sistem v citosolu in jedru. Iz antioksidativnega sistema Trx se električni prenesejo na Prx, Trx-odvisne peroksidaze (Prx1 in 2). Poleg tega Trx1 reducira Msr, ki je vpletena v popravljanje oksidiranih proteinov. Trx1 regulira aktivnost oksidativno občutljivih transkripcijskih faktorjev in je tako vpletena v redoks signalizacijo. Antioksidativni sistem GSH je alternativa za redukcijo Trx, kadar je elektronski transfer preko TrxR1 blokiran. Antioksidativni sistem GSH preko GSH blokira oksidativne skupine proteinov, preko Grx1 pa reducira proteinske disulfide. Iz GSH se električni prenesejo na GPx1, ki tako kot Prx odstranjuje ROS. Spodnja polovica sheme (B) prikazuje tiolni redoks sistem v mitohondrijih. Mitohondrijski Grx2 lahko reducira TrxR2 in GSH, mitohondrijski Prx3 pa lahko reducirata Trx2 ali Grx2. Antioksidativni sistem GSH preko GSH blokira oksidativne skupine proteinov, preko Grx2 pa reducira proteinske disulfide. Iz GSH se električni prenesejo na GPx1 ali 4, ki tako kot Prx odstranjuje ROS, ali preko Grx2 na Prx3 (Lu in Holmgren, 2014).

Figure 8: Scheme of Trx in GSH antioxidative systems are the two major thiol-dependent antioxidant systems in mammalian cells. (A) Mammalian thiol-dependent redox system in cytosol and nucleus. Trx system provide the electron to thioredoxin-dependent Prx (Prx1 and 2). Moreover, Trx1 reduces Msr and is involved in the repair of oxidized proteins. Trx1 regulate the activities of many oxidative-sensitive transcription factors and is thus involved in the redox signalling. The GSH system can serve as a backup system to reduce Trx when the electron transfer pathway from TrxR1 is blocked. GSH antioxidative mechanism blocks protein oxidative groups by GSH or reduce disulphides by Grx1. Electrons are transferred from GSH to GPx1 which removes ROS as efficient Prx. (B) Mammalian mitochondria thiol-dependent redox systems. Mitochondrial Grx2 can be reduced by mitochondria TrxR2 and GSH. Mitochondrial Prx3 can be reduced by both mitochondrial Trx2 and Grx2. GSH antioxidative mechanism blocks protein oxidative groups by GSH or reduce disulphides by Grx2. Electrons are transferred from GSH to GPx1 or 4 which remove ROS as efficient Prx or through Grx2 to Prx3 (Lu and Holmgren, 2014).

Redoks signalizacija temelji na prisotnosti H_2O_2 , katerega zvišana koncentracija v celici aktivira nekatere transkripcijske faktorje, npr. jedrni faktor-kB (NF-kB), jedrni faktor Ref-1 in AP-1. Vezava NF-kB na DNK je odvisna od Trx, ob zvišani koncentraciji H_2O_2 pa se njegova aktivnost poveča. Tako je tudi v primeru drugih oksidativnih dejavnikov, ko se pospeši tudi aktivnost transkripcijskega faktorja AP-1, ki je dimer produktov protonkogenov Fos in Jun. Trx stimulativno vpliva tudi na jedrni faktor Ref-1, ki lahko reducira in tako aktivira faktor AP-1. Aktivnost obeh transkripcijskih faktorjev, NF-kB in AP-1, torej regulirata Trx in H_2O_2 (Fernandes in Holmgren, 2004). Dodaten primer signalne peroksidazne aktivnosti Prx je PRDX1, ki s prenosom peroksidnih signalov vpliva na aktivacijo poti ASK1/p38 MAPK (Jarvis in sod., 2012).

Antioksidativna sistema GSH in Trx sta povezana in redoks okolje kontrolirata vzajemno, v smislu prenosa elektronov pa sta lahko drug drugemu nadomestni sistem (slika 8). Oba sistema reducirata tudi ditiole in sta preko redukcije encima ribonukleotid reduktaza (RNR) vpletena v tvorbo deoksiribonukleotidov za sintezo DNK (Lu in Holmgren, 2014; Fernandes in Holmgren, 2004).

2.6 PROTEOMSKE RAZISKAVE CELIC CHO

Celice CHO se v namen produkcije rekombinantnih proteinov uporabljo že desetletja. Na podlagi zgodovine že lansiranih, regulatorno odobrenih, varnih in kakovostnih produktov ter dobre produkcijske učinkovitosti so najpogosteje uporabljen produkcijski sistem. Čeprav je bilo skozi desetletja veliko narejenega za izboljšanje produktivnosti, so bili celični mehanizmi celic CHO slabo raziskani in razumljeni. Poznavanje temeljnih bioloških mehanizmov celic CHO v industrijskih celičnih kulturah je pomembno za izboljšanje stanovitnosti procesov in kakovosti produktov. Zadnja leta je uporaba omičnih pristopov in sistemsko biologije omogočila globlji vpogled v celično fiziologijo in v produkcijo rekombinantnih proteinov celic CHO (Farrell in sod., 2014). Na podlagi objavljenega genomskega zaporedja celic CHO K1 (Xu in sod., 2011) v zadnjih letih s komplementarnimi transkriptomskimi in proteomskimi študijami dobivamo pregled nad 24.383 geni in 29.291 transkripti celic CHO (Baycin-Hizal in sod., 2012).

Najpogosteje se proteomsko profiliranje izvaja na podlagi gelskega ločevanja proteinov, torej z metodama 2D in 2D-DIGE, ter na podlagi LC-MS/MS. Proteomske analize so v študijah pogosto izvedene in objavljene skupaj s transkriptomskimi, genomskimi ali metabolomskimi analizami. Veliko proteomskega analiz, predvsem 2D-DIGE in LC-MS/MS, je bilo objavljenih na temo vpliva znižane temperature gojenja (poglavlje 2.2),

hitrosti rasti populacije celic, produktivnosti, dodatkov h gojišču, časa kultivacije oziroma števila pasaž ...

Ena prvih večjih proteomskih map celic CHO je bila izvedena s konvencionalno 2D-elektroforezo in uporabljenim barvilom SYPRO Ruby ter MS. Z MS so identificirali 224 proteinov in s fosfoprotein-specifičnim označevanjem zaznali 672 fosforiliranih proteinov, kar je 36 odstotkov vseh zaznanih proteinskih lis na gelu (Hayduk in sod., 2004). Baik in sod. (2006) so malo pozneje poročali o vplivu nižje temperature gojenja (33°C) na celice CHO, ki producirajo EPO, rezultati analiz pa so opisani v poglavju 2.2. Vpliv je bil hkrati evaluiran z mikromrežami cDNK in proteomsko analizo, narajeno s konvencionalno elektroforezo 2D.

Z razvojem metode 2D-DIGE se je ta v zadnjem desetletju oziroma desetletju in pol razširila in je bila zelo pogosto uporabljena za proteomske analize celic CHO. V obsežni študiji, ki je zajemala proteomsko (2D-DIGE) in transkriptomsko analizo, so pri dveh mAb producirajočih celičnih linijah CHO primerjali hitro in počasi rastoči klon (v pomenu rasti populacije celic). Obe primerjavi, posamezna celična linija je bila statistično obelana ločeno, sta rezultirali v 118 genskih transkriptih, ki so bili statistično značilno različno izraženi, ter v 58 proteinih, katerih vsebnost se je statistično značilno razlikovala med hitro in počasi rastočima klonoma. Iz obeh primerjav so dobili seznam 21 kandidatnih genov oziroma proteinov, povezanih s fenotipom hitre rasti. Nadalje so izvedli funkcionalno analizo z uporabo utišanja z siRNK s petimi od 21 kandidatnih genov oziroma proteinov (ACTR1A, ENO1, HSPA5, HSPB1 in VCP) ter s povečanjem izražanja cDNK VCP (valozin vsebujoči protein). Ugotovili so, da ima VCP pomembno vlogo pri rasti populacije celic in viabilnosti, natančneje pri celični proliferaciji. Utišanje gena za HSPB1 je negativno vplivalo na rast populacije celic, utišanje gena za ENO1 pa pozitivno (Doolan in sod., 2010).

Zaradi ugodnega vpliva glicin betaina na produktivnost celic in glikozilacijo rekombinantnega proteina so Kim in sod. (2012) z uporabo 2D-DIGE in MS identificirali proteine, ki vplivajo na hitrost rasti celic in na njihovo produktivnost, njihova vsebnost pa je bila statistično različna po uporabi glicin betaina in zvišanju osmolalnosti. Glicin betain je močan osmoprotektant, njegov dodatek h gojišču pa prepreči upočasnitev rasti populacije celic zaradi zvišane osmolalnosti, ki se pojavi kot posledica dodajanja NaOH ali natrijevh soli v namen uravnavanja pH gojišča. Identificirali so 16 proteinov, katerih vsebnost je bila statistično značilno različna po dodatku glicin betaina in zvišanja osmolalnosti. Identificirani proteini sodelujejo pri celičem metabolizmu (PEPCK, GAPDH in PK), celični zgradbi (β -tubulin in β -aktin), zvitju proteinov (GRP78 in OSP94), mRNK procesiranju (Rbm34, ACF, IPMK) in izločanju proteinov (γ -COP).

Zanimivo in zelo sistematično študijo so naredili in objavili Beckmann in sod. (2012). Kar 420 dni so v stresalnih plastenkah kultivirali in precepljali celice CHO, ki proizvajajo mAb. Med kultivacijo so spremljali hitrost rasti populacije celic, produktivnost, intracelularno količino rekombinantnega proteina, koncentracijo metabolitov, vmes pa so periodično shranjevali vzorce celic, ki so jih pozneje analizirali na metabolomskem, proteomskem in transkriptomskem nivoju. Proteomska analiza 2D-DIGE je pokazala, da se s časom oziroma številom pasaž aktivnost glikolize povečuje (PGAM1, PGK1 in KPYMP) in da so celice v smislu povečane vsebnosti (ne ER) antistresnih proteinov (GRP75, HSP7C, HSPB1, FKBP4) čedalje bolj robustne, posledično pa tudi manj občutljive za spremembe v vrednosti pH kulture (Beckmann, 2012).

Wei in sod. (2012) so se v svoji raziskavi osredotočili na spremembe v proteomu celic CHO med podaljšano kultivacijo, ko se, zaradi različnih dejavnikov, kot sta pomanjkanje nutrientov in akumulacija odpadnih produktov, frekvenca apoptoze celic poveča. S proteomsko analizo 2D-DIGE so primerjali vzorce več poznejših časovnih točk (4–9 dni) z dvodnevnim vzorcem, ki je bil predpostavljen kot »zdrav« vzorec brez apoptoze. Identificirali so 40 proteinov, katerih vsebnost se je s časom kultivacije statistično značilno spremenjala. Šlo je za štiri proteine citoskeleta, 10 šaperonov in proteinov zvitja, sedem metabolnih proteinov in sedem proteinov z različnimi oziroma raznovrstnimi funkcijami. Ugotovili so, da je povečana vsebnost šaperonov in proteinov zvitja indikacija prisotnosti nezvitih proteinov, ki je bila povzročena s celičnim in ER-stresom, in da povečana vsebnost glikoliznih ter drugih metabolnih proteinov s časom kultivacije nakazuje spremenjanje energijskega metabolizma hkrati oziroma v povezavi z napredovanjem propadanja celične kulture.

Prvo veliko in obsežno proteomsko analizo celic CHO, ki je rezultirala v obsegu tisočih, in ne nekaj sto identificiranih proteinov, so objavili Baycin-Hizal in sod. (2012). Na osnovi objavljenega genomskega zaporedja (Xu in sod., 2011) je bilo v celičnem proteomu, sekretomu in glikoproteomu z gelsko elektroforezo, LC-MS/MS in ekstrakcijo glikoproteinov na trdni fazi (*solid phase extraction of glycopeptides*, SPEG) identificiranih oziroma izmerjenih 6164 proteinov v celicah CHO, ki igrajo ključno vlogo pri rasti celic, produkciji rekombinantnih proteinov, procesiranju proteinov, metabolizmu in celični smrti. Ugotovili so, da je od vseh identificiranih proteinov 504 proteinov N-acetiliranih in 1292 N-glikoziliranih (Baycin-Hizal in sod., 2012).

LC-MS/MS je zaradi svoje velike pretočnosti zelo uporabna in čedalje bolj uporabljeni proteomska metoda, tudi v številnih bolj specifičnih študijah. Meleady in sod. (2011) so proučevali ohranljeno produktivnost oziroma stabilnost produkcije z 10-dnevno kultivacijo ter primerjali dve celični liniji CHO, ki sta ohranjali nivo produkcije v tem časovnem

obdobju, in dve celični liniji, pri katerih je produkcija v omenjenem časovnem okviru upadala. Primerjavo stabilno in nestabilno producirajočih celičnih linij so izvedli z metodama 2D-DIGE in LC-MS/MS. Z obema so skupaj identificirali 89 proteinov, katerih vsebnost se je statistično različno razlikovala med stabilno in nestabilno producirajočimi celičnimi linijami; 12 od 89 pa je bilo takih, ki so bili identificirani tako z eno kot drugo metodo (AKRIB8, ANXA1, ANXA4, EIF3I, G6PD, HSPA8, HSP90B1, HSPD1, NUDC, PGAM1, RUVBL1 in CNN3) in imajo po vsej verjetnosti pomembno vlogo pri ohranjanju produktivnosti. Ista avtorica s sodelavci (Meleady in sod., 2012) je pozneje z metodo LC-MS/MS brez uporabljenih barvil analizirala vpliv večje ekspresije miR-7 na proteom celic CHO-SEAP. Predhodno je bilo namreč ugotovljeno, da povečano izražanje miR-7 upočasni rast populacije celic in hkrati zviša njihovo produktivnost. Ugotovili so, da 93 proteinov, katerih vsebnost je bila pri povečanem izražanju miR-7 povečana, sodeluje pri translaciji proteinov, procesiranju RNK in DNK, zvitju proteinov in njihovemu izločanju. Našli so tudi najverjetnejši tarči miR-7, statmin in katalazo, ki sta bili med 74 proteini, katerih vsebnost je bila pri povečanem izražanju miR-7 zmanjšana.

Kar nekaj proteomskeih študij je bilo narejenih o vplivu natrijevega butirata (NaBu) in povečanem izražanju Bcl-xL. NaBu poveča produkcijo rekombinantnega proteina v celicah CHO, vendar pa hkrati inducira celični stres in celično apopotozo. Ugotovljeno je bilo, da Bcl-xL inhibira apopotozo, inducirano zaradi dodatka NaBu, zato so celice CHO, pri katerih je izražanje Bcl-xL povečano, zanimive z vidika proizvodnje rekombinantnih proteinov (Baik in sod., 2010). O vplivu NaBu na proteom celic CHO so med prvimi poročali Van Dyk in sod. (2003), ki so poleg NaBu gojišču dodajali še cinkov sulfat ($ZnSO_4$), ki produktivnost celic še zviša. S proteomsko analizo s konvencionalno elektroforezo 2D so ugotovili, da se po dodatku NaBu ali $ZnSO_4$ in tudi po dodatku obeh hkrati poveča produkcija rekombinantnega proteina. Pri dodatku NaBu se je povečala vsebnost proteinov GRP75 in C1 (homolog HSP70), pri dodatku $ZnSO_4$ ali obeh hkrati pa vsebnost GRP75, C1, enolaze, tioredoksina in citokrom C oksidaze. Baik in sod. (2010) so s proteomsko analizo 2D-DIGE ugotovili, da povečano izražanje Bcl-xL v prisotnosti NaBu inhibira apopotozo in vpliva na celično proliferacijo in preživetje. Vpliv povečanega izražanja Bcl-xL na proteom celic CHO so prav tako proučevali Carlage in sod. (2012). Ugotovili so, da je v stacionarni fazni celic, pri katerih je izražanje Bcl-xL povečano, povečana vsebnost šaperonov (npr. GPR78) in disulfidnih izomeraz.

V biotehnologiji je predvsem v procesu razvoja rekombinantne celične linije zanimiva metodologija, ki temelji na masni spektrometriji (MALDI-TOF) celih oziroma intaktnih celic, saj omogoča hitro karakterizacijo in identifikacijo celičnih klonov z želenimi lastnostmi na osnovi markerskih proteinov na površini celic. Dve ločeni študiji, narejeni na celicah CHO z omenjeno tehnologijo, so objavili Feng in sod. (2010 in 2011). Obe študiji se

nanašata na produkcijo in produkcijsko stabilnost, pri čemer je bil tarčni oziroma markerski protein rekombinantni IgG oziroma INF- γ . Na osnovi celičnih markerskih proteinov bi lahko metodo vpeljali tudi za karakterizacijo in identifikacijo drugih želenih lastnosti celic (stabilnost, viabilnost celic ...).

2.7 METODE LOČEVANJA PROTEINOV IN IDENTIFIKACIJA PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Proteomika je veda, ki se ukvarja z analizo proteoma, ta pa je definiran kot nabor vseh proteinov, ki so v določenem trenutku prisotni v specifičnem tkivu, organu, celici, organelu ... Za ločevanje kompleksnih proteinskih vzorcev sta se najbolj uveljavili poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) in tekočinska kromatografija (LC).

Pri proteomskeih analizah, ki temeljijo na 2D-elektroforeznem ločevanju proteinov ali peptidov, ločimo dva osnovna koraka, in sicer ločevanje proteinov ali peptidov glede na njihovo izoelektrično točko in molekulsko maso, in njihovo identifikacijo z visokopretočnimi metodami.

V zadnjem desetletju se v namen proteomskeih analiz najpogosteje uporablja metoda 2D-DIGE, predvsem zaradi visoko občutljivih barvil, kinetike označevanja proteinov in možnosti nanosa in detekcije treh različnih vzorcev proteinov na istem gelu, kar omogoča uporabo internega standarda, poleg tega pa zaradi uporabe internega standarda, specifičnega načrtovanja eksperimenta in specifične kvantifikacije rezultatov tehnične ponovitve niso potrebne.

Zaradi velike pretočnosti je v zadnjih letih čedalje bolj uporabljena proteomska metoda LC-MS/MS, pri kateri gre za metodo ločevanja z LC in direktna skloplitev LC z MS.

Z masno spektrometrijo določamo maso proteinov, ki jih v primeru predhodnega gelskega ločevanja izrežemo iz gela ter pripravimo za nanos na masni spektrometer (MS). V primeru ločevanja proteinov z LC se ti prenesejo na sklopljen MS. Pogoj za analizo je, da pripravljeni vzorec za nanos na MS oziroma analit spravimo v plinsko fazo. To dosežemo z ionizacijo z laserji (MALDI) ali elektrorazprševanjem (ESI). Na podlagi dobljenih spektrov peptidnega kartiranja ali tandemske masne spektrometrije ter z uporabo ustreznih algoritmov in podatkovnih baz izvedemo identifikacijo proteinov.

2.7.1 2D in 2D-DIGE

Elektroforeza 2D-DIGE (Ünlü in sod., 1997) temelji na konvencionalni elektroforezi 2D (2D EF), pri kateri poteka ločevanje proteinov v dveh ločenih korakih glede na dve neodvisni lastnosti proteinov. V prvi dimenziji poteka ločevanje proteinov glede na njihovo izoelektrično točko, v drugi dimenziji pa proteine ločujemo glede na molekulske maso na poliakrilamidnem gelu v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (Rabilloud, 2000).

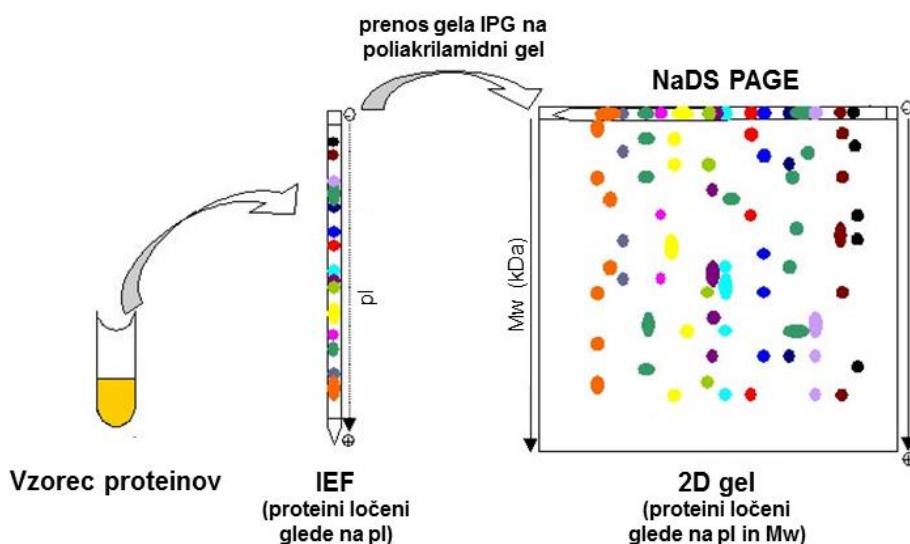
V prvi dimenziji z izoelektričnim fokusiranjem (IEF) ločujemo proteine glede na izoelektrično točko (pI) v šibko zamreženem gelu z gradientom pH. pI predstavlja pH, pri katerem je neto naboj proteina 0. Protein ima pri pH, različnem od izoelektrične točke, električni naboj, zato v električnem polju potuje, dokler ne doseže pH, ki je enak pI, pri čemer se naboj izniči oziroma izgubi, in posledično protein na gelu obmiruje. V zadnjem času se uporabljajo imobilizirani pH-gradienti (IPG) (Görg in sod., 1988), pri katerih so kisle in bazične skupine kovalentno vezane na poliakrilamidno mrežo gela, zato je gradient fiksiran. Dodana vrednost IPG so boljša ponovljivosti in ločljivost, doseganje bolj ekstreminih vrednosti pH in večja kapaciteta nanosa proteinov. Ločljivost je odvisna predvsem od jakosti električnega polja, zato poteka IEF pri visoki napetosti (do 10000 V). Zaradi visokega električnega toka se celoten sistem, vključno z gelom, greje, kar vpliva na pI molekul. Celoten sistem je zato treba med celotnim potekom elektroforeze 2D hladiti. Za zagotovitev minimalnih količin nabitih snovi so v komponentah raztopin za IEF nevtralne molekule. Raztopine za IEF vsebujejo denaturant za vzdrževanje denaturiranega stanja proteinov (urea, za povečanje topnosti membranskih proteinov pogosto v kombinaciji s tioureo) (Rabilloud, 1998), detergent za preprečevanje agregacije proteinov preko hidrofobnih interakcij (v obliki ionov dvojčkov (zwitterionski) detergenti CHAPS in sulfobetaini, redko neionski detergenti), reducent za vzdrževanje cisteinov v reduciranem stanju (DTT) in nosilne amfolite za preprečevanje agregacije proteinov preko ionskih interakcij ter zagotavljanje bolj enakomerne prevodnosti (IPG pufer, Pharmalytes). Dodatno uporaba DeStreak reagenta izboljša ločevanje bazičnih proteinov v prvi dimenziji in posledično reproducibilnost metode (Olsson in sod., 2002).

Pred prenosom gela z IPG na poliakrilamidni gel in izvedbo druge dimenzije je treba proteine v gelu z IPG uravnotežiti, in sicer z inkubacijo gela z IPG v raztopini z DTT za vzdrževanje cisteinov oziroma proteinov v reduciranem stanju ter inkubacijo v raztopini z iodoacetamidom, ki veže odvečne molekule DTT (Görg in sod., 1987).

V drugi dimenziji ločimo proteine glede na molekulske maso. Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE) je dolgo znana in uveljavljena metoda (Laemmli, 1970). Temelji na uporabi detergenta natrijevega

dodecilsulfata (NaDS), ki se veže na proteine v konstantnem razmerju 1,2 g NaDS-a na gram proteina in te denaturira. Denaturacija proteinov in konstantno razmerje mase in naboja zagotavlja ločevanje proteinov v električnem polju glede na njihovo velikost. Manjši proteini potujejo skozi zamreženo strukturo gela hitreje kot večji. Gel z IPG na površino gela za drugo dimenzijo položimo horizontalno in ima poleg ločevanja proteinov gleda na pI tudi vlogo koncentracijskega gela. (slika 9).

Z 2D EF lahko glede na velikost gela na posameznem gelu ločimo več 1000 proteinov. Teoretična kapaciteta gelov velikega formata (20 x 26 cm) je 10000 ločenih proteinov. Zaradi medgelske variabilnosti je treba pri konvencionalni 2D EF isti vzorec analizirati večkrat, kar imenujemo tehnične ponovitve. Praviloma poskuse načrtujemo z vsaj tremi biološkimi ponovitvami in tremi tehničnimi ponovitvami vsakega vzorca.



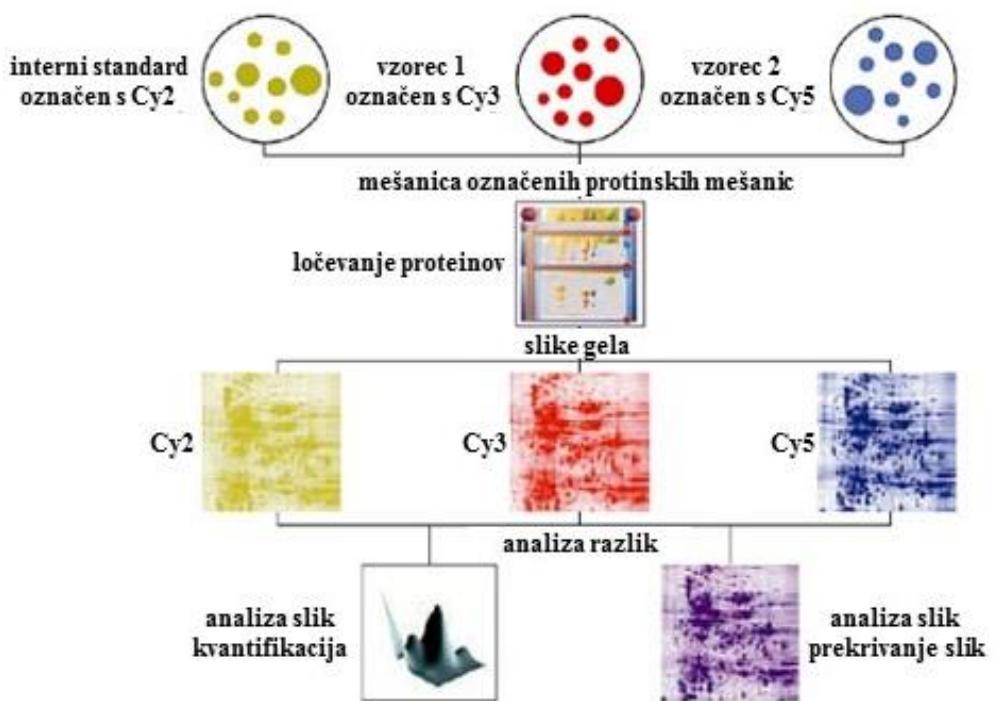
Slika 9: Shematski prikaz poteka 2D EF. Proteinski vzorec nanesemo na gel z IPG (levo), kjer se proteini ločijo glede na izoelektrično točko, nato pa ta gel prenesemo na površino gela za NaDS-PAGE (desno), kjer se proteini ločijo še po molekulski masi (prirejeno po Creative proteomics, 2016).

Figure 9: Schematic presentation of 2D EF workflow. Protein sample is applied to an IPG gel (left), where proteins separate according to their isoelectric point. Afterwards, the gel is transferred to the surface of NaDS -PAGE gel (right), where proteins separate according to molecular mass (adapted from Creative proteomics, 2016).

V primeru 2D EF izvedemo detekcijo proteinov v gelu z različnimi barvili, ki se med sabo razlikujejo po občutljivosti in linearjem dinamičnem območju. Po zajemu slike s čitalnikom izvedemo kvantifikacijo z ustrezeno programsko opremo. Kvantifikacija je praviloma relativna, kar pomeni, da je količina posameznega proteina izražena kot delež volumna proteinske lise v skupnem volumnu vseh lis na gelu. Na ta način so razlike v količini nanesenih proteinov in barvanju odpravljene.

Dvodimenzionalna diferencialna elektroforeza, 2D-DIGE, je izboljšana različica tehnologije 2D EF (Unlü, 1997). Glavna prednost tehnologije 2D-DIGE je obvladovanje tehnične variabilnosti, ki je posledica medgelskih razlik. Pri 2D-DIGE uporabljamo tri različna fluorescentna barvila (Cy2, Cy3 in Cy5), katerih absorpcijski in emisijski spektri so dobro ločeni. Z omenjenimi barvili proteine označimo pred posopkom 2D EF. Barvila so usklajena v masi (proteinom dodajo približno 500 Da) in naboju, kar omogoča usklajeno migracijo proteinov v gelu ne glede na barvilo, s katerim so označeni. NHS estri barvil Cy reagirajo z ϵ -aminskimi skupinami lizinov na proteinih. Kinetika reakcije označevanja je takšna, da označimo približno 3 odstotke vsakega proteina v mešanici, večkratnega označevanja posameznega proteina pa načeloma ni. Bistvena dodana vrednost tehnologije 2D-DIGE je uporaba internega standarda. Ta je mešanica enakih alikvotov vseh vzorcev, zato vsebuje vse proteine, ki so v posameznih vzorcih. Interni standard praviloma označimo z barvilm Cy2, vzorce pa z drugima dvema barvilmoma, Cy3 in Cy5. Vzorce istega obravnavanja označimo z obema barvilmoma (ločeno), da izključimo možnost preferenčnega označevanja. Na posamezni gel nato nanesemo po dva vzorca (eden je označen s Cy3, drugi s Cy5) in interni standard (označen s Cy2). Po koncu elektroforeze z ustreznim čitalnikom zajamemo tri ločene slike, po eno za vsako barvilo (imenujemo jih tudi proteinske mape). Proteinske lise relativno kvantificiramo za vsako sliko ozziroma proteinsko mapo posebej, nato pa se količina proteina v obeh vzorcih na gelu izrazi kot razmerje med relativnim volumnom lise v vzorcu in relativnim volumnom lise v internem standardu. Ker je interni standard na vseh gelih identičen, z njim odpravimo tehnično variabilnost med geli, saj se proteini na istem gelu obnašajo enako.

Prednost 2D-DIGE na osnovi visoko občutljivih barvil, kinetike označevanja proteinov, možnosti nanosa in detekcije treh različnih proteinskih mešanic na istem gelu ter implementacije internega standarda so zanesljivost kvantitativnih rezultatov, manjše število potrebnih gelov (dva vzorca na istem gelu in brez potrebnih tehničnih ponovitev) ter boljše in lažje usklajevanje med geli.



Slika 10: Shematski prikaz 2D-DIGE. Na enem gelu ločujemo 3 vzorce, označene z različnimi fluorescenčnimi barvili, kar nam omogoča zajem treh ločenih slik iz istega gela (GE Healthcare, 2012).

Figure 10: Schematic presentation of 2D-DIGE. Separation of 3 samples, labelled with different fluorescent dyes, takes place in a single gel. Afterwards, three separate images are acquired from the same gel (GE Healthcare, 2012).

2.7.2 Tekočinska kromatografija (LC)

Za ločevanje kompleksnih proteinskih vzorcev se v proteomiki uporablja tudi tekočinska kromatografija (LC). Pri LC na eni ali več kromatografskih kolonah ločujemo peptide proteolitično razgrajenih proteinov v vzorcu. Za izboljšanje resolucije ločevanja na eni koloni se pogosto uporablajo kombinacije več (najpogosteje dveh ali treh) zaporednih kolon, tako da poteka ločevanje v več (dveh ali treh) dimenzijah. Najpogosteje uporabljena kombinacija sta ionsko izmenjevalna kromatografija na močnem kationskem nosilcu in kromatografija na reverzni fazi. Velika prednost LC je možnost direktne sklopitve LC s kapilaro masnega spektrometra z ionizatorjem tipa ESI. LC in njena direktna sklopitev z MS omogoča visoko pretočne proteomske analize (LC-MS/MS) (Kislinger in Emili, 2005).

2.7.3 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo (MS)

Masno spektrometrijo uporabljamo za identifikacijo proteinov, ki jih pred analizo encimsko razgradimo na peptide. V primeru 2D EF lise izrežemo iz gela, proteine encimsko razgradimo na peptide in te ekstrahiramo iz gela. Z masno spektrometrijo določamo maso analitov, ki jih je treba spraviti v plinasto fazo in jih ionizirati. Ionizacijo izvedemo z enim od dveh tipov ionizatorjev. Prvi, MALDI, temelji na ionizaciji v matriksu z desorpcijo z laserjem (Tanaka in sod., 1988), drugi, ESI, pa temelji na ionizaciji z elektrorazprševanjem (Fenn in sod., 1989).

V primeru ionizatorja MALDI vzorec skupaj z matriksom (organska kislina, ki dobro absorbira lasersko svetlobo) nanesemo na kovinsko ploščo. Molekule matriksa absorbirajo svetlobo laserja in odparevajo s površine, hkrati pa z njimi v plinsko fazo odpotuje tudi nekaj molekul analita. Med odparevanjem ionizira tudi matriks, tako da dobimo v plinski fazi nad ploščo zmes molekul ($[M]$) in ionov ($[M+H]^+$ in $[M-H]^-$). Zaradi trkov med matriksom in analitom pride tudi do ionizacije molekul analita ($[A]$), ki se pretvorijo v ione analita z enkratnim nabojem ($[A+H]^+$ in $[A-H]^-$).

Pri ESI vzorec dovajamo po kapilari, kjer je visok električni potencial, zato iz kapilare izhajajo nabite kapljice, ki nadalje zaradi odbojnih sil razpadajo v čedalje manjše kapljice (nastane aerosol). Ko topilo odpari, naboj prevzamejo molekule analita, ki se posledično pretvorijo v večkrat nabite ione.

Po ionizaciji z enim izmed ionizatorjev ionizirani analit pospešimo v električnem polju do analizatorja. Analizator določi razmerje med maso in nabojem analita. Najpogosteje uporabljeni analizatorji so: analizator na čas preleta ionov (time of flight, TOF), ionska past (ion trap, IT), kvadrupol (v konfiguraciji trojni kvadrupol ali v kombinaciji s TOF ali IT), Orbitrap in analizator na ionsko ciklotronsko resonanco s Fourierjevo transformacijo (FT-ICR).

Na podlagi dobljenih spektrov peptidnega kartiranja ali tandemske masne spektrometrije in z uporabo ustreznih algoritmov in podatkovnih baz izvedemo identifikacijo proteinov.

Pri peptidnem kartiraju gre za določanje mase peptidov, ki smo jih dobili z razgradnjo proteina, izrezanega iz gela 2D. Aminokisline, iz katerih so sestavljeni peptidi, imajo različno maso (razen levcina in izolevcina ter glutamina in lisina), zato je ta za vsak peptid specifična. Seznam mas peptidov določenega proteina je posledično nekakšen proteinski prstni odtis. S primerjavo izmerjenih mas peptidov in teoretičnih mas peptidov, ki jih izračunamo iz aminokislinskih zaporedij, poiščemo v bazah podatkov identiteto proteina.

V ta namen se najpogosteje uporablja algoritma Mascot (Perkins in sod., 1999) in Sequest (Eng in sod., 1994). Pogoj za uspešno identifikacijo proteina je obstoj njegovega zaporedja v bazi podatkov. Peptidno kartiranje je uspešno le pri proteinih tistih organizmov, pri katerih je bilo določeno nukleotidno zaporedje celotnega genoma. Ker potrebujemo za identifikacijo ujemanje mas več peptidov, podajamo rezultat s številom ujemajočih se mas peptidov in pokritosti zaporedja celotnega proteina. Ustreznost identifikacije preverimo s primerjavo teoretičnih (izračunanih) vrednosti pI in M_w zadetka z dejansko pozicijo proteina na gelu, ki je odvisna od dejanskih vrednosti pI in M_w , ter taksonomskim izvorom zadetka.

Tehnologijo tandemse masne spektrometrije uporabimo, kadar genomsko zaporedje organizma, s katerim delamo, ni znano. Pri tandemski masni spektrometriji posamezne peptide, ki smo jim določili maso, izoliramo in jih fragmentiramo. Fragmentacija poteče v kolizijski celici, peptidi pa razpadajo na različne načine glede na tip in energijo fragmentacije (Dass, 2001). Glede na to, kateri del molekule po fragmentaciji prevzame električni naboj, nastanejo ioni b (naboj prevzame N-terminalni del) in y (naboj prevzame C-terminalni del). Mase nastalih fragmentov ponovno izmerimo, zadetke pa lahko najdemo s primerjavo mas fragmentov s teoretičnimi masami fragmentov peptidov iz baz podatkov ali z določanjem aminokislinskega zaporedja peptida *de novo* z računalniškim algoritem (npr. PepNovo) in nadaljnjam iskanjem zadetkov v bazi podatkov z algoritmi za iskanje podobnih zaporedij, kot sta FASTA ali BLAST. V obeh primerih lahko dobimo zadetke tudi iz sorodnih vrst pod pogojem, da je zaporedje homolognega proteina dovolj podobno.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Eksperiment smo izvedli s tremi celičnimi linijami: starševsko celično linijo CHO derivat 3 (starševska CHO-*Der3*), rekombinantno celično linijo CHO-*Der3*, ki proizvaja monoklonsko protitelo (mAb) (mAb CHO-*Der3*), in rekombinantno celično linijo CHO-*Der3*, ki proizvaja mAb in je adaptirana na metotreksat (MTX) (mAb CHO-*Der3-MTX*).

Rekombinantni celični liniji mAb CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX*, ki proizvajata mAb, predstavljata isti klon, mAb CHO-*Der3*, ki je bil izbran po transfenkciji plazmida, selekcijskem pritisku, kloniranju in procesu izbora klena. Klon je bil pozneje adaptiran na prisotnost MTX v gojišču, kar je posledično rezultiralo v celični liniji CHO-*Der3-MTX*. Namen izbora omenjenih celičnih linij v raziskavi je bil preveriti morebitni vpliv selekcijskega pritiska in adaptacije celic na prisotnost MTX v gojišču, na odziv celic na spremenjene parametre gojenja.

Vse tri celične linije so bile predhodno adaptirane na rastno gojišče, ki je vsebovalo 8 mM glutamina (Sigma) in 1 mg/L inzulina (Sigma), in v primeru celične linije mAb CHO-*Der3-MTX* – 150 nM MTX (Sigma).

Vse tri celične linije so bile predhodno namnožene in shranjene v 7,5 % raztopini dimetilsulfoksida (DMSO) pri –85 °C.

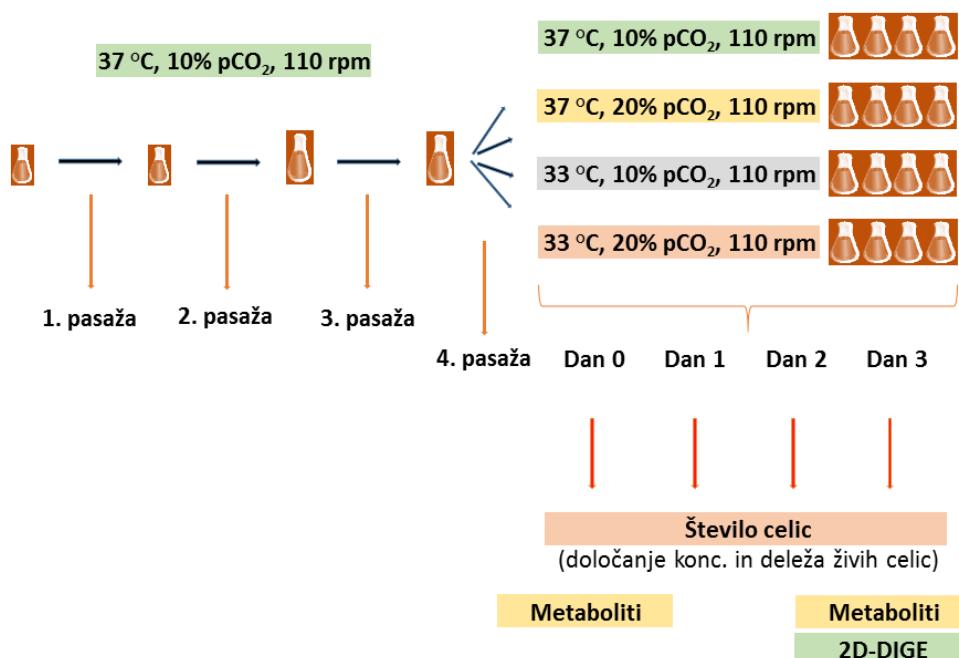
3.2 EKSPERIMENTALNO DELO

3.2.1 Opis eksperimenta

Vsako od treh celičnih linij, starševsko CHO-*Der3*, mAb CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX*, smo odtalili, nacepili v gojišče in jih z nekaj pasažami gojili pri običajnih pogojih gojenja (37 °C, 10 % pCO₂ in 110 rpm). V tem času naj bi si celice opomogle od odtalitve in dosegle optimalno vitalnost (adaptacija). S postopnim povečevanjem volumna kulture v času adaptacije celic smo želeli pridobiti tudi zadostno količino celic, da bi jih lahko za končni del poskusa, gojenje pri štirih različnih pogojih glede na temperaturo in pCO₂ (37 °C in 10 % pCO₂, 37 °C in 20 % pCO₂, 33 °C in 10 % pCO₂ ter 33 °C in 20 % pCO₂) gojili v petih paralelah (pet bioloških ponovitev).

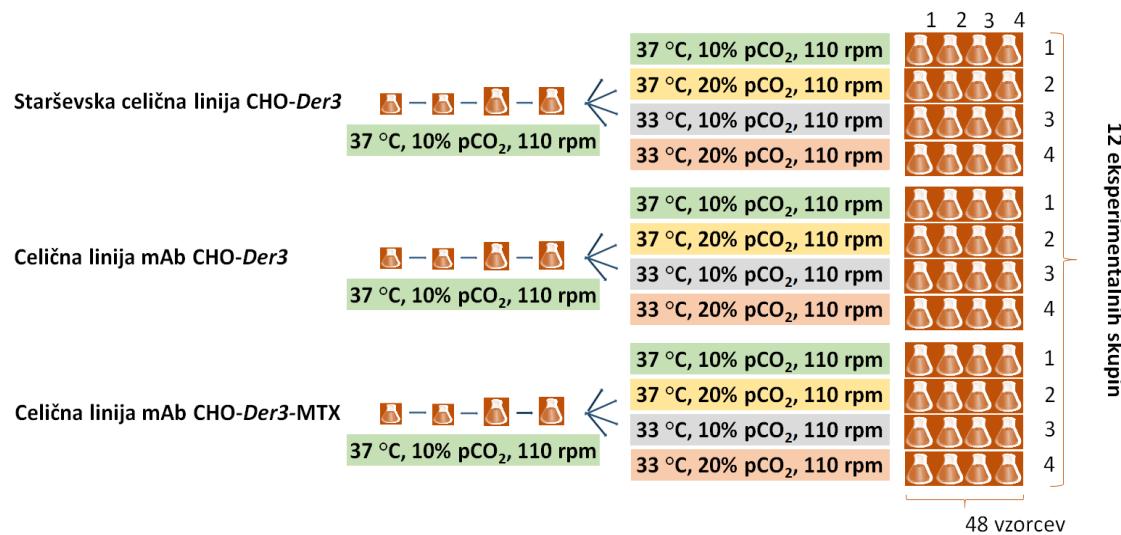
Celice smo gojili pri spremenjenih in različnih pogojih 72 ur. V tem času smo peto biološko ponovitev pri vsakem od štirih pogojev gojenja vzorčili vsak dan za določanje števila celic za pripravo rastne krivulje in izračun viabilnosti celic. Peta biološka ponovitev je služila zgolj kot kontrola za vsakodnevno spremljanje hitrosti rasti populacije in viabilnosti celic. Po 72 urah smo preostale štiri biološke ponovitve celičnih kultur vzorčili za določanje števila in viabilnosti celic, za določanje dveh substratov in metabolita v gojišču (glutamin, glukoza in laktat) in za izolacijo celičnih proteinov za eksperiment 2D-DIGE.

Poskus je bil končno izveden na treh celičnih linijah (starševska CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX), gojenih pri štirih različnih pogojih gojenja (37°C in 10 % pCO₂, 37°C in 20 % pCO₂, 33°C in 10 % pCO₂ ter 33°C in 20 % pCO₂), pri vsakem s štirimi biološkimi ponovitvami (slika 11). Vzorci celic, gojenih pri omenjenih pogojih, so bili pobrani po 72 urah kultivacije in so predstavljali 12 eksperimentalnih skupin (tri celične linije, vsaka gojena pri štirih različnih pogojih). Vsaka od 12 eksperimentalnih skupin je bila pripravljena v štirih bioloških ponovitvah, kar je rezultiralo v 48 vzorcih za nadaljnjo obdelavo (slika 12).



Slika 11: Shematski prikaz pasiranja in vzorčenja celičnih kultur med izvedbo eksperimenta.

Figure 11: Schematic presentation of cell culture passaging and sampling during experiment.



Slika 12: Shematski prikaz obsega eksperimenta.

Figure 12: Schematic presentation of experimental design.

3.2.2 Gojenje celic in vzorčenje kulture

3.2.2.1 Odtalitev zamrznjenih celic in priprava vcepka

Celične linje smo pred začetkom gojenja odmrznili in nacepili v gojišče, ki vsebuje 8 mM glutamina (Sigma), 1 mg/L inzulina (Sigma) in v primeru mAb CHO-Der3-MTX – 150 nM MTX (Sigma).

Celice smo odmrznili in nacepili po naslednjem postopku:

- Vialo, ki vsebuje 1×10^7 celic, smo odtalili v vodni kopeli pri 37 °C (približno 4 min).
- Vsebino viale smo s pipeto prenesli v 25 mL centrifugirko in vanjo počasi po kapljicah dodajali 10 mL hladnega gojišča (4 °C).
- Centrifugirali smo 5 min pri 250 x g in 20 °C.
- Supernatant smo odpipetirali, celicam dodali 10 mL predhodno ogretega gojišča (37 °C) in jih previdno resuspendirali.
- Resuspendirane celice smo prenesli v 125 mL stresalno plastenko, SF125 (Corning), v kateri je bilo 15 mL predhodno ogretega gojišča (37 °C), ter premešali.

Pred začetkom gojenja je bila koncentracija celic v 25 mL kulture 2×10^5 celic/mL.

3.2.2.2 Gojenje celic

Celične kulture smo po nacepitvi (poglavje 3.2.2.1) gojili v stresalnih inkubatorjih Kühner 13 dni pri 37 °C, 10 % pCO₂ in 110 rpm. V tem času smo posamezno celično kulturo trikrat pasirali z vcepkom $2,5 \times 10^7$ živih celic in pri drugi pasaži povečali volumen celične kulture s 25 mL na 50 mL. Do četrte pasaže smo celične kulture gojili v 250 mL stresalnih plastenkah SF250 (Corning). Pri četrti pasaži smo nacepili 3×10^7 živih celic v 100 mL gojišča v 500 mL stresalni plastenki SF500 (Corning), da je bila koncentracija celic v kulturi 3×10^5 celic/mL. Pripravljene celične kulture smo prenesli v štiri stresalne inkubatorje, v katerih so bili v vsakem nastavljeni drugačni fizikalni parametri:

- 37 °C, 10 % pCO₂ in 110 rpm
- 37 °C, 20 % pCO₂ in 110 rpm
- 33 °C, 10 % pCO₂ in 110 rpm
- 33 °C, 20 % pCO₂ in 110 rpm

Pri štirih različnih pogojih gojenja, ki je vključevalo dve različni temperaturi gojenja (33 °C in 37 °C) in dve različni vrednosti parcialnega tlaka CO₂ (10 % in 20 %), smo celične kulture gojili naslednjih 72 ur. Shema gojenja oziroma pasiranja ter vzorčenja celičnih kultur je prikazana na sliki 11.

3.2.2.3 Določanje števila in viabilnosti celic

Za določanje koncentracije živih celic v kulturi in viabilnosti celic (t. j. deleža živih celic v kulturi) smo iz posamezne celične kulture odvzeli po 1 mL vzorca (celične kulture) in ga pomerili z napravo za štetje celic (Vi-Cell XR; Beckman Coulter). Meritev z napravo za štetje celic temelji na barvanju celic s tripanskim modrilom. Naprava za štetje celic iz pripravljenega vzorca celične kulture odvzame 500 µL in mu doda tripansko modrilo v razmerju 1:1. Barvilo skozi poškodovano membrano vstopi v notranjost celice, žive celice pa ostanejo neobarvane. Naprava iz tako pripravljenega vzorca zajame 50 alikvotov, naredi posnetke in na osnovi barve celic v sivi skali programsko za vsak alikvot definira število živih in mrtvih celic. Iz 50 meritev preračuna povprečno koncentracijo celic in poda končno koncentracijo živih celic (število živih celic/mL kulture) in delež živih celic (viabilnost (%)) v kulturi.

Koncentracijo živih celic in viabilnost celic smo izmerili vsak dan ob približno istem času v celični kulturi, ki je predstavljala peto biološko ponovitev oziroma kontrolo za vsakodnevno spremeljanje hitrosti rasti populacije in viabilnosti celic. Na podlagi meritve smo izračunali reprezentativne rastne krivulje za vsako celično linijo pri vseh štirih pogojih gojenja.

V vsaki posamezni celični kulturi smo koncentracijo in viabilnost celic izmerili pred vsakim pasiranjem in na koncu pred vzorčenjem celičnih kultur za 2D-DIGE. Meritev je bila podlaga za izračun potrebnega volumna kulture, v katerem je potrebno število živih celic za vcepek oziroma vzorec celic za 2D-DIGE.

3.2.2.4 Merjenje koncentracije substratov glutamina in glukoze ter metabolita laktata

Za meritve koncentracij glutamina, glukoze in laktata v celičnih kulturah smo takoj po 4. pasaži in neposredno pred vzorčenjem celičnih kultur za 2D-DIGE odvezeli 1mL kulture in omenjene metabolite pomerili z avtomatskim analizatorjem (BioProfile 400; Nova Biomedical). Naprava meritve omenjenih substratov in metabolita izvede z amperometričnimi platinastimi kisikovimi elektrodami, na katerih so membrane z vezanimi encimi. V prisotnosti posameznega metabolita in kisika tvorijo encimske reakcije vodikov peroksid, ki se na platinasti anodi pri konstantnem potencialu oksidira. Pretok elektronov je sorazmeren koncentraciji posameznega metabolita v kulturi.

Meritve koncentracij omenjenih substratov in metabolita v celičnih kulturah smo pozneje uporabili za primerjavo metabolne aktivnosti celic pri različnih pogojih gojenja. Splošni metabolni trend smo prikazali v obliki grafov kot spremembo v koncentraciji posameznega substrata ali metabolita med dnevom 0 in po treh dneh gojenja, za vse tri celične linije, štiri različne pogoje gojenja in štiri biološke ponovitve. Iz metabolnih podatkov smo izračunali tudi specifične vrednosti produkcije ali porabe posameznih metabolitov ali substrata, pri čemer smo upoštevali povprečne vrednosti štirih bioloških ponovitev. Specifične vrednosti se nanašajo na porabo posameznega substrata oziroma produkcijo metabolita ene celice v enem dnevnu. Specifične vrednosti smo izračunali z uporabo enačb (1), (2), (3) in (4):

$$\text{IVCC} \left[\frac{\text{celica} \times \text{dni}}{L} \right] = \frac{(a+b) \times t}{2} \quad \dots (1)$$

IVCC ... integrirana koncentracija živih celic (*integrated viable cell concentration*)
a ... povprečna gostota živih celic po nacepitvi ($t = 0 \text{ dni}$)
b ... povprečna gostota živih celic po 3 dnevih gojenja ($t = 3 \text{ dni}$)
t ... čas kultivacije (3 dni)

$$\text{Specifična poraba glukoze} \left[\frac{g}{\text{celica} \times \text{dan}} \right] = \frac{c_0 - c_t}{IVCC} \quad \dots (2)$$

c_0 ... povprečna koncentracija glukoze $\left[\frac{g}{L} \right]$ po nacepitvi ($t = 0$ dni)

c_t ... povprečna koncentracija glukoze $\left[\frac{g}{L} \right]$ po 3 dneh gojenja ($t = 3$ dni)

$$\text{Specifična poraba glutamina} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{celica} \times \text{dan}} \right] = \frac{c_0 - c_t}{IVCC} \quad \dots (3)$$

c_0 ... povprečna koncentracija glutamina $\left[\frac{\text{mmol}}{L} \right]$ po nacepitvi ($t = 0$ dni)

c_t ... povprečna koncentracija glutamina $\left[\frac{\text{mmol}}{L} \right]$ po 3 dneh gojenja ($t = 3$ dni)

$$\text{Specifična produkacija laktata} \left[\frac{g}{\text{celica} \times \text{dan}} \right] = \frac{c_t - c_0}{IVCC} \quad \dots (4)$$

c_0 ... povprečna koncentracija laktata $\left[\frac{g}{L} \right]$ po nacepitvi ($t = 0$ dni)

c_t ... povprečna koncentracija laktata $\left[\frac{g}{L} \right]$ po 3 dneh gojenja ($t = 3$ dni)

3.2.3 Priprava vzorcev za analizo 2D-DIGE

3.2.3.1 Priprava celičnih vzorcev za analizo 2D-DIGE

Na osnovi določene koncentracije živih celic v kulturi (poglavlje 3.2.2.3), smo izračunali volumen kulture, ki je vseboval $2,5 \times 10^7$ živih celic. Vzorce celic, odvzetih za analizo 2D-DIGE, smo sprali z raztopino za spiranje celic (100 mM Tris, 5 mM magnezijev acetat) in jih tako pripravili za shranjevanje.

Vzorce celic za analizo 2D-DIGE smo pripravili po postopku:

- Kulturo, ki je vsebovala $2,5 \times 10^7$ živih celic, smo prenesli v 50 mL centrifugirko (Corning) in centrifugirali 5 min pri $500 \times g$ in $4^\circ C$.
- Supernatant smo odpipetirali, celicam dodali 30 mL raztopine za spiranje celic in jih previdno resuspendirali.
- Celice v raztopini za spiranje celic smo centrifugirali 5 min pri $500 \times g$ in $4^\circ C$.
- Supernatant smo znova odpipetirali, celicam znova dodali 30 mL raztopine za spiranje celic in jih previdno resuspendirali.
- Celice v raztopini za spiranje celic smo centrifugirali 5 min pri $500 \times g$ in $4^\circ C$.
- Supernatant smo odpipetirali tako, da je v centrifugirki ostalo kar najmanj tekočine.
- Sprane celice, celični pelet, smo zamrznili v zamrzovalniku pri $-85^\circ C$.

3.2.3.2 Izolacija proteinov iz celičnih vzorcev

Iz vzorcev celic smo izolirali proteine z lizirno raztopino, ki vsebuje ureo, tioureo, Tris, detergent (CHAPS) in magnezijev acetat. Lizirna raztopina je zaradi svoje sestave kompatibilna s tehnologijo 2D-DIGE in pri pH 8,5 omogoča nemoteno vezavo barvil Cy na proteine. Detergent CHAPS raztopi celične membrane, kar povzroči lizo celic in sprostitev njihove vsebine.

Zamrznjene vzorce celic (poglavlje 3.2.3.1) smo odtalili na ledu. Takoj, ko se je celični pelet odtalil, smo nadaljevali po naslednjem postopku:

- Celični pelet smo resuspendirali v 500 µL lizirne raztopine (7 M urea, 2 M tiourea, 30 mM Tris, 4 % CHAPS, 5 mM magnezijev acetat, pH 8,5) in vse skupaj prenesli iz 50 mL centrifugirke (Corning) v 1,5 mL mikrocentrifugirko (Eppendorf).
- Vzorce v lizirni raztopini smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku, in sicer smo ji mešali 2 x po 15 s, pri maksimalni hitrosti.
- Vzorce smo homogenizirali tako, da smo jih 8 x potegnili skozi iglo debeline 21 G (guage).
- Homogenizirane vzorce smo prenesli na stresalnik (Mix-Mate; Eppendorf) in jih stresali eno uro v temi in pri sobni temperaturi.
- Homogenizirane vzorce smo centrifugirali 15 min pri $21.000 \times g$ in sobni temperaturi.
- Supernatant, ki predstavlja raztopljeni celični proteini, smo prenesli v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko (Eppendorf).
- Raztopini proteinov smo preverili pH s papirčki za določanje pH.

Za uspešno barvanje proteinov z barvili Cy v naslednjem koraku (poglavlje 3.2.3.4) je nujno, da je pH vrednost raztopine proteinov v območju med 8 in 9 (optimalno 8,5).

Vzorce raztopljenih proteinov smo shranili v zamrzovalniku pri -85°C .

3.2.3.3 Merjenje koncentracije proteinskih vzorcev

Koncentracijo proteinskih vzorcev smo izmerili z uporabo kompleta reagentov 2D Quant Kit (GE Healthcare), ki temelji na specifični vezavi bakrovih ionov na proteine. Komplet reagentov omogoča kvantitativno precipitacijo proteinov, medtem ko druge moteče substance ostanejo raztopljene in so po odstranitvi supernatanta, precipitaciji in centrifugiraju odstranjene iz vzorca. Po resuspendirjanju precipitiranih proteinov v bakrovi raztopini se del bakrovih ionov veže na proteine, nevezani pa ostanejo raztopljeni v raztopini. Nevezani bakrovi ioni se po dodatku barvne raztopine obarvajo. Intenziteta barve raztopine z raztopljenimi nevezanimi bakrovimi ioni je obratno sorazmerna s koncentracijo proteinov v vzorcu. Linearno območje, v katerem komplet reagentov omogoča natančno določitev koncentracije, je od 0 do 50 µg proteinov (Ettan DIGE System, User manual, 18-1173-17 Edition AB).

Intenziteto barve raztopine z raztopljenimi nevezanimi bakrovimi ioni smo izmerili z napravo NanoVue (GE Healthcare) pri valovnih dolžinah 480 nm in 540 nm. Koncentracijo smo izračunali z uporabo vrednosti, ki je predstavljala razliko med omenjenima valovnima dolžinama ter umeritvene krivulje v linearinem območju.

Koncentracijo proteinov smo izmerili in preračunali po naslednjem postopku:

- Pripravili smo ustrezno količino (1 mL/vzorec) delovne raztopine barvnega reagenta tako, da smo k 100 enotam reagenta A dodali 1 enoto reagenta B.
- Iz standardne raztopine BSA (koncentracija 2 mg/mL) smo odmerili ustrezen volumen (Std0 do Std5) za standardno krivuljo po naslednji tabeli:

Preglednica 1: Preglednica za pripravo standardne krivulje.

Table 1: Standard curve preparation.

Oznaka	Std0	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5
V standardne raztopine BSA (µL)	0	5	10	15	20	25
Količina BSA (µg)	0	10	20	30	40	50

- V 2 mL mikrocentrifugirke (Eppendorf) smo odmerili volumen vzorcev, ki naj bi vseboval okoli 30 µg proteinov.

Volumen vzorca, v katerem je glede na predvideno koncentracijo 30 µg proteinov, smo izračunali z enačbo (5):

$$V_x [\mu\text{L}] = \frac{30 \mu\text{g}}{c_p} \quad \dots (5)$$

V_x ... volumen vzorca, v katerem je 30 µg proteinov

c_p ... predvidena koncentracija proteinov v vzorcu

- K tako pripravljenim vzorcem in BSA smo dodali po 500 µL precipitanta (Precipitant) v vsako mikrocentrifugirko, premešali na vibracijskem mešalniku pri maksimalni hitrosti in inkubirali 2–3 minute pri sobni temperaturi.
- V vsako mikrocentrifugirko smo nato dodali po 500 µL co-precipitanta (Co-precipitant) in premešali na vibracijskem mešalniku pri maksimalni hitrosti.
- Mešanico smo centrifugirali 5 minut pri 16.000 x g in 21 °C.
- Takoj po centrifugiranju smo supernatant previdno odpipetirali.
- Mikrocentrifugirke smo vstavili nazaj v centrifugo in kratko centrifugirali pri 16.000 x g in po centrifugiranju odstranili preostalo tekočino.
- V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 100 µL bakrove raztopine (Copper solution) in 400 µL dd H₂O.
- Kratko smo premešali na vibracijskem mešalniku pri maksimalni hitrosti, dodali 1 mL delovne raztopine barvnega reagenta in raztopino TAKOJ premešali z obračanjem mikrocentrifugirke.
- Vzorce z bakrovo raztopino smo inkubirali pri sobni temperaturi 15–20 minut.
- Absorbanco tako obarvanih vzorcev smo izmerili pri 480 nm in 540 nm.
- Izračunali smo umeritveno krivuljo (os x – količina proteina; os y – razlika v absorbanci med 480 nm in 540 nm) in jo uporabili za preračun dejanske količine proteinov v vzorcih (x v enačbi (6)).

Za preračun dejanske koncentracije proteinov v vzorcih smo uporabili naslednjo enačbo:

$$c_d \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right] = \frac{x}{V_x} \quad \dots (6)$$

c_d ... dejanska količina proteinov v vzorcu

x ... dejanska količna proteinov v izmerjenem vzorcu

V_x ... dejanski volumen alikvota (= V_x v enačbi (5))

3.2.3.4 Označevanje proteinov v proteinskih vzorcih

Na podlagi preračunane koncentracije proteinov smo izračunali volumne proteinskih vzorcev, ki vsebujejo 200 µg proteinov, in ustrezen volumen posameznega vzorca prenesli v novo mikrocentrifugirko. Pripravljenim proteinskim vzorcem smo dodali toliko raztopine DIGE za označevanje, da je bila končna koncentracija proteinov v raztopini 2 µg/µL. Interni standard smo pripravili iz enakih količin vseh proteinskih vzorcev, ki smo jih nameravali analizirati z 2D-DIGE. Zmesi internega standarda, ki je vsebovala 100 µg proteinov vsakega od 48 proteinskih vzorcev, smo dodali toliko raztopine DIGE za označevanje, da je bila končna koncentracija proteinov v raztopini internega standarda 2 µg/µL.

Iz pripravljenih raztopin proteinskih vzorcev in internega standarda s koncentracijo 2 µg/µL smo v nove mikrocentrifugirke prenesli po 50 µg (25 µL) posameznega proteinskega vzorca. Polovico vzorcev, torej po dve biološki ponovitvi vsake eksperimentalne skupine, smo označili s Cy3, drugo polovico s Cy5, interni standard pa s Cy2. V skupini štirih vzorcev iste eksperimentalne skupine smo za označevanje uporabili obe barvili (Cy3 in Cy5) zato, da smo izključili možnost preferenčnega označevanja.

Proteine smo označili z barvili Cy in pri tem uporabili komplet reagentov CyDye DIGE Fluor, minimal labeling kit 5 nmol (GE Healthcare). Označevanje je potekalo po naslednjem postopku:

- Pripravljenim alikvotom proteinskih vzorcev in internega standarda smo dodali po 1 µL posameznega barvila s koncentracijo 400 pmol/µL: alikvotom proteinskih vzorcev smo dodali barvilo Cy3 ali Cy5, pripravljenim alikvotom internega standarda pa barvilo Cy2.
- Mešanice z dodanim barvilom smo kratko premešali na vibracijskem mešalniku pri maksimalni hitrosti.
- Mešanice smo kratko centrifugirali pri 16.000 x g in 21 °C.
- Mešanice z dodanim barvilom smo inkubirali v temi, na ledu, 30 minut.
- Po 30 minutah smo ustavili reakcijo označevanja z dodatkom 1 µL 10 mM lizina, ki veže morebitne preostale molekule barvila.
- Mešanice z barvilm in dodanim lizinov smo kratko premešali na vibracijskem mešalniku pri maksimalni hitrosti.
- Mešanice smo kratko centrifugirali pri 16.000 x g in 21 °C.

- Mešanice z barvilom in dodanim lizinov smo inkubirali v temi, na ledu, 10 minut.
- Združili smo vzorce za nanos na isti gel: en vzorec, označen s Cy3, en vzorec, označen s Cy5, in alikvot internega standarda, označenega s Cy2.
- Združene vzorce smo do začetka postopka elektroforeze 2D zamrznili v zamrzovalniku pri -85°C .

Po dva vzorca od skupno 48 smo skupaj z alikvotom internega standarda združili za nanos na isti gel in tako pripravili 24 mešanic za nanos na gele. Pri združevanju vzorcev za nanos na isti gel smo pazili, da biološke ponovitve posamezne eksperimentalne skupine niso bile nanesene v istem gelu. Drugače smo se pri združevanju vzorcev držali navodil proizvajalca in jih združili čim bolj naključno.

3.2.4 Analiza 2D-DIGE

Pred začetkom postopka elektroforeze 2D smo ustrezeno število združenih vzorcev za nanos na gel odmrznili in jim dodali enak volumen ($75 \mu\text{L}$) 2-krat vzorčnega pufra (7 M urea; 2 M tiourea; 4 % CHAPS; 2 % Pharmalytes pH 3-10; 2 % DTT) tako, da je bil končni volumen za posamezni nanos na gel $150 \mu\text{L}$. Po dodatku 2-krat vzorčnega pufra smo vzorce 2 uri inkubirali pri sobni temperaturi.

Pri izvedbi elektroforeze 2D smo uporabili 24 cm trakove z IPG (pH 3-11 NL, GE Healthcare) in veliki format poliakrilamidnih gelov (20 x 26 cm).

3.2.4.1 Izoelektrično fokusiranje

Trakove z IPG smo rehidrirali 11 ur v $450 \mu\text{L}$ rehidracijske raztopine DeStreak Rehydration solution (GE Healthcare). Po navodilih proizvajalca smo ji dodali 0,5 % (v/v) raztopine IPG pH 3-11 NL (GE Healthcare).

Vzorce smo nanesli na anodni konec trakov z IPG in pri tem uporabili vzorčne posodice. Kot katodno raztopino smo uporabili DeStreak Rehydration solution (GE Healthcare) brez dodane raztopine IPG, kot anodno raztopino pa vodo.

Izoelektrično fokusiranje je potekalo po naslednjem protokolu:

- 150 V; 3 h (450 Vh)
- 300 V; 3 h (900 Vh)
- gradient do 1000 V; 6 h (1.950 Vh)
- gradient do 10000 V; 3 h (16.500 Vh)
- 10000 V; 3 h (25.200 Vh)

Skupaj 45.000 Vh (14 h 31 min).

Po končanem izoelektričnem fokusiraju smo trakove do začetka postopka druge dimenzijske (SDS PAGE) shranili v plastični mapi pri -80°C .

3.2.4.2 SDS PAGE

Ustrezno število trakov z IPG, ki smo jih po izoelektričnem fokusiraju shranili pri -80°C , smo odtalili in jih pred prenosom na poliakrilamidni gel uravnotežili. Uravnoteženje je potekalo v dveh korakih:

- Najprej smo trakove z IPG z rahlim mešanjem 15 minut inkubirali v 10 mL raztopine za uravnoteženje (6 M urea; 2 % (w/V) SDS; 50 mM Tris-HCl, pH = 8,8; 30 % glicerol) z dodanim 1 % DTT.
- Po odlitju prvotne raztopine za uravnoteženje smo trakove z IPG z rahlim mešanjem inkubirali 15 minut v 10 mL raztopine za uravnoteženje (6 M urea; 2 % (w/V) SDS; 50 mM Tris-HCl, pH = 8,8; 30 % glicerol) z dodanim 2,5 % jodoacetamidom.

SDS PAGE smo izvedli s komercialno pripravljenimi 12,5 % poliakrilamidnimi geli iz kompleta reagentov DIGE Gel (GE Healthcare) in elektroforeznimi raztopinami iz kompleta reagentov DIGE Buffer Kit (GE Healthcare). Pred uporabo smo poliakrilamidne gele stemperirali na sobno temperaturo, nato pa med obe stekleni površini kasete gela previdno vstavili trak z IPG. Na trak z IPG in preostalo površino poliakrilamidnega gela smo odpipetirali vročo agarozno raztopino iz kompleta reagentov DIGE Gel (GE Healthcare). Ko se je agarozna raztopina strdila, smo gele vstavili v elektroforezno enoto Ettan DALTSix (GE Healthcare), jo sestavili, priključili na napajalnik za elektroforezo EPS 3501XL (GE Healthcare) in na črpalno hladilno enoto MultiTemp IV Thermostatic Circulator (GE Healthcare) ter začeli elektroforezo (SDS-PAGE).

Elektroforeza je potekala pri naslednjih pogojih:

- 10 mA/gel, 80 V, 1 W/gel, 1 h.
- 50 mA/gel, 500 V, 17 W/gel toliko časa, da je fronta barvila dosegla konec gela (približno 4–5 h).
- Elektroforezni sistem smo hladili s črpalno hladilno enoto, z nastavljenou temperaturo črpalne tekočine $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4.3 Slikanje gelov

Po končani elektroforezi smo pri vsakem gelu s čitalnikom Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) zajeli tri slike, po eno za posamezno fluorescentno barvilo in pri velikosti posameznega piksla $100\text{ }\mu\text{m}$. Vsako posamezno fluorescentno barvilo je bilo s čitalnikom zajeto pri svojem, individualnem kanalu. Čas ekspozicije smo prilagodili tako, da je bil maksimalen signal čim višji, vendar ne zasičen, in primerljiv med vsemi tremi kanali.

3.2.4.4 Analiza slik gelov in statistična obdelava eksperimenta

Za analizo slik gelov smo uporabili program DeCyder 7.2 (GE Healthcare). Z modulom DIA smo izvedli avtomatsko detekcijo proteinskih lis in njihovo kvantifikacijo glede na interni standard znotraj posameznega gela. Vse slike DIA smo nato prenesli v modul BVA in proteinske lise uskladili med geli. Workspace BVA je vseboval 48 proteinskih map, po eno za vsak vzorec. Posamezna proteinska mapa predstavlja sliko gela s proteinskimi lisami za posamezen vzorec, označen s Cy3 ali Cy5. Pred avtomatskim usklajevanjem smo v bolj problematičnih predelih gelov določili nekaj proteinskih lis, ki so programu služile za orientacijo. Po avtomatskem usklajevanju smo vsako posamezno proteinsko liso preverili tudi ročno in jo po potrebi popravili.

Statistično analizo kvantitativnih podatkov smo izvedli v modulu EDA. Poglavitni kriterij za obdelavo v modulu EDA je bil, da se proteinske lise pojavljajo v vsaj 80 % proteinskih map. Proteinske lise, ki so ustrezale kriteriju, so predstavljale osnovni set kvantitativnih podatkov.

Za primerjavo odziva celic na zvišano vrednost pCO_2 znotraj iste temperature smo eksperimentalne skupine ločili glede na temperaturo, pri kateri so bile gojene, torej $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $33\text{ }^{\circ}\text{C}$. Statistična analiza primerjave odziva celic na zvišano vrednost pCO_2 pri posamezni temperaturi je vsebovala eksperimentalne skupine treh celičnih linij (starševska CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX), od katerih je bila vsaka gojena pri 10 % in 20 % pCO_2 . Osnovni set kvantitativnih podatkov znotraj iste temperature

gojenja smo analizirali z dvosmerno ANOVO, s faktorjem pCO₂ (vrednosti 10 % in 20 %) in celično linijo (1 – starševska CHO-*Der3*, 2 – mAb CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX*), da smo določili tiste proteinske lise, katerih relativni povprečni volumen signala se statistično značilno razlikuje glede na vrednost pCO₂.

Za splošen pregled podobnosti oziroma različnosti med eksperimentalnimi skupinami smo na podlagi osnovnega seta kvantitativnih podatkov vseh eksperimentalnih skupin izračunali enosmerno ANOVO ($p < 0,01$) in proteinske lise, ki so izpolnjevale zahtevan kriterij, uporabili kot vhodni podatek za analizo glavnih komponent (PCA). Izvedli smo tudi dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) s faktorjem temperatura (vrednosti 37 °C in 33 °C) in pCO₂ (vrednosti 10 % in 20 %), ter tako primerjali odziv celic na proteomskem nivoju glede na temperaturo in vrednost pCO₂.

Statistično značilna razlika glede na relativni povprečni volumen signala je razlika v vsebnosti individualnega proteina med obravnavanimi vzorci oziroma eksperimentalnimi skupinami.

3.2.5 Priprava preparativnega gela in identifikacija proteinov z masno spektrometrijo

3.2.5.1 Priprava preparativnega gela

Za izrez proteinskih lis za identifikacijo proteinov z masno spektrometrijo smo pripravili preparativni gel, na katerega smo nanesli 600 µg internega standarda, torej proteinov zmesi vseh vzorcev, ki so bili analizirani z 2D-DIGE.

3.2.5.1.1 Izoelektrično fokusiranje

Trak z IPG smo rehidrirali čez noč v 450 µL rehidracijske raztopine DeStreak Rehydration solution (GE Healthcare), ki je vsebovala 0,5 % (v/v) raztopine IPG pH 3-11 NL (GE Healthcare) in 600 µg proteinov zmesi vseh vzorcev, ki so bili analizirani z 2D-DIGE. Proteinske vzorce smo torej nanesli na trak IPG z rehidracijo.

Izoelektrično fokusiranje je potekalo po naslednjem protokolu:

- 300 V; 1 h (300 Vh)
- 500 V; 1 h (500 Vh)
- gradient do 1000 V; 1 h (750 Vh)
- gradient do 10000 V; 3 h (16.500 Vh)
- 10000 V; 2,7 h (26.950 Vh)

Skupaj 45.000 Vh (8 h 42 min).

Po končanem izoelektričnem fokusiraju smo trak do začetka postopka druge dimenzije (SDS PAGE) shranili v plastični mapi pri -80°C .

3.2.5.1.2 SDS PAGE

Trak z IPG, ki smo ga po izoelektričnem fokusiraju shranili pri -80°C , smo odtalili in ga pred prenosom na poliakrilamidni gel uravnotežili, kar je potekalo v dveh korakih:

- Najprej smo trakove z IPG z rahlim mešanjem 20 minut inkubirali v 10 mL raztopine za uravnoteženje (6 M urea; 2 % (w/V) SDS; 50 mM Tris-HCl, pH = 8,8; 30 % glicerol) z dodanim 1 % DTT.
- Po odlitju prvotne raztopine za uravnoteženje smo trakove z IPG z rahlim mešanjem inkubirali 20 minut v 10 mL raztopine za uravnoteženje (6 M urea; 2 % (w/V) SDS; 50 mM Tris-HCl, pH = 8,8; 30 % glicerol) z dodanim 2,5 % jodoacetamidom.

Po uravnoteženju smo trak sprali v elektroforeznem pufru in ga nanesli na površino gela za drugo dimenzijo. Na gel smo odpipetirali vročo agarozno raztopino (0,5 % agarozna, 0,002 % bromofenolmodro v 1 x elektroforeznem pufru). Ko se je agarozna raztopina strdila, smo sestavili aparaturo in začeli elektroforezo (NaDS-PAGE).

Elektroforeza je potekala pri naslednjih pogojih:

- 10 mA/gel, 80 V, 1 W/gel, 1 h.
- 50 mA/gel, 500 V, 17 W/gel toliko časa, da je fronta barvila doseglja konec gela (približno 4–5 h).
- Elektroforezni sistem smo hladili s črpalno hladilno enoto, z nastavljenim temperaturo črpalne tekočine $T = 22^{\circ}\text{C}$.

Po končani elektroforezi smo gel barvali s koloidnim Coomassie (Neuhoff, 1990) Brilliant Blue G-250 po naslednjem postopku:

- Gel smo fiksirali čez noč v fiksirni raztopini (40 % etanol; 10 % ocetna kislina).
- Po fiksaciji smo gel spirali trikrat po 20 min z ddH₂O.
- Sprani gel smo barvali 5 dni v raztopini za barvanje (3 % fosforna kislina; 17 % amonijev sulfat; 34 % metanol; 0,08 % CBB G-250).
- Po končanem barvanju smo gel sprali z ddH₂O.

Sliko gela smo zajeli s čitalnikom ImageScanner III (GE Healthcare).

Iz preprativnega gela smo izrezali 120 proteinskih lis, ki smo jih lahko uskladili med reprezentativnim analitskim in preparativnim gelom. Reprezentativni analitski gel z označenimi proteinskimi lisami je prikazan na sliki 19.

3.2.5.2 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo

Izbrane proteinske lise smo izrezali z robotom Ettan Spot Picker (GE Healthcare) in jih prenesli v mikrotitrsko ploščo skupaj s 100 µL ddH₂O. Koščke gela s proteini smo pripravili za nanos na masnem spektrometru MALDI/TOF-TOF (Bruker Ultraflex III) po naslednjem postopku:

- Pripravljene koščke gela s proteini smo dvakrat sprali s 50 % acetonitrilom z dodanim 25 mM amonijevim bikarbonatom.
- Sprane koščke gela s proteini smo sprali še enkrat s 100 % acetonitrilom.
- Po spiranju smo koščke gela s proteini sušili 20 min v vakuumskem koncentratorju.
- Tripsin (Promega) smo raztopili v 50 mM ocetni kislini, nato pa 5-krat razredčili s 25 mM amonijevim bikarbonatom do končne koncentracije 0,02 µg/µL. Koščke gela smo rehidrirali v 10 µL tako pripravljene raztopine tripsina in jih inkubirali 30 min.
- Po rehidraciji v raztopini tripsina smo dodali toliko 25 mM amonijevega bikarbonata, da so bili koščki prekriti s tekočino, in vse skupaj inkubirali čez noč pri 37 °C (potek razgradnje proteinov).
- Po 1 µL nastale peptidne mešanice smo nanesli na tarčno ploščo MALDI.
- Peptidni mešanici na tarčni plošči MALDI smo dodali 1 µL sveže pripravljene raztopine, ki je v 50 % acetonitrilu z 0,1 % trifluoroacetne kisline vsebovala 5 mg/mL 4-hidroksi-α-ciano-cimetove kisline (Sigma).

Masne spektre smo izmerili v pozitivnem načinu v območju 800–4000 m/z. Deset najmočnejših signalov v masnem spektru pozitivnih ionov posamezne peptidne mešanice smo fragmentirali še za tandemsko MS/MS. Obdelava masnih spektrov in spektrov MS/MS ter formiranje seznama izrezanih proteinskih lis je bila narejena s programom Bruker flexAnalysis software (version 3.3).

Analizo z masno spektrometrijo so opravili na Univerzi v Yorku (University of York, Department of Biology, Proteomics Bioscience Technology Facility, VB).

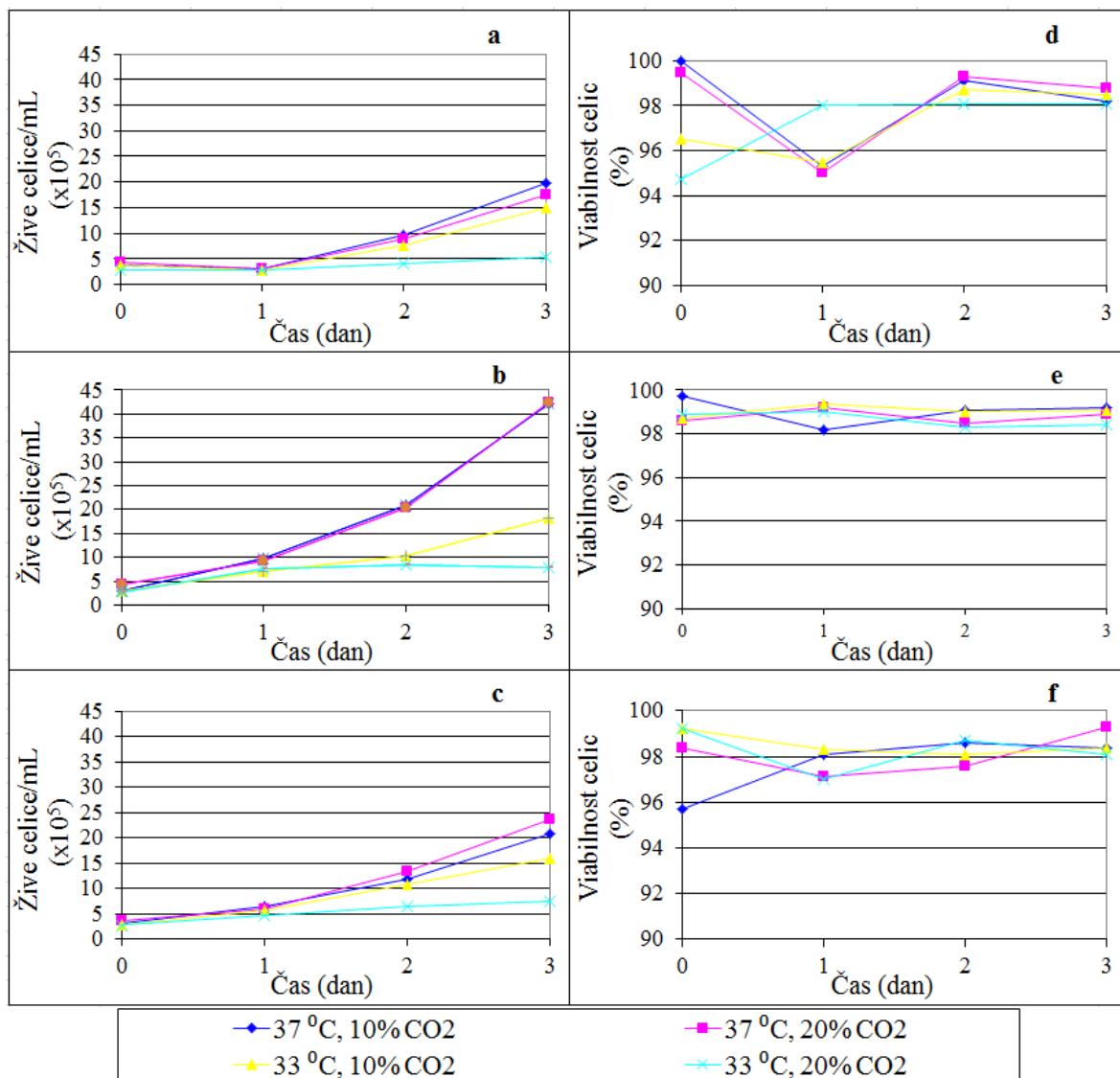
S podatki iz fragmentacijskih spektrov smo iskali zadetke z algoritmom Mascot MS/MS Ion Search v bazi SwissProt, taksonomska vrsta glodalci, s parametri: encim tripsin, največ eno dovoljeno zgrešeno mesto cepitve, fiksna modifikacija karbamidometilacija cisteinov, variabilna modifikacija oksidacija metioninov, histidinov in triptofanov, toleranca pri meritvah mas peptidov 250 ppm, toleranca pri MS/MS 0,5, naboj peptidov 1+. Ker v bazi SwissProt z izbrano taksonomsko vrsto glodalci nismo dobili vseh zadetkov, smo v takih primerih uporabili še kombinacijo baze NCBInr in izbrano taksonomsko vrsto glodalci ali baze SwissProt in z vključenimi vsemi organizmi ter enakimi parametri, kot so navedeni.

4 REZULTATI

4.1 RASTNE KRIVULJE CELIČNIH LINIJ IN VIABILNOST CELIC

Na podlagi rezultatov določanja koncentracije in viabilnosti celic (poglavlje 3.2.2.3) med gojenjem vseh treh celičnih linij, pri vseh štirih kultivacijskih pogojih, smo izračunali koncentracijo živih celic v kulturah in njeno spreminjanje po dnevih prikazali v obliki grafov, ki so na sliki 13 (a–c). Iz grafov je razvidno, da je pri 37 °C in obeh vrednostih pCO₂, 10 % in 20 %, najintenzivneje rasla celična linija mAb CHO-Der3, ki je po treh dneh gojenja dosegla maksimalno koncentracijo živih celic 40×10^5 celic/mL. Drugi dve celični liniji, starševska CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX, sta rasli počasneje, in pri 37 °C ter obeh vrednostih pCO₂, 10 % in 20 %, po treh dneh gojenja dosegli maksimalno koncentracijo živih celic 20×10^5 celic/mL. Večja variabilnost v hitrosti rasti populacije celic pri različnih vrednostih pCO₂ je opazna pri vseh treh celičnih linijah, gojenih pri temperaturi 33 °C. V tem primeru so namreč vse tri celične linije po treh dneh gojenja in pri 10 % pCO₂ dosegle maksimalno koncentracijo živih celic med 15 in 20×10^5 celic/mL in pri 20 % pCO₂, med 5 in 8×10^5 celic/mL.

Na podlagi rezultatov meritev deleža živih celic (viabilnost celic) med gojenjem vseh treh celičnih linij, pri vseh štirih kultivacijskih pogojih (poglavlje 3.2.2.3), smo za vseh 12 eksperimentalnih skupin prikazali spreminjanje viabilnosti celic po dnevih gojenja v obliki grafov, prikazanih na sliki 13 (d–f). Viabilnost celic je konstantno zelo visoka, med 95 in 98 %. Več variabilnosti v viabilnosti celic znotraj omenjenih vrednosti je opaziti v točki 0 in po prvem dnevu gojenja, ko je koncentracija celic še relativno nizka. To lahko pojasnimo z načinom delovanja naprave za štetje celic (Vi-Cell XR; Beckman Coulter). Štetje celic poteka s predpripravo 50 posnetkov, na katerih so zaradi prehoda barvila tripan modro skozi poškodovano membrano v notranjost celice mrtve celice obarvane modro, žive celice pa ostanejo neobarvane. Pri nizkih koncentracijah celic se na posnetkih pojavlja majhno število celic (4–5), poleg tega pa naprava pogosto tudi večje delce v kulturi (razgradnji produkti celic, neraztopljeni deli gojišča ...) vrednoti kot mrtve celice. Pri nizkih koncentracijah celic se zato poveča možnost napake meritve, posledično pa se poveča variabilnost v vrednostih pridobljenih rezultatov.



Slika 13: Koncentracija živih celic in viabilnost celic po dnevih za vse tri celične linije. Koncentracije živih celic so prikazane v grafih a–c, viabilnost celic pa v grafih d–f. Celične linije: starševska CHO-Der3 (a, d), mAb CHO-Der3 (b, e) in mAb CHO-Der3-MTX (c, f). Širje različni pogoji gojenja so označeni z različnimi barvami, kot je označeno v legendi grafov.

Figure 13: Viable cell densities (a-c) and cell viabilities (d-f) for the three cell lines. Viable cell densities are presented on graphs a-c, cell viabilities are presented on graphs d-f. Cell lines: parental CHO-Der3 cells (a, d), mAb CHO-Der3 cells (b, e) and mAb CHO-Der3-MTX cells (c, f). Different temperature and pCO₂ culture conditions are marked with different colours, as indicated on graphs.

4.2 PRIMERJAVA PORABE SUBSTRATOV IN PRODUKCIJE METABOLITA

Koncentracije glutamina, glukoze (substrata) in laktata (metabolit) v celičnih kulturah 12 eksperimentalnih skupin smo merili po četrti pasaži, neposredno pred spremembou pogojev gojenja (dan 0) in pozneje neposredno pred vzorčenjem celic za analizo 2D-DIGE (po 72 urah oziroma treh dneh gojenja pri spremenjenih pogojih). Spremembo v koncentraciji posameznega substrata in metabolita med dnevom 0 in po treh dneh gojenja, za vse tri celične linije in štiri različne pogoje gojenja, smo prikazali v obliki grafov na sliki 14 (a–i). Iz povprečnih koncentracij štirih bioloških ponovitev smo izračunali specifične vrednosti porabe obeh substratov in produkcije metabolita (poraba posameznega substrata oziroma produkcija metabolita ene celice v enem dnevu) za vse tri celične linije in štiri različne pogoje gojenja ter jih podali v obliki tabele (preglednica 2).

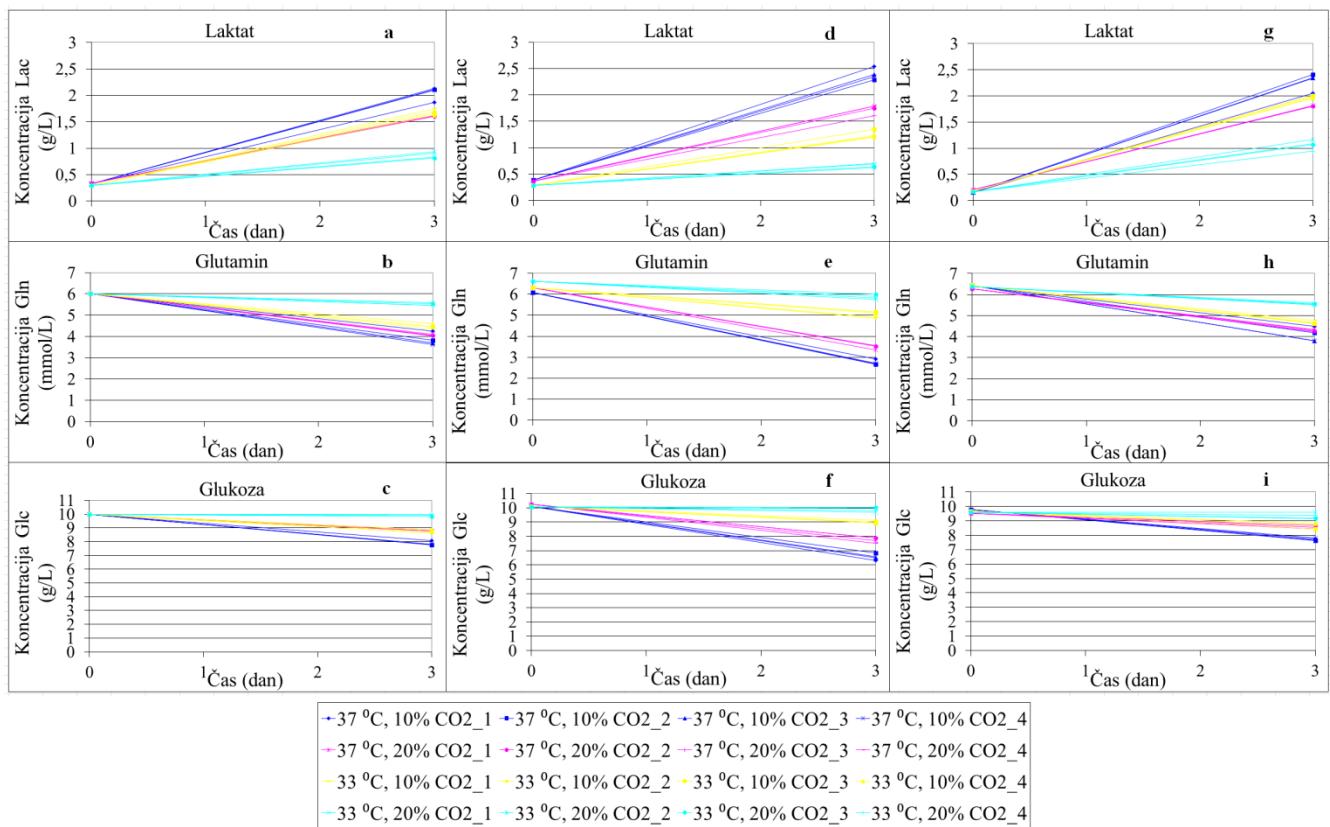
4.2.1 Primerjava metabolizma glede na trend spreminjanja vrednosti glutamina, glukoze in laktata

Na splošno smo na podlagi meritev koncentracij glutamina, glukoze in laktata pri vsaki od treh celičnih linij opazili štiri različne metabolne profile, ki ustrezajo štirim različnim pogojem gojenja glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO₂ (37 °C in 10 % pCO₂, 37 °C in 20 % pCO₂, 33 °C in 10 % pCO₂ ter 33 °C in 20 % pCO₂). Iz grafov je razvidno, da so si metabolni profili starševske celične linije CHO-*Der3* in rekombinantne celične linje mAb CHO-*Der3*-MTX glede na porabo glutamina in glukoze ter produkcijo laktata podobni (slika 14; a–c in g–i). Vpliv različnih pogojev je bil bolj raznovrsten v primeru celične linije mAb CHO-*Der3* (slika 14; d–f), saj sta bili v treh dnevih kultivacije pri 33 °C in obeh vrednostih pCO₂ manjši produkcija laktata in poraba glutamina, medtem ko je bila poraba glukoze primerljiva z drugima dvema celičnima linijama pri omenjenih pogojih. Pri 37 °C in 10 % pCO₂ je bila metabolna aktivnost povečana v pomenu porabe obeh substratov in produkcije laktata, pri 37 °C in 20 % pCO₂ pa je bila poraba obeh substratov prav tako povečana, medtem ko je produkcija laktata ostala nespremenena.

Čeprav pri eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 37 °C, ni bilo opaziti vpliva vrednosti pCO₂ na hitrost rasti populacij celičnih linij (slika 13), je pri zvišani vrednosti pCO₂ (20 %) opazna zmanjšana metabolna aktivnost, saj sta zmanjšani produkcija laktata in poraba glutamina in glukoze (slika 14, primerjava modrih (10 % pCO₂) in vijoličastih (10 % pCO₂) linij). Zaradi višje koncentracije živih celic v primerjavi z drugima dvema celičnima linijama je omenjena sprememba najbolj izražena pri celični liniji mAb CHO-*Der3*.

Pri 33 °C profila matabolnih aktivnosti pri vseh treh celičnih linijah sovpadata z rastnimi profili, saj je pri nižjih koncentracijah živih celic, ki so bile izmerjene pri 20 % pCO₂, opazna tudi zmanjšana metabolna aktivnost.

Iz grafično podanih metabolnih podatkov (slika 14) smo dodatno opazili, da sta pri starševski celični liniji CHO-Der3 in celični liniji mAb CHO-Der3-MTX metabolna profila eksperimentalnih skupin, ki predstavljata celične kulture, gojene pri 37 °C in 20 % pCO₂ ter pri 33 °C in 10 %, zelo podobna. V primeru obeh substratov in metabolita se namreč linije, ki prikazujejo spremembo v koncentraciji posameznega substrata ali metabolita, na grafih prekrivajo, ali pa so si zelo blizu v primerjavi z drugimi (slika 14 a–c in g–i, vijoličasta in rumena linija).



Slika 14: Koncentracija laktata, glutamina in glukoze v gojišču po 72 h gojenja. Metabolna aktivnosti je odraz proizvodnje laktata (a, d, g), porabe glutamina (b, e, h) in porabe glukoze (c, f, i). Koncentracije posameznih metabolitov so prikazane za vse tri celične linije, starševsko CHO-Der3 (a-c), mAb CHO-Der3 (d-f) in mAb CHO-Der3-MTX (g-i), pri štirih različnih pogojih gojenja, kot je označeno v legendah grafov.

Figure 14: Graphical presentation of change in concentration of lactate, glutamine and glucose. Metabolic activity is defined according to lactate production (a, d, g), and glutamine (b, e, h) and glucose (c, f, i) consumption. Concentrations for the three cell lines, as the parental CHO-Der3 cells (a-c), mAb CHO-Der3 (d-f), and mAb CHO-Der3-MTX cells (g-i) under four different temperature and pCO₂ culture conditions (as indicated).

4.2.2 Primerjava specifičnih vrednosti porabe glukoze in glutamina ter produkcije laktata

Primerjava specifičnih vrednosti porabe glukoze in glutamina ter produkcije laktata (preglednica 2) je v nasprotju s primerjavo trendov spremenjanja vrednosti omenjenih substratov in metabolita (poglavlje 4.2.1) pokazala, da je bila glede na specifično porabo glukoze in glutamina ter specifično produkcijo laktata metabolna aktivnost največja v primeru starševske celične linije CHO-Der3, najmanjša pa v primeru celične linje mAb CHO-Der3.

Vpliv znižane temperature gojenja (33°C) pri obeh vrednostih pCO_2 je bil generalno opažen kot zmanjšana specifična poraba glukoze in glutamina (razen v primeru celične linije mAb CHO-Der3, pri kateri se je pri 33°C in 10 % pCO_2 specifična poraba glutamina malenkost povečala v primerjavi z vrednostjo pri 37°C in 10 % pCO_2 , ter celične linije mAb CHO-Der3-MTX, kjer je specifična poraba glutamina enaka pri obeh temperaturah gojenja in 20 % pCO_2) in povečana specifična produkcija laktata (razen v primeru celične linije mAb CHO-Der3, pri kateri se je pri 33°C in 20 % pCO_2 specifična produkcija laktata malenkost zmanjšala v primejavi z vrednostjo pri 37°C in 20 % pCO_2). Iz razmerja med specifično produkcijo laktata in specifično porabo glukoze je razvidno, da so celice pri nižji temperaturi proizvedle več laktata glede na količino porabljene glukoze pri obeh vrednostih pCO_2 , vendar je bilo razmerje pri višjem pCO_2 večje.

Pri vseh treh celičnih linijah in obeh temperaturah gojenja je bila pri zvišani vrednosti pCO_2 specifična metabolna aktivnost zmanjšana. Izjema je bila specifična poraba glutamina pri celični liniji mAb CHO-Der3 in temperaturi gojenja 37°C , kjer se specifična poraba pri povečani vrednosti pCO_2 ni spremenila. Poleg tega smo pri vseh treh celičnih linijah opazili, da je bilo razmerje med specifično produkcijo laktata in specifično porabo glukoze pri višji vrednosti pCO_2 povečano, kar pomeni, da so celice pri 20 % pCO_2 producirale več laktata glede na količino porabljene glukoze kot pri nižji vrednosti (10 %). Opaženo velja pri obeh temperaturah gojenja, razen v primeru celične linije mAb CHO-Der3, kjer bilo pri 37°C razmerje pri 20 % pCO_2 malenkost nižje. Vpliv zvišane vrednosti pCO_2 na spremembo specifične metabolne aktivnosti in razmerje med specifično porabo glukoze in specifično produkcijo laktata je bil bolj izražen pri nižji temperaturi gojenja (33°C).

Preglednica 2: Specifična poraba glukoze in glutamina ter specifična produkcija laktata pri treh celičnih linijah in štirih pogojih gojenja. Specifične vrednosti so bile izračunane z uporabo enačb (1), (2), (3) in (4) na podlagi povprečnih koncentracij glukoze, glutamina in laktata v gojišču štirih bioloških ponovitev posamezne eksperimentalne skupine.

Table 2: Specific glucose and glutamine consumption, and lactate production of the three cell lines at the four culture conditions. Specific values were calculated using average concentrations of glucose, glutamine and lactate in the media (using equations (1), (2), (3) and (4)) of four biological replicates of an individual experimental group.

Pogoji gojenja	37 °C, 10 % pCO ₂	37 °C, 20 % pCO ₂	33 °C, 10 % pCO ₂	33 °C, 20 % pCO ₂
Metaboliti	Starševska celična linija CHO-Der3			
Produkcia laktata (ng/celico/dan)	0.62±0.01	0.41±0.04	0.63±0.02	0.45±0.06
Poraba glutamina (pmol/celico/dan)	0.77±0.06	0.63±0.01	0.70±0.02	0.39±0.05
Poraba glukoze (ng/celico/dan)	0.77±0.07	0.40±0.03	0.56±0.04	0.07±0.03
Razmerje Produkcia laktata/poraba glukoze	0.81	1.03	1.13	6.43
Celična linija mAb CHO-Der3				
Produkcia laktata (ng/celico/dan)	0.29±0.01	0.23±0.03	0.38±0.02	0.21±0.01
Poraba glutamina (pmol/celico/dan)	0.48±0.05	0.48±0.08	0.52±0.08	0.42±0.08
Poraba glukoze (ng/celico/dan)	0.51±0.02	0.43±0.05	0.44±0.03	0.10±0.08
Razmerje Produkcia laktata/poraba glukoze	0.57	0.53	0.86	2.10
Celična linija mAb CHO-Der3-MTX				
Produkcia laktata (ng/celico/dan)	0.51±0.02	0.40±0.02	0.58±0.05	0.56±0.06
Poraba glutamina (pmol/celico/dan)	0.56±0.05	0.50±0.02	0.55±0.04	0.50±0.03
Poraba glukoze (ng/celico/dan)	0.50±0.03	0.24±0.04	0.32±0.08	0.18±0.13
Razmerje Produkcia laktata/poraba glukoze	1.02	1.67	1.81	3.11

4.3 MERITVE KONCENTRACIJ PROTEINOV

Koncentracije proteinov smo po izolaciji proteinov iz $2,5 \times 10^7$ celic (poglavlje 3.2.3.2) izmerili z uporabo kompleta reagentov 2D Quant Kit (GE Healthcare). Rezultati meritev koncentracije proteinov v vzorcih vseh 12 eksperimentalnih skupin in štirih bioloških ponovitev so podani v preglednici 3.

Koncentracije proteinov v vzorcih so si bile med biološkimi ponovitvami znotraj posamezne eksperimentalne skupine, razen z nekaj izjemami, zelo podobne, vse pa so bile v območju od 2,7 do 7,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Enotno koncentracijsko območje je omogočilo nadaljnje rokovanje z vzorci brez potrebnega redčenja.

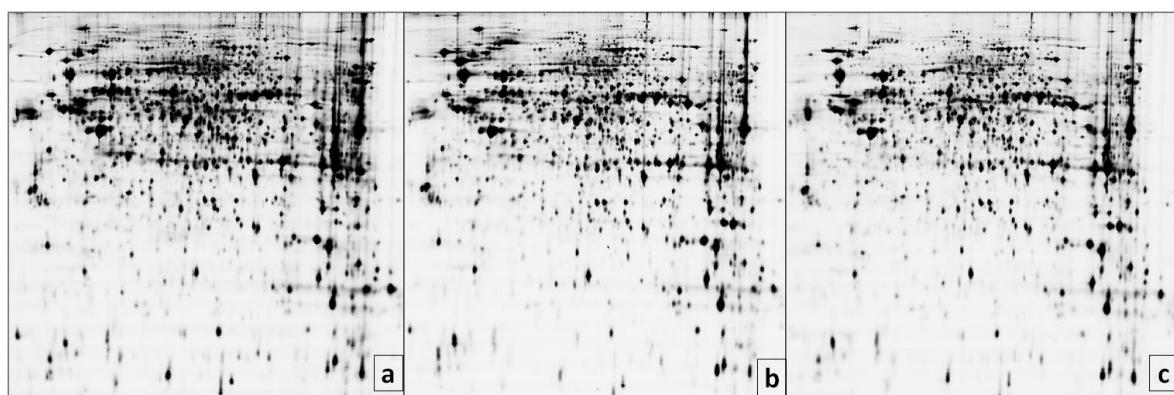
Preglednica 3: Rezultati meritev koncentracije proteinov v vzorcih.

Table 3: Measurements of protein concentration in samples.

Celična linija	Pogoji gojenja	Vzorec		Koncentracija proteinov ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
		Biološka ponovitev		
starševska CHO-Der3	37 °C in 10 % pCO ₂	1		4,1
		2		4,5
		3		4,2
		4		4,3
	37 °C in 20 % pCO ₂	1		6,5
		2		2,8
		3		3,8
		4		2,7
	33 °C in 10 % pCO ₂	1		4,4
		2		4,8
		3		3,5
		4		3,7
	33 °C in 20 % pCO ₂	1		4,7
		2		3,8
		3		4,1
		4		4,0
mAb CHO-Der3	37 °C in 10 % pCO ₂	1		6,8
		2		7,3
		3		6,3
		4		6,3
	37 °C in 20 % pCO ₂	1		6,5
		2		5,2
		3		5,2
		4		4,2
	33 °C in 10 % pCO ₂	1		4,3
		2		5,5
		3		4,3
		4		4,9
	33 °C in 20 % pCO ₂	1		4,5
		2		5,7
		3		4,3
		4		4,3
mAb CHO-Der3-MTX	37 °C in 10 % pCO ₂	1		3,7
		2		5,5
		3		4,7
		4		5,2
	37 °C in 20 % pCO ₂	1		4,5
		2		5,1
		3		5,0
		4		4,4
	33 °C in 10 % pCO ₂	1		5,4
		2		5,8
		3		7,9
		4		5,0
	33 °C in 20 % pCO ₂	1		7,1
		2		5,8
		3		4,2
		4		5,1

4.4 ANALIZA SLIK GELOV IN STATISTIČNA OBDELAVA EKSPERIMENTA

Statistična analiza je obsegala kvantitativne podatke, ki so bili pridobljeni iz 24 gelov. Celoten eksperiment je obsegal 48 proteinskih map. Posamezna proteinska mapa predstavlja sliko gela s proteinskimi lisami za posamezni vzorec, označen s Cy3 ali Cy5. Reprezentativne slike gelov vzorcev oziroma proteinskih map za vsako od treh celičnih linij, starševsko celično linijo CHO-*Der3* ter celični linji mAb CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX*, so prikazane na sliki 15.



Slika 15: Proteinski profil treh različnih celičnih linij: a) starševska celična linija CHO-*Der3*; b) celična linija mAb CHO-*Der3* in c) celična linija mAb CHO-*Der3-MTX*. Slike so reprezentativni posnetek gelov.

Figure 15: Protein profile for each of three cell lines: a) parental cell line CHO-*Der3*; b) mAb CHO-*Der3* cell line; and c) mAb CHO-*Der3-MTX* cell line. Pictures are representative snaps of gels.

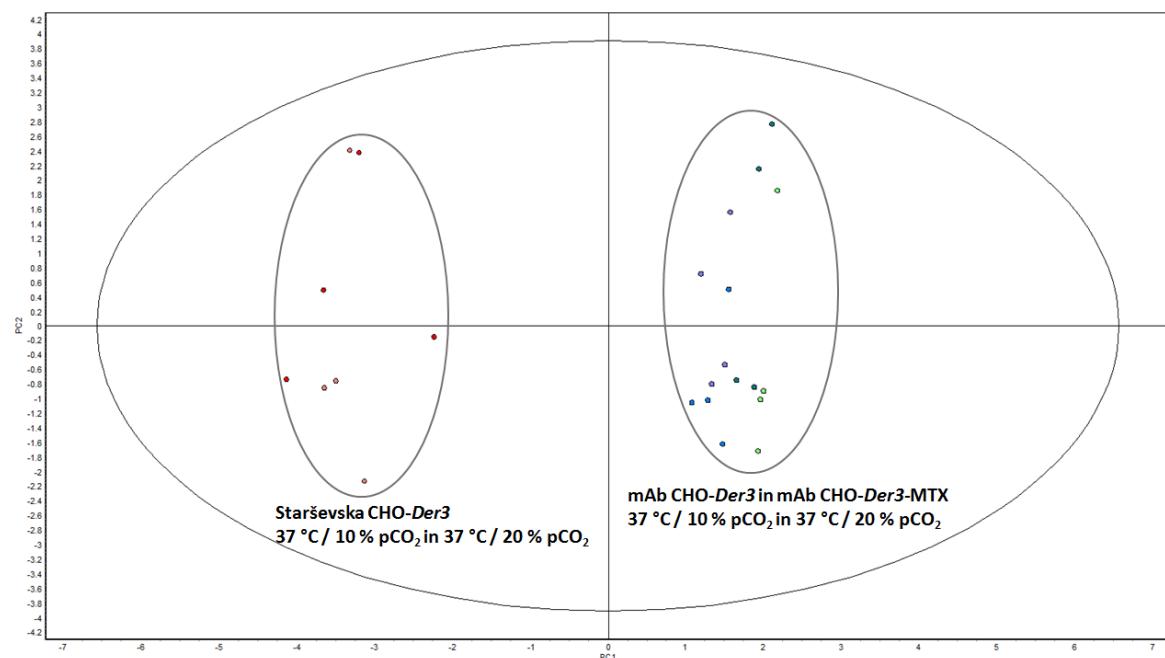
Osnovni set kvantitativnih podatkov za nadaljnjo statistično obdelavo eksperimenta je vseboval 2178 proteinskih lis, ki so se pojavljale v 80 % proteinskih map.

Za primerjavo odziva celic na zvišano vrednost pCO₂ znotraj iste temperature smo za šest eksperimentalnih skupin, gojenih pri 37 °C ali 33 °C, na osnovnem setu kvantitativnih podatkov izvedli dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) s faktorjem pCO₂ (vrednosti 10 % in 20 %) ter celično linijo (1 – starševska CHO-*Der3*, 2 – mAb CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX*) in analizo PCA.

Na podlagi omenjenega seta podatkov smo za splošno primerjavo vseh 12 eksperimentalnih skupin izvedli enosmerno ANOVO ($p < 0,01$) in proteinske lise, ki so izpolnjevale zahtevani kriterij, uporabili kot vhodni podatek za analizo PCA. Izvedli smo tudi dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) s faktorjem temperatura (vrednosti 37 °C in 33 °C) in pCO₂ (vrednosti 10 % in 20 %) ter tako primerjali odziv celic na temperaturo in vrednost pCO₂.

4.4.1 Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 37 °C

Odziv celic na proteomskem nivoju na zvišano vrednost pCO₂ pri 37 °C smo primerjali med šestimi eksperimentalnimi skupinami z analizo PCA in dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) s faktorjem pCO₂ (vrednosti 10 % in 20 %) in celično linijo (1 – starševska CHO-Der3, 2 – mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX). Statistična analiza je vsebovala šest eksperimentalnih skupin treh celičnih linij (starševska celična linija CHO-Der3 ter celični linji mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX), gojenih pri isti temperaturi 37 °C in pri dveh različnih vrednostih pCO₂, 10 % in 20 %.



Slika 16: Grafični prikaz rezultatov analize PCA šestih eksperimentalnih skupin, ki predstavljajo tri različne celične linije, gojene pri 37 °C in dveh različnih vrednostih pCO₂. Celične linije: starševska CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX. Pogoji gojenja: 37 °C in 10 % pCO₂ ter 37 °C in 20 % pCO₂. PC1 predstavlja 36 % variacije in ločuje eksperimentalne skupine glede na celično linijo, in sicer starševsko CHO-Der3 od obih rekombinantnih celičnih linij. PC2 predstavlja 13 % variacije in eksperimentalnih skupin ne ločuje glede na nobenega od definiranih parametrov.

Figure 16: Graphical representation of PCA results for PCA analysis of the six experimental groups representing three different cell lines cultured at 37 °C and two different pCO₂ levels. Cell lines: parental CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3 MTX. Culturing conditions: 37 °C and 10 % pCO₂, 37 °C and 20 % pCO₂. The PC1 represents 36 % of the variation and distinguishes between the experimental groups by the cell lines, according to the parental CHO-Der3 cells and the mAb-producing cells. The PC2 represents 13 % of the variation, but does not distinguish between the experimental groups according to any of the defined conditions.

Na podlagi analize PCA, ki je bila izvedena z osnovnim setom kvantitativnih podatkov (2178 proteinskih lis), je bilo šest eksperimentalnih skupin razdeljenih v dva skupka, ločena s prvo komponento (PC1), od katerih eden predstavlja eksperimentalne skupine starševske celične linije CHO-Der3, drugi pa eksperimentalne skupine obeh rekombinantnih celičnih linij (mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX) (slika 16). Znotraj posameznega skupka se eksperimentalne skupine in biološke ponovitve prepletajo ter jih z drugo komponento (PC2) ni mogoče ločiti glede na nobenega od definiranih parametrov.

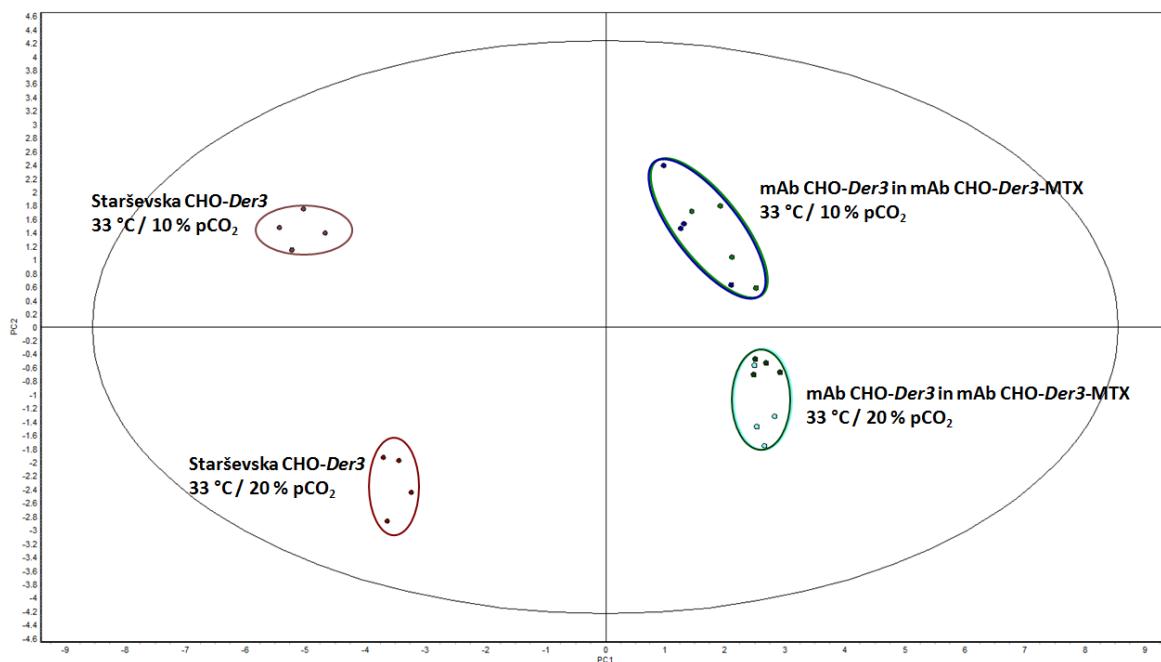
Z dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) je bilo z izračunom določenih 588 v volumnu signala statistično značilno različnih proteinskih lis glede na celično linijo in 17 glede na vrednost pCO_2 .

4.4.2 Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO_2 pri 33 °C

Odziv celic na proteomskem nivoju na zvišano vrednost pCO_2 pri 33 °C smo kot pri 37 °C (poglavlje 4.4.1) primerjali med šestimi eksperimentalnimi skupinami z analizo PCA in z dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$), s faktorjem pCO_2 (vrednosti 10 % in 20 %) in celično linijo (1 – starševska CHO-Der3, 2 – mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX). Statistična analiza je tudi v tem primeru vsebovala šest eksperimentalnih skupin treh celičnih linij (celične linije starševska CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX), ki so bile gojene pri isti temperaturi, 33 °C, in pri dveh različnih vrednostih pCO_2 , 10 % in 20 %.

Na podlagi analize PCA, ki je bila izvedena z osnovnim setom kvantitativnih podatkov (2178 proteinskih lis), je bilo šest eksperimentalnih skupin tokrat razdeljenih v štiri skupke: po enega z eksperimentalno skupino starševske celične linije, gojene pri vrednosti pCO_2 , 10 % ali 20 %, in po enega z eksperimentalnimi skupinami obeh rekombinantnih celičnih linij (mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX), gojenimi pri vrednosti pCO_2 , 10 % ali 20 %. Iz grafičnega prikaza rezultatov analize PCA (slika 17) je razvidno, da PC1 loči eksperimentalne skupine glede na celično linijo, in sicer eksperimentalne skupine starševske celične linije CHO-Der3 od eksperimentalnih skupin obeh rekombinantnih celičnih linij (mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX). PC2 loči eksperimentalne skupine glede na vrednost pCO_2 , torej 10 % in 20 %.

Z dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) je bilo z izračunom določenih 712 v volumnu signala statistično značilno različnih proteinskih lis glede na celično linijo in 329 glede na vrednost pCO_2 .



Slika 17: Grafični prikaz rezultatov analize PCA šestih eksperimentalnih skupin, ki predstavljajo tri različne celične linije, gojene pri 33 °C in dveh različnih vrednostih pCO₂. Celične linije: starševska CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX. Pogoji gojenja: 33 °C in 10 % pCO₂ ter 33 °C in 20 % pCO₂. PC1 predstavlja 44 % variacije in ločuje eksperimentalne skupine glede na celično linijo, in sicer starševsko CHO-Der3 od obeh rekombinantnih celičnih linij. PC2 predstavlja 10 % variacije in ločuje eksperimentalne skupine glede na vrednost pCO₂ (10 % in 20 %).

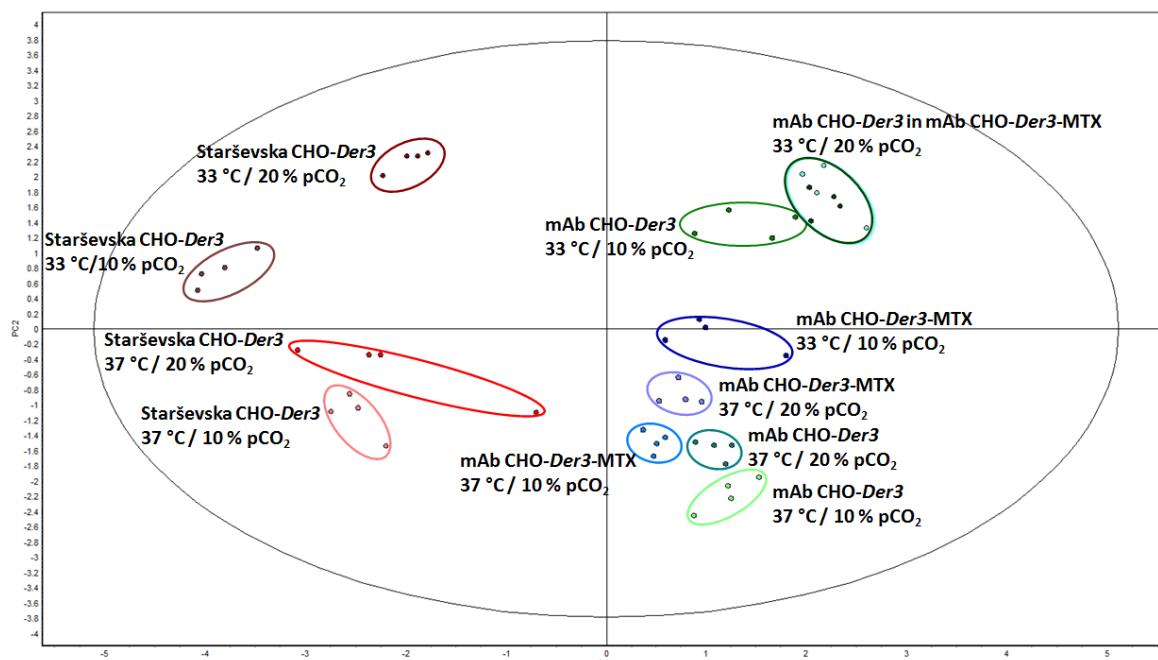
Figure 17: Graphical representation of PCA results for PCA analysis of the six experimental groups representing three different cell lines cultured at 33 °C and two different pCO₂ levels. Cell lines: parental CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3 MTX. Culturing conditions: 33 °C and 10 % pCO₂, 33 °C and 20 % pCO₂. The PC1 represents 44 % of the variation and distinguishes between the experimental groups by the cell lines, according to the parental CHO-Der3 cells and the mAb-producing cells. The PC2 represents 10 % of the variation and distinguishes between the experimental groups by the pCO₂ levels, according to 10 % pCO₂ and 20 % pCO₂.

4.4.3 Splošna primerjava odziva celic vseh 12 eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO₂

Z enosmerno ANOVO ($p < 0,01$), ki je bila izvedena na osnovnem setu kvantitativnih podatkov (2178 proteinskih lis), smo naredili primerjavo vseh 12 eksperimentalnih skupin, ki so predstavljale tri različne celične linije (starševska CHO-*Der3*, mAb CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX*), gojene pri štirih različnih pogojih (37 °C in 10 % pCO₂, 37 °C in 20 % pCO₂, 33 °C in 10 % pCO₂ ter 33 °C in 20 % pCO₂). Rezultat izračuna je pokazal, da je med vsemi 12 eksperimentalnimi skupinami glede na relativni povprečni volumen signala proteinskih lis statistično značilno različnih 1107. Kvantitativni podatki statistično značilno različnih proteinskih lis (1107) so predstavljeni vhodne podatke za analizo PCA.

Iz grafičnega prikaza rezultatov analize PCA (slika 18) je razvidno, da PC1 loči eksperimentalne skupine glede na celično linijo, in sicer eksperimentalne skupine starševske celične linije CHO-*Der3* od eksperimentalnih skupin obeh rekombinantnih celičnih linij (mAb CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX*). PC2 loči eksperimentalne skupine glede na temperaturo gojenja, torej 37 °C in 33 °C. Eksperimentalne skupine so ločene v individualne skupke, razen v primeru celičnih linij mAb CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX*, gojenih pri 33 °C in 20 % pCO₂, kjer se biološke ponovitve obeh eksperimentalnih skupin prepletajo, zato obe tvorita isti skupek. Na splošno se skupki eksperimentalnih skupin v grafičnem prikazu pojavljajo blizu skupaj glede na isto temperaturo gojenja, torej 37 °C ali 33 °C, kar nakazuje na podoben proteomski profil znotraj posamezne temperature gojenja. V dveh primerih je skupek, ki predstavlja eksperimentalno skupino pri pogojih gojenja 33 °C in 10 % pCO₂, pomaknjen bliže skupkom, ki predstavljajo eksperimentalne skupine, gojene pri temperaturi 37 °C. Gre za eksperimentalno skupino celične linije mAb CHO-*Der3-MTX* in eksperimentalno skupino starševske celične linije CHO-*Der3*. Pri prvi je pomik bolj opazen, pri drugi pa malo manj. V obeh primerih pomik proti področju, kjer so skupki eksperimentalnih skupin, gojenih pri temperaturi 37 °C, nakazuje, da je proteomski profil celic pri omenjenih dveh eksperimentalnih skupinah bolj podoben proteomskemu profilu celic eksperimentalnih skupin, gojenih pri temperaturi 37 °C. Na podlagi opaženega bi lahko sklepali, da temperatura gojenja in vrednost pCO₂ vsaj pri omenjenih dveh celičnih linijah korelirata.

Z dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$), faktorjema temperatura (vrednosti 37 °C in 33 °C) in pCO₂ (vrednosti 10 % in 20 %) je bilo z izračunom glede na temperaturo določenih 504 v volumnu signala statistično značilno različnih proteinskih lis, glede na vrednost pCO₂ pa 240. Omenjena domnevna interakcija med temperaturo in pCO₂ je bila z dvosmerno ANOVO potrjena, saj je izračun določil 17 proteinskih lis, ki so v volumnu signala statistično značilno različne glede na temperaturo in pCO₂.

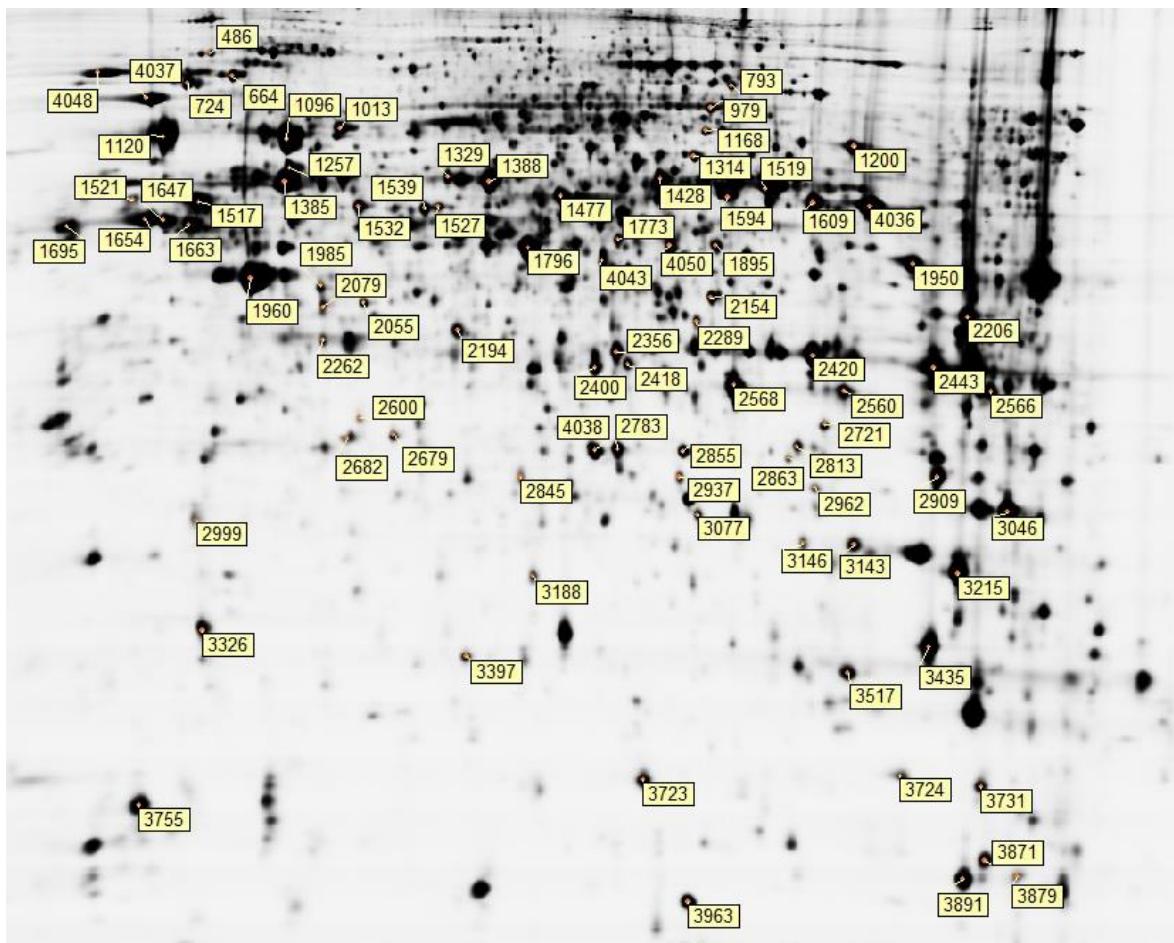


Slika 18: Grafični prikaz rezultatov analize PCA dvanajstih eksperimentalnih skupin, ki predstavljajo tri različne celične linije, gojene pri štirih različnih pogojih. Celične linije: starčevska CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3-MTX. Pogoji gojenja: 37 °C in 10 % pCO₂, 37 °C in 20 % pCO₂, 33 °C in 10 % pCO₂ ter 33 °C in 20 % pCO₂. PC1 predstavlja 37 % variacije in ločuje eksperimentalne skupine glede na celično linijo, in sicer starčevsko CHO-Der3 od obeh rekombinantnih celičnih linij. PC2 predstavlja 22 % variacije in ločuje eksperimentalne skupine glede na temperaturo gojenja, torej 37 °C in 33 °C.

Figure 18: Graphical representation of PCA analysis of the twelve experimental groups representing three different cell lines cultured at four different culturing conditions. Cell lines: parental CHO-Der3, mAb CHO-Der3 in mAb CHO-Der3 MTX. Culturing conditions: 37 °C and 10 % pCO₂, 37 °C and 20 % pCO₂, 33 °C and 10 % pCO₂, 33 °C and 20 % pCO₂. The PC1 represents 37 % of the variation and distinguishes between the experimental groups by the cell lines, according to the parental CHO-Der3 cells and the mAb-producing cells. The PC2 represents 22 % of the variation and distinguishes between the experimental groups by temperature, according to 37 °C and 33 °C.

4.5 IDENTIFIKACIJA PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Iz preprativnega gela smo izrezali 120 proteinskih lis, ki smo jih lahko uskladili med reprezentativnim analitskim in preprativnim gelom. Slika reprezentativnega analitskega gela z označenimi proteinskimi lisami je prikazana na sliki 19.



Slika 19: Reprezentativna slika analitskega gela. Na sliki so označene proteinske lise, ki smo jih izrezali iz preprativnega gela in jih pozneje identificirali z MS.

Figure 19: Representative analytical gel. Protein spots which were excised from preparative gel and identified by MS are annotated.

Proteinski vzorci iz izrezanih proteinskih lis so bili analizirani z masno spektrometrijo z uporabo tehnologije Maldi TOF-TOF. Identifikacijo smo izvedli z algoritmom Mascot MS/MS Ion Search. Z omenjenim algoritmom ocenujemo kakovost zadetka na podlagi rezultatov statistične značilnosti posameznih peptidov. Kriterij ustreznosti zadetkov je bil, da sta protein določala dva peptida ali več, vsak s statistično značilnim rezultatom ($p < 0,5$). Zadetke, ki niso ustrezali omenjenim kriterijem, smo izločili.

Od 120 proteinskih lis, ki smo jih izrezali in poslali na analizo z masno spektrometrijo, smo identificirali proteine v 87 proteinskih lisah (preglednica 4). 84 proteinskih lis predstavlja endogene proteine celice, tri pa rekombinantnen protein mAb. Med 84 proteinskimi lisami, v katerih so bili identificirani endogeni proteini celice, sta bila v štirih identificirana po dva različna proteina (v proteinskih lisah, označenih s številkami 1428, 1519, 1663 in 4043), trije proteini pa so bili identificirani v več kot eni proteinski lisi (fosfoglicerat mutaza, v dveh proteinskih lisah, označenih s številkama 2855 in 4038; nukleozid difosfat kinasa, v dveh proteinskih lisah, označenih s številkama 3517 in 3397; ter GSH-S-transferaza P, v dveh proteinskih lisah, označenih s številkama 3143 in 3146).

Rezultat analize 120 proteinskih lis z masno spektrometrijo je bilo 77 individualnih proteinov, ki so bili identificirani v 83 proteinskih lisah. V statistično obdelavo smo vključili omenjenih 77 proteinov oziroma 83 proteinskih lis, izključili pa smo tiste proteinske lise, v katerih je bil identificiran več kot en protein.

V proteinski lisi, označeni s številko 2909 (preglednica 4), smo identificirali proteina glutation S transferaza A1 in glutation S transferaza A3. V tem primeru ne gre za dva ločena zadetka, temveč za isti zadetek z identičnimi peptidi in vrednostjo statistične značilnosti (E value). V tabeli sta navedena oba zadetka, proteinsko liso pa smo vključili v nadaljnjo statistično obdelavo eksperimenta.

V proteinski lisi, označeni s številko 2962 (preglednica 4), smo identificirali protein 3-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza. Zadetek pri iskanju v bazi podatkov SwissProt z izbrano taksonomsko vrsto glodavci je bil statistično značilno identificiran le z enim peptidom, medtem ko je bil zadetek pri iskanju v bazi podatkov NCBInr z izbrano taksonomsko vrsto glodavci statistično značilno identificiran s tremi peptidi, in sicer kot 3-hidroksiacil-CoA dehidrogenaza tipu-2-podoben protein. V tabeli sta navedena oba zadetka, proteinsko liso pa smo vključili v nadaljnjo statistično obdelavo eksperimenta.

Proteinska lisa, označena s številko 2206 (preglednica 4), je bila s petimi peptidi identificirana kot fruktoza-bisfosfat aldolaza A. S štirimi peptidi je bila identificirana statistično značilno, z enim pa neznačilno. Podatek je v koloni preglednice, ki prikazuje število peptidov, zaveden kot 4 + 1.

Zaradi zaupnosti podatkov v seznamu identificiranih proteinov (preglednica 4) ni navedenih identifikacijskih podatkov za rekombinantni protein mAb (proteinske lise, označene s številkami 1609, 3046 in 4036).

Preglednica 4: Seznam identificiranih proteinov. Številke lis so v skladu s sliko 19. V preglednici so podani številka lise, ime identificiranega proteina, identifikacijska oznaka proteina UniProt, ki vključuje taksonomski izvor zadetka, teoretični vrednosti pI in M_w, število ujemajočih peptidov in pokritost zaporedja proteina s peptidnimi zadetki.

Table 4: List of identified proteins. Spot numbers correspond to numbers in figure 19. The table contains spot number, UniProt identification including taxonomic origin of the protein hit, theoretical pI in M_w values, number of peptide hits and sequence coverage with the hits are given.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	Mr	pI	Št. peptidov	Pokritost [%]
486	70 kDa protein toplotnega šoka 4	HSP74_RAT	94795	5,13	7	11
664	prehodna ATPaza endoplazemskega retikuluma	TERA_MOUSE	89950	5,14	8	11
724	vimentin	VIME_RAT	53757	5,06	8	21
793	daljni zgornji element – vezavni protein 2	FUBP2_MOUSE	77184	6,90	8	16
979	daljni zgornji element – vezavni protein 1	FUBP1_MOUSE	68668	7,74	8	14
1013	mitohondrijski stresni protein 70	GRP75_CRIGR	73970	5,87	8	14
1096	71 kDa-protein, soroden proteinu toplotnega šoka	HSP7C_CRIGR	70989	5,24	8	18
1120	78 kDa-protein, uravnavan z glukozo	GRP78_MOUSE	72492	5,07	7	16
1168	mitohondrijska karnitin O-palmitoiltransferaza 2	CPT2_MOUSE	74504	8,59	2	4
1200	transketolaza	TKT_MOUSE	68272	7,23	4	13
1257	podenota epsilon proteina 1 kompleksa T	TCPE_MOUSE	60042	5,72	6	14
1314	bifunkcionalni protein biosinteze purina PURH	PUR9_MOUSE	64690	6,30	6	15
1329	podenota alfa proteina 1 kompleksa T	TCPA_CRIGR	60814	5,71	7	14
1385	60 kDa-mitohondrijski protein toplotnega šoka	CH60_CRIGR	61122	5,83	6	16
1388	disulfid-izomeraza A3 (fragmenti)	PDIA3_MESAU	23373	4,75	4	25
1428	podenota zeta proteina 1 kompleksa T	TCPZ_MOUSE	58424	6,63	4	9
	D-3-fosfoglicerat dehidrogenaza	SERA_MOUSE	57347	6,12	4	12
1477	podenota beta proteina 1 kompleksa T	TCPB_RAT	57764	6,01	7	20
1517	veriga 1B tubulina alfa	TBA1B_CRIGR	50804	4,94	9	29
1519	piruvat kinaza (PKM)	KPYM_MOUSE	58378	7,18	4	11
	podenota eta proteina 1 kompleksa T	TCPH_MOUSE	60127	7,95	4	9
1521	vezavni protein RBBP7 histonov (za histone)	RBBP7_MOUSE	48102	4,89	6	20
1527	mitohondrijska aldehid dehidrogenaza	ALDH2_MESAU	54813	5,83	4	9
1532	citoplazemska hidroksimetilglutaril-CoA sintaza	HMCS1_CRIGR	57910	5,41	7	13
1539	citosolna nespecifična dipeptidaza	CNDP2_MOUSE	53190	5,43	3	8
1594	inosin-5'-monofosfat dehidrogenaza 2	IMDH2_CRIGR	56311	6,84	5	14
1609	mAb, težka veriga*	/	/	/	/	/
1647	podenota beta mitohondrijske ATP-sintaze	ATPB_MOUSE	56265	5,19	10	28
1654	veriga 5 tubulina beta	TBB5_CRIGR	50095	4,78	10	27
1663	protein disulfid-izomeraza A6	PDIA6_MESAU	48530	5,04	6	18
	podenota beta mitohondrijske ATP-sintaze	ATPB_MOUSE	56265	5,19	2	5
1695	kalretikulin	CALR_CRIGR	48384	4,33	2	4
1773	mitohondrijski elongacijski faktor Tu	EFTU_MOUSE	49876	7,23	4	9
1796	alfa enolaza	ENO_A_MOUSE	47453	6,37	3	7
1895	multifunkcijski protein ADE2	PUR6_RAT	47807	7,87	4	12
1950	fosfoglicerat-kinaza	PGK1_CRIGR	44933	8,02	5	20
1960	citoplazemski aktin 1	ACTB_CRIGR	42053	5,22	4	14
1985	aktivator 90 kDa- proteina toplotnega šoka (homolog ATPaze)	AHSA1_MOUSE	38321	5,41	4	12

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 4: Seznam identificiranih proteinov.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	Mr	pI	Št. peptidov	Pokritost [%]
2055	glutaredoksin 3	GLRX3_RAT	38111	5,51	4	15
2079	jedrni migracijski protein nudC	NUDC_RAT	38388	5,27	4	15
2154	citosolna acetil-CoA acetiltransferaza	THIC_MOUSE	41727	7,16	3	13
2194	podenota alfa mitohondrijske izocitrat dehidrogenaze [NAD]	IDH3A_MOUSE	40069	6,27	5	15
2206	fruktoza-bisfosfat aldolaza A	ALDOA_MOUSE	39787	8,31	4+1	23
2262	podenota alfal pokrovnega proteina F-aktina	CAZA1_RAT	33060	5,43	5	27
2289	poli(rC)-vezavni protein 1	PCBP1_MOUSE	37987	6,66	6	21
2356	aneksin A1	ANXA1_RAT	39147	6,97	3	12
2400	aldoza reduktazi podoben protein 2	ALD2_CRIGR	36602	6,23	4	18
2418	S-formilglutation hidrolaza	ESTD_RAT	31971	6,44	2	14
2420	aneksin A2	ANXA2_MOUSE	38937	7,55	8	28
2443	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	G3P_CRIGR	35953	8,49	3	10
2560	podenota 1, podobna podenoti beta 2 vezavnega proteria za gvanin nukleotid	GBLP_MOUSE	35511	7,60	8	35
2566	galektin 3	LEG3_CIRILO	25780	8,97	5	20
2568	veriga A L-laktat dehidrogenaze	LDHA_MOUSE	36817	7,62	2	6
2600	regulacijska podenota glutamat-cistein ligaze	GSH0_MOUSE	30858	5,35	2	10
2679	podenota beta pokrovnega proteina aktina F	CAPZB_MOUSE	31611	5,47	3	11
2682	prohibitin	PHB_MOUSE	29859	5,57	5	25
2721	tip 4 proteasomske podenote alfa	PSA4_MOUSE	29737	7,59	3	12
2783	triozafosfat izomeraza	TPIS_RAT	27345	6,89	3	14
2813	vezavni protein kalciklina	CYBP_MOUSE	26608	7,63	2	13
2845	peroksiredoksin 4	PRDX4_RAT	31216	6,18	4	20
2855	fosfoglicerat mutaza 1	PGAM1_MOUSE	28928	6,67	4	22
2863	mitohondrijska adenilat kinaza 2	KAD2_MOUSE	26737	6,96	3	15
2909	glutation S transferaza A1	GSTA1_MOUSE	25706	9,04	2	9
	glutation S transferaza A3	GSTA3_MOUSE	25401	8,76	2	9
2937	peroksiredoksin-6	PRDX6_MOUSE	24969	5,71	3	13
	3-hidroksiacil-CoA dehydrogenaza tipa 2					
2962	protein, podoben tipu 2 3-hidroksiacil-CoA dehydrogenaze	HCD2_MOUSE ERE65088	27516 28767	8,53 7,7	1 3	5 17
2999	disociacijski inhibitor Rho GDP 1	GDIR1_MOUSE	23450	5,12	5	24
3046	mAb, lahka veriga *	/	/	/	/	/
3077	proteasomska podenota alfa tipa 2	PSA2_MOUSE	26024	6,92	3	14
3143	glutation S transferaza P	GSTP1_CIRILO	23851	7,64	7	43
3146	glutation S transferaza P	GSTP1_CIRILO	23851	7,64	5	30
3188	protein DJ 1	PARK7_MOUSE	20236	6,32	3	7
3215	peroksiredoksin 1	PRDX1_CRIGR	22533	8,22	8	40
3326	evkariontski začetni dejavnik 5A 1	IF5A1_MOUSE	17049	5,08	4	33
3397	nukleozid-difosfat kinaza A	NDKA_RAT	17296	5,96	6	38
3435	tioredoksin	THIO_MOUSE	12010	4,80	4	35
3517	nukleozid-difosfat kinaza A	NDKA_MOUSE	17311	6,84	3	23
3723	40S-ribosomalni protein S12	RS12_MOUSE	14858	6,82	2	14
3724	peptidilprolin cis-trans izomeraza FKBP1A	FKB1A_MOUSE	11972	7,88	5	40
3731	profilin 1	PROF1_MOUSE	15119	8,46	6	37

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 4: Seznam identificiranih proteinov.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	Mr	pI	Št. peptidov	Pokritost [%]
3755	kofilin 1	COF1_RAT	18749	8,22	6	47
3871	mitohondrijski 10 kDa-protein toplotnega šoka	CH10_MOUSE	10956	7,93	4	19
3879	40S-ribosomski protein S21	RS21_MOUSE	9250	8,71	2	16
3891	acil-CoA-vezavni protein	ACBP_MOUSE	9994	8,78	2	27
3963	ubikvitin-40S-ribosomski protein S27a	RS27A_MOUSE	18282	9,68	3	21
4036	mAb, težka veriga*	/	/	/	/	/
4037	protein toplotnega šoka HSP 90-beta	HS90B_MOUSE	83571	4,97	8	12
4038	fosfoglicerat mutaza 1	PGAM1_MOUSE	28928	6,67	3	17
4043	alfa centractinz delitvijo povezan protein 2G4	ACTZ_MOUSE	42701	6,19	2	8
		PA2G4_MOUSE	44013	6,41	2	5
4048	endoplazmin	ENPL_MOUSE	92703	4,74	9	14
4050	citoplazemska izocitrat dehidrogenaza [NADP]	IDHC_MICME	46991	6,81	8	23

* Zaradi varovanja zaupnih podatkov identiteta rekombinantnega mAb ni razkrita in v preglednici identifikacijski podatki niso podani.

4.6 IDENTIFICIRANI PROTEINI NA PODLAGI STATISTIČNE OBDELAVE EKSPERIMENTA

4.6.1 Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 37 °C

Z dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) je bilo z izračunom določenih 17 proteinskih lise, katerih relativni povprečni volumen signala je bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂. Z masno spektrometrijo smo identificirali le enega, in sicer 78-kDa z glukozo regulirani protein (št. lise 1120).

Pomemben element pri vplivu parametrov gojenja na rekombinantne celične linije je tudi posreden vpliv na izražanje rekombinantnega proteina. V preglednici 5 so zato navedeni tudi podatki za proteinske lise, ki predstavljajo težko in lahko verigo mAb, in njihov relativni povprečni volumen signala ni statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂.

Preglednica 5: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen pri temperaturi gojenja 37 °C glede na vrednost pCO₂ (10 % in 20 %), in tistih, katerih relativni povprečni volumen signala ni statistično značilno različen pri isti temperaturi gojenja glede na vrednost pCO₂, vendar so predmet diskusije. V preglednici so podani številka lise, ime identificiranega proteina, identifikacijska oznaka proteina UniProt, ki vključuje taksonomski izvor zadetka, faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala, in p-vrednost dvosmerne ANOVE glede na vrednost pCO₂.

Table 5: List of identified proteins with a significantly different relative abundance at 37 °C according to pCO₂ and those with non-significantly different relative abundance at 37 °C according to pCO₂ but are discussed in the present study. The table contains spot number, UniProt identification including taxonomic origin of the protein hit, the fold difference in the average relative spot volume and the p-value according to culture temperature and pCO₂ level calculated by two-way ANOVA.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	Faktor razlike*	p-vrednost
			pCO ₂ 20 % / 10 %	2-ANOVA za pCO ₂
Statistično značilno različen pri 37 °C				
1120	78 kDa-protein, uravnavan z glukozo	GRP78	1,21	7,74E-03
Ne-statistično značilno različni pri 37 °C				
1609	mAb, težka veriga		1,06	0,349
3046	mAb, lahka veriga		1,02	0,414
4036	mAb, težka veriga		1,01	0,472

* Faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala predstavlja kvocient povprečnega relativnega volumna signala pri treh eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 20 % pCO₂, in povprečnega relativnega volumna signala pri treh eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 10 % pCO₂. Različnost glede na relativni povprečni volumen signala posamezne proteinske lise, ki predstavlja manjšo ali večjo vsebnost specifičnega proteina in je vključena v faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala, se nanaša na vse tri celične linije.

4.6.2 Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 33 °C

Z dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) je bilo z izračunom določenih 329 proteinskih lis, katerih relativni povprečni volumen signala je bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂. 23 identificiranih proteinskih lis, ki prestavljajo 22 individualnih proteinov, je navedenih v preglednici 6. Glutation S transferaza P je bila identificirana v dveh različnih proteinskih lisah, označenima s številkama 3143 in 3146.

V preglednici 6 so poleg podatkov o omenjenih 23 identificiranih proteinskih lisah navedeni tudi podatki za proteinske lise, katerih relativni povprečni volumen signala sicer ni statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂, vendar predstavljajo težko in lahko verigo mAb ali proteine, ki so soudeleženi v metabolnih procesih, v katerih igrajo ključno vlogo proteini, katerih vsebnost je bila statistično značilno različna glede na vrednost pCO₂.

Preglednica 6: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen pri temperaturi gojenja 33 °C glede na vrednost pCO₂ (10 % in 20 %), in tistih, katerih relativni povprečni volumen signala ni statistično značilno različen pri isti temperaturi gojenja glede na vrednost pCO₂, vendar so predmet diskusije. V preglednici so podani številka lise, ime identificiranega proteina, identifikacijska oznaka proteina UniProt, ki vključuje taksonomski izvor zadetka, faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala in p-vrednost dvosmerne ANOVE glede na vrednost pCO₂.

Table 6: List of identified proteins with a significantly different relative abundance at 33 °C according to pCO₂ and those with non-significantly different relative abundance at 33 °C according to pCO₂ but are discussed in the present study. The table contains spot number, UniProt identification including taxonomic origin of the protein hit, the fold difference in the average relative spot volume and the p-value according to culture temperature and pCO₂ level calculated by two-way ANOVA.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	Faktor razlike* pCO ₂ 20 % / 10 %	p vrednost 2-ANOVA za pCO ₂
Statistično značilno različni pri 33 °C				
979	daljni zgornji element – vezavni protein 1	FUBP1	-1,22	8,78E-04
1200	transketolaza	TKT	1,48	8,53E-07
1314	bifunkcionalni protein biosinteze purina PURH	PUR9	1,11	7,11E-03
1527	mitohondrijska aldehid dehidrogenaza	ALDH2	1,23	4,10E-03
1796	alfa enolaza	ENOA	1,17	2,30E-04
1950	fosfoglicerat-kinaza	PGK1	1,12	5,68E-04
2055	glutaredoksin 3	GLRX3	1,12	3,77E-03
2356	aneksin A1	ANXA1	1,08	9,59E-03
2400	aldoza reduktazi podoben protein 2	ALD2	1,63	3,40E-06
2418	S-formilglutation hidrolaza	ESTD	1,40	2,35E-05
2568	veriga A L-laktat dehidrogenaze	LDHA	1,37	5,27E-06
2600	regulacijska podenota glutamat-cistein ligaze	GSH0	1,42	2,29E-04
2721	tip 4 proteasomske podenote alfa	PSA4	1,13	9,41E-03

Se nadaljuje,

Nadaljevanje preglednice 6: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen pri temperaturi gojenja 33 °C glede na vrednost pCO₂ (10 % in 20 %), in tistih, katerih relativni povprečni volumen signala ni statistično značilno različen pri isti temperaturi gojenja glede na vrednost pCO₂, vendar so predmet diskusije.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	faktor razlike*	p vrednost
			pCO ₂ 20 % / 10 %	2-ANOVA za pCO ₂
2909	glutation-S-transferaza A1	GSTA1	1,42	2,30E-05
2937	peroksiredoksin 6	PRDX6	1,39	8,29E-06
3143	glutation S transferaza P	GSTP1	1,67	2,03E-05
3146	glutation S transferaza P	GSTP1	1,51	5,98E-04
3188	protein DJ 1	PARK7	1,19	2,64E-04
3215	peroksiredoksin 1	PRDX1	1,67	1,35E-04
3397	nukleozid difosfat kinaza A	NDKA	1,26	7,02E-03
3755	kofilin 1	COF1	1,19	1,96E-03
3891	acil-CoA-vezavni protein	ACBP	1,24	3,30E-03
4050	citoplazemska izocitrat dehidrogenaza [NADP]	IDHC	1,22	1,15E-04
Nestatistično značilno različni pri 33 °C				
2206	fruktoza-bisfosfat-aldolaza A	ALDOA	1,05	0,438
2443	gliceraldehyd-3-fosfat dehidrogenaza	G3P	1,00	0,477
2783	triozafosfat izomeraza	TPIS	1,16	0,0222
2855	fosfoglicerat mutaza 1	PGAM1	1,11	0,197
3435	tioredoksin	THIO	1,12	0,0109
4038	fosfoglicerat mutaza 1	PGAM1	1,13	0,0385
1609	mAb, težka veriga		1,14	0,0223
3046	mAb, lahka veriga		1,12	0,476
4036	mAb, težka veriga		1,05	0,568

* Faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala predstavlja kvocient povprečnega relativnega volumna signala pri treh eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 20 % pCO₂, in povprečnega relativnega volumna signala pri treh eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 10 % pCO₂. Različnost glede na relativni povprečni volumen signala posamezne proteinske lise, ki predstavlja manjšo ali večjo vsebnost specifičnega proteina in je vključena v faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala, se nanaša na vse tri celične linije, pri dveh pa se statistično značilno sprememba razlikuje med celičnimi linijami. Vsebnost proteinov ANXA1 in PUR9 je bila statistično značilno povečana pri zvišani vrednosti pCO₂ pri starševski celični liniji CHO-Der3 in celični liniji mAb CHO-Der3-MTX ter statistično značilno zmanjšana pri celični liniji mAb CHO-Der3.

4.6.3 Splošna primerjava odziva celic vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO₂

Z dvosmerno ANOVO ($p < 0,01$) je bilo z izračunom glede na temperaturo gojenja določenih 504 v relativnem povprečnem volumnu signala statistično značilno različnih proteinskih lis, glede na vrednost pCO₂ pa 240. Določenih je bilo tudi 17 proteinskih lis, na katere hkrati vplivata temperatura in pCO₂ (interakcija). Z masno spektrometrijo smo identificirali 14 proteinov, katerih vsebnost je bila statistično značilno različna glede na temperaturo gojenja, 4 glede na vrednost pCO₂ in 4 glede na interakcijo obeh parametrov. Eden izmed štirih proteinov, katerih vsebnost je bila statistično značilno različna glede

interakcije obeh parametrov, glutation S transferaza P, je bil identificiran v dveh različnih proteinskih lisah, označenima s številkama 3143 in 3146. Vsi omenjeni proteini so navedeni v preglednicah 7, 8 in 9.

V primerjavi s statistično analizo primerjave odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri posamezni temperaturi, 33 °C oziroma 37 °C (poglavlji 4.6.1 in 4.6.2), je bil set podatkov pri splošni primerjavi odziva celic dvanajstih eksperimentalnih skupin precej večji, zato kot statistično različni izpadajo le tisti proteini, katerih vsebnost se količinsko bolj spremeni v kombinaciji s ponovljivostjo znotraj posamezne skupine.

Preglednica 7: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen glede na temperaturo gojenja (37 °C in 33 °C). V preglednici so podani številka lise, ime identificiranega proteina, identifikacijska oznaka proteina UniProt, ki vključuje taksonomski izvor zadetka, faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala in p-vrednost dvosmerne ANOVA glede na vrednost pCO₂.

Table 7: List of identified proteins with a significantly different relative abundance according to culture temperature (37 °C in 33 °C). The table contains spot number, UniProt identification including taxonomic origin of the protein hit, the fold difference in the average relative spot volume and the p-value according to culture temperature and pCO₂ level calculated by two-way ANOVA.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	faktor pCO ₂ temperatura 33 °C/37 °C	p vrednost 2-ANOVA za temperaturo
724	vimentin	VIME_RAT	1,45	4,92E-06
1096	71 kDa-protein, soroden proteinu topotnega šoka	HSP7C_CRIGR	-1,37	2,77E-14
1120	78 kDa-protein, uravnavan z glukozo	GRP78_MOUSE	1,73	2,36E-04
1527	mitohondrijska aldehyd dehidrogenaza	ALDH2_MESAU	1,48	4,24E-07
1532	citoplazemska hidroksimetilglutaril-CoA sintaza	HMCS1_CRIGR	-1,47	7,74E-05
1985	aktivator 90 kDa- proteina topotnega šoka (homolog ATPaze)	AHSA1_MOUSE	-1,59	3,94E-09
2079	jedrni migracijski protein nudC	NUDC_RAT	-1,37	4,20E-08
2154	citosolna acetil-CoA acetiltransferaza	THIC_MOUSE	-1,48	1,66E-05
2356	aneksin A1	ANXA1_RAT	1,31	2,66E-04
2568	veriga A L-laktat dehidrogenaze	LDHA_MOUSE	1,58	7,46E-08
2813	vezavni protein kalciklina	CYBP_MOUSE	-1,45	7,91E-08
3215	peroksiredoksin-1	PRDX1_CRIGR	1,38	7,25E-06
4037	protein topotnega šoka HSP 90-beta	HS90B_MOUSE	-1,44	1,81E-07
4048	endoplazmin	ENPL_MOUSE	1,38	6,60E-04

* Faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala predstavlja kvocient povprečnega relativnega volumna signala pri šestih eksperimentalnih skupinah, gojenih pri temperaturi 33 °C, in povprečnega relativnega volumna signala pri šestih eksperimentalnih skupinah, gojenih pri temperaturi 37 °C. Različnost glede na relativni povprečni volumen signala posamezne proteinske lise, ki predstavlja manjšo ali večjo vsebnost specifičnega proteina in je vključena v faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala, se nanaša na vse tri celične linije.

Preglednica 8: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂ (10 % in 20 %). V preglednici so podani številka lise, ime identificiranega proteina, identifikacijska oznaka proteina UniProt, ki vključuje taksonomski izvor zadetka, faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala in p-vrednost dvosmerne ANOVE glede na vrednost pCO₂.

Table 8: List of identified proteins with a significantly different relative abundance according to pCO₂ level (10 % in 20 %). The table contains spot number, UniProt identification including taxonomic origin of the protein hit, the fold difference in the average relative spot volume and the p-value according to culture temperature and pCO₂ level calculated by two-way ANOVA.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	Faktor razlike*		p vrednost 2-ANOVA za pCO ₂
			pCO ₂ 20 %/10 %		
2400	aldoza reduktazi podoben protein 2	ALD2_CRIGR	1,33		2,68E-04
1200	transketolaza	TKT_MOUSE	1,32		2,23E-07
3143	glutation S transferaza P	GSTP1_CRILO	1,41		6,29E-07
3215	peroksiredoksin-1	PRDX1_CRIGR	1,46		6,85E-07

* Faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala predstavlja kvocient povprečnega relativnega volumna signala pri šestih eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 20 % pCO₂, ter povprečnega relativnega volumna signala pri šestih eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 10 % pCO₂. Različnost glede na relativni povprečni volumen signala posamezne proteinske lise, ki predstavlja manjšo ali večjo vsebnost specifičnega proteina, in je vključena v faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala, se nanaša na vse tri celične linije.

Preglednica 9: Lista identificiranih proteinov, katerih relativni povprečni volumen signala je statistično značilno različen glede na interakcijo temperature gojenja (37 °C in 33 °C) in vrednosti pCO₂ (10 % in 20 %). V preglednici so podani številka lise, ime identificiranega proteina, identifikacijska oznaka proteina UniProt, ki vključuje taksonomski izvor zadetka, faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala in p-vrednost dvosmerne ANOVE glede na vrednost pCO₂.

Table 9: List of identified proteins with a significantly different relative abundance according to interaction of culture temperature (37 °C in 33 °C) and pCO₂ level (10 % in 20 %). The table contains spot number, UniProt identification including taxonomic origin of the protein hit, the fold difference in the average relative spot volume and the p-value according to culture temperature and pCO₂ level calculated by two-way ANOVA.

Št. lise	Identificirani proteini	UniProt ID	Faktor razlike*		2 ANOVA interakcija
			pCO ₂ 20 %/10 %		
2418	S-formilglutation hidrolaza	ESTD_RAT	1,15		1,35E-03
2400	aldoza reduktazi podoben protein 2	ALD2_CRIGR	1,33		5,00E-03
2909	glutation S transferaza A1	GSTA1_MOUSE	1,19		1,35E-03
3143	glutation S transferaza P	GSTP1_CRILO	1,41		5,00E-03
3146	glutation S transferaza P	GSTP1_CRILO	1,22		5,35E-03

* Faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala predstavlja kvocient povprečnega relativnega volumna signala pri šestih eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 20 % pCO₂, ter povprečnega relativnega volumna signala pri šestih eksperimentalnih skupinah, gojenih pri 10 % pCO₂. Različnost glede na relativni povprečni volumen signala posamezne proteinske lise, ki predstavlja manjšo ali večjo vsebnost specifičnega proteina in je vključena v faktor razlike v povprečnem relativnem volumnu signala, se nanaša na vse tri celične linije.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Rast populacije celic, viabilnost celic in metabolna aktivnost celičnih linij pri spremenjenih fizikalnih parametrih gojenja, temperatura in pCO₂

5.1.1.1 Rast populacije celic in viabilnost celic

Iz rezultatov (poglavlje 4.1) je razvidno, da so celične kulture eksperimentalnih skupin vseh treh celičnih linij, gojenih pri 37 °C, po treh dneh dosegle višjo maksimalno koncentracijo živih celic v primerjavi s celičnimi kulturami eksperimentalnih skupin vseh treh celičnih linij, gojenih pri 33 °C. Poleg tega smo opazili, da višja vrednost pCO₂ pri 37 °C ne vpliva bistveno na hitrost rasti populacije celic, saj je bila pri vsaki od treh celičnih linij maksimalna koncentracija živih celic po treh dnevih gojenja pri različnih vrednostih pCO₂ zelo podobna. Viabilnost celic je bila pri vseh eksperimentalnih skupinah med tridnevno kultivacijo konstantno visoka. Znižana temperatura in zvišana vrednost pCO₂ v omenjenem časovnem okviru nista vplivali na viabilnost celic.

Podoben pojav upočasnjene rasti populacije celic in hkrati ohranjene viabilnosti celic pri nižji temperaturi gojenja so opazili tudi Moore in sod. (1997). Opaženo so pojasnili z upadom celične delitve, podaljšano fazo celičnega cikla G1 in posledičnim znižanjem razmerja uridin trifosfat/uridin difosfat–N-acetilheksozamina, kar v končni fazi omogoča vzdrževanje oziroma ohranitev viabilnosti celic. Pri nižji temperaturi je energijski naboj celic ostal nespremenjen, prišlo je do zakasnitve apoptoze, metabolizem celic pa se je upočasnil. Zakaj nastanejo pri nižji temperaturi opažene spremembe, niso ugotovili, poudarili pa so, da bi to lahko bilo zaradi ohranjanja oziroma kopiranja intracelularnih virov zaradi upočasnjene rasti populacije celic, zaviranja oziroma upada katabolitov, ne izključujejo pa potencialnega bolj specifičnega in kompleksnejšega mehanizma.

Medtem ko vrednost pCO₂ ni imela večjega vpliva na viabilnost celic pri višji temperaturi gojenja (37 °C), je bila večja variabilnost v hitrosti rasti populacije celic glede na vrednost pCO₂ opazna pri nižji temperaturi gojenja (33 °C). V tem primeru so celične kulture dosegle nižjo maksimalno koncentracijo živih celic pri višji vrednosti pCO₂ (med 5 in 8×10^5 celic/mL) v primerjavi s celičnimi linijami, gojenimi pri nižji vrednosti pCO₂ (med 15 in 20×10^5 celic/mL).

Pojav upočasnjene rasti celic in zmanjšane produkcije rekombinantnega produkta je bil pri višjih vrednostih pCO₂ v literaturi že opisan. Znana sta najmanj dva primera rekombinantnih celičnih linij CHO, pri katerih sta se upočasnila rast populacije celic in znižala produkcija rekombinantnega produkta. V obeh primerih so bile celične linije gojene pri 37 °C. V prvem primeru so opazili upočasnjeno rast populacije celic in znižano produktivnost rekombinantnega plazminogenskega aktivatorja (tPA) v območju med 140 mmHg in 250 mmHg (Kimura in Miller, 1996). Drugi primer podobno navaja pojav upočasnjene rasti populacije celic, znižane viabilnosti celic in zmanjšanje produkcije rekombinantnega virusnega antiga na celični liniji CHO DG44 (Gray in sod., 1996). Zvišno vrednost pCO₂ v kulturi povezujejo tudi z znižano vrednostjo intracelularnega pH, kar vpliva na delovanje endoplazemskega retikuluma in Golgijskega aparata ter posledično na delitev celic. Kimura in Miller (1996) predvidevata, da je negativen vpliv zvišane vrednosti pCO₂ na hitrost rasti celic, poleg omenjenih dejavnikov, povezan tudi s povečano porabo energije za vzdrževanje celic.

5.1.1.2 Metabolizem celic

Na osnovi primerjave trenda metabolne aktivnosti smo pri vseh treh celičnih linijah opazili štiri različne profile, ki ustrezajo štirim različnim pogojem gojenja. Metabolni profili se med celičnimi linijami nekoliko razlikujejo, opaziti pa je bilo, da sta si starševska celična linija CHO-Der3 in celična linija mAb CHO-Der3-MTX nekoliko bolj podobni, profili celične linije mAb CHO-Der3 pa se nekoliko razlikujejo od profilov preostalih dveh celičnih linij in nakazujejo, da je bila metabolna aktivnost celične linije mAb CHO-Der3 nekoliko večja (slika 14, poglavje 4.2) in bolj raznolika pri različnih parametrih gojenja. Čeprav vrednost pCO₂ v okviru trodnevnega gojenja pri 37 °C ni vplivala na hitrost rasti populacije celic, je bila metabolna aktivnost celic vseh treh celičnih linij zmanjšana pri zvišani vrednosti pCO₂. Pri temperaturi 33 °C profila metabolnih aktivnosti obeh vrednosti pCO₂ pričakovano sovpadata z rastnimi profili pri vseh treh celičnih linijah. Pri nižjih koncentracijah živih celic je bila namreč opazna tudi zmanjšana metabolna aktivnost.

Primerjava specifičnih vrednosti porabe substratov in produkcije metabolita je pokazala, da znižana temperatura gojenja generalno vpliva na specifično metabolno aktivnost v pomenu manjše porabe glukoze in glutamina, medtem ko se je produkcija laktata pri vseh treh celičnih linijah povečala. Med celičnimi linijami je bilo sicer opaziti nekaj razlik glede na omenjeni trend, in sicer v specifični porabi glutamina pri mAb CHO-Der3 pri 10 % pCO₂ ter mAb CHO-Der3-MTX pri 20 % pCO₂, ter produkciji laktata pri mAb CHO-Der3 pri 20 % pCO₂. Iz razmerja med specifično produkcijo laktata in specifično porabo glukoze je razvidno, da je bila metabolna aktivnost pri vseh treh celičnih linijah ne glede na vrednost pCO₂ pri nižji temperaturi spremenjena. Pri zvišani vrednosti pCO₂ je bila metabolna

aktivnost zmanjšana glede na vse tri merjene količine (glukoza, glutamin, laktat) ne glede na temperaturo gojenja, vendar pa je bilo iz razmerja med specifično produkcijo laktata in specifično porabo glukoze pri vseh treh celičnih linijah opaziti, da so celice pri višji vrednosti pCO₂ producirale več laktata glede na količino porabljenne glukoze kot pri nižji vrednosti pCO₂ (izjema mAb CHO-Der3, kjer bilo pri 37 °C razmerje pri 20 % pCO₂ malenkost nižje). Omenjena dejstva nakazujejo, da se je metabolizem pri višji vrednosti pCO₂ ne glede na temperaturo gojenja spremenil v pomenu večje produkcije laktata, torej v smeri manj učinkovitega anaerobnega metabolizma glukoze. Sprememba je bila očitnejša pri nižji temperaturi gojenja.

Tudi v literaturi je pri nižjih temperaturah gojenja celičnih linij pogosto opažena upočasnjena oziroma manjša metabolna aktivnost, ki se kaže v zmanjšani porabi glukoze, zmanjšani porabi kisika in zmanjšani produkciji laktata in amonijaka. Znano je, da počasnejša metabolna aktivnost vodi v zakasnjeno iniciacijo apoptoze (Moore in sod., 1997) in podaljšano fazo G0/G1 (Yoon in sod., 2003a), kar izkoriščajo v proizvodnji rekombinantnih proteinov za podaljševanje stacionarne oziroma produkcijske faze bioprosesa (Yoon in sod., 2003b; Kumar in sod., 2007).

Treba je poudariti, da je vpliv nižjih temperatur na celice nujno povezan s spremembom koncentracije raztopljenega kisika v kulturi, saj je topnost plinov pri nižjih temperaturah večja (Al-Fageeh in sod., 2005), kar se seveda nanaša tudi na CO₂ in O₂. Večja topnost CO₂ oziroma višja vrednost pCO₂ rezultira v znižanem intracelularnem pH (Kimura in Miller, 1996), za katerega pa deZengotita in sod. (2002) poročajo, da vpliva na metabolizem celic, saj zmanjša aktivnost glikolize (ihnicija fosfofruktokinaze in preko prisotnosti oziroma lokalizacije heksokinaze, ki fosforilira glukoza za vstop v glikolizo), na presnovo glutamina pa naj ne bi imel večjega vpliva. Znano je tudi, da nizek intracelularni pH spremeni metabolizem glukoze in aktivnost dihalne verige, kar vodi v tvorbo dodatnih ROS (Kimura and Miller, 1996; Riemann, 2013). Hiperoksija oziroma zvišana koncentracija kisika v kulturi je dodaten dejnik povečanja nastanka ROS, pri kateri se rezerve in kapaciteta glikolize načelno zmanjšajo. Povečan nastanek ROS v mitohondrijih vpliva na komponente elektronskega transporta, celotno dihalno verigo in glikolizni in mitohondrijski energetski metabolizem (Kumuda 2013).

Producija laktata je glede na literaturo povečana v naslednjih primerih: i) pri celicah, ki rastejo pri anaerobnih pogojih okolja (Stryer, 1995), ii) pri rakavih celicah, ki hitro rastejo in hitro porabljajo glukozo pri aerobnih pogojih okolja (Warburgov pojav) (Warburg, 1956), in iii) kot mehanizem obrambe celice pri čezmerni produkciji ROS, s čimer celica s preusmeritvijo piruvata v laktat zmanjša produkcijo ROS, ki nastajajo kot stranski metabolni produkt dihalne verige (Brand, 1997; Ralph in sod., 2010). Zadnje je

najverjetnejša razлага opažene spremenjene produkcije laktata glede na porabljeno glukozo v našem primeru. Ker so bile celice gojene pri aerobnih pogojih, je najverjetneje prišlo do sprememb v metabolizmu celic pri nižji temperaturi (povečana specifična produkcija laktata glede na specifično porabo glukoze) zaradi spremenjenih vrednosti raztopljenih plinov ter posledično bolj kislega in oksidativnega okolja v primerjavi z gojenjem celic pri višji temperaturi. Zvišani vrednosti pCO_2 in pO_2 zaradi povečane topnosti plinov pri nižji temperaturi, predvsem pa je namerno zvišana vrednost pCO_2 , predstavljajo kombiniran dejavnik, ki je najverjeneje negativno vplival na glikolizo in mitohondrijski energijski metabolizem, saj znižan intracelularni pH poveča nastanek ROS, kar je celicam povzročilo oksidativni stres. Metabolna aktivnost celic je bila pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 sicer zmanjšana, vendar pa je iz rezultatov mogoče sklepati, da so celice zaradi povečane tvorbe ROS preusmerile pretvorbo piruvata v laktat, kar je bilo opazno iz razmerja specifičnih vrednosti porabe glukoze in produkcije laktata. Preusmeritev metabolizma na manj učinkovito anaerobno pot najverjetneje predstavlja mehanizem obrambe celic pred oksidativnimi dejavniki, saj vodi v zmanjševanje (čezmerne) produkcije ROS v mitohondrijih in tako regulira moteno oksidativno stanje.

Zanimivo je, da sta si pri dveh celičnih linijah, starševski celični liniji CHO-*Der3* in celični liniji mAb CHO-*Der3-MTX*, metabolna profila eksperimentalnih skupin, ki predstavljata celične kulture, gojene pri 37 °C in 20 % pCO_2 ter pri 33 °C in 10 %, zelo podobna. Pojav je bilo opaziti že pri statistični obdelavi oziroma primerjavi vseh 12 eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO_2 (poglavlje 4.4.3), kjer sta bila na grafičnem prikazu rezultatov analize PCA (slika 18) skupka, ki predstavlja eksperimentalni skupini starševska celična linija CHO-*Der3*, gojena pri 33 °C in 10 % pCO_2 , in celična linija mAb CHO-*Der3-MTX*, gojena pri 33 °C in 10 % pCO_2 , pomaknjena bliže skupkom, ki predstavljajo eksperimentalne skupine, gojene pri temperaturi 37 °C. Drugačen odziv celične linije mAb CHO-*Der3* na spremembo pogojev gojenja smo opazili tudi iz analize specifičnih vrednosti obeh substratov in metabolita, saj se pri 37 °C in povečani vrednosti pCO_2 specifična poraba glutamina ni zmanjšala tako kot pri drugih dveh, specifična produkcija laktata je bila generalno najmanjša, poleg tega pa je bilo razmerje med specifično produkcijo laktata in specifično porabo glukoze pri vseh štirih pogojih gojenja najnižje. Metabolizem celične linije mAb CHO-*Der3* očitno bolj učinkovito v primerjavi s celičnima linijama starševska CHO-*Der3* in mAb CHO-*Der3-MTX* kot vir energije porablja glutamin, zato so celice manj odvisne od metabolizma glukoze, posledično pa spremembe okolja, ki vplivajo na potek glikolize, nimajo enakega vpliva in se specifična tvorba laktata glede na specifično porabo glukoze pri spremenjenih pogojih gojenja ne spremeni v taki meri. Razlike v metabolizmu med celičnimi linijami je bilo opaziti tudi na podlagi razmerja produkcije laktata in porabe glukoze, saj je bilo razmerje pri rekombinantni celični liniji mAb CHO-*Der3-MTX* pri treh različnih pogojih

gojenja večje v primerjavi z razmerjem pri preostalih dveh celičnih linijah. Sklepamo lahko, da se je z adaptacijo na MTX metabolizem celic spremenil v pomenu večje produkcije laktata glede na porabljeno glukozo ne glede na pogoje gojenja. Poleg tega je bila spremembra v razmerju specifične produkcije laktata in specifične porabe glukoze po zvišanju vrednosti pCO_2 pri 33 °C pri obeh rekombinantnih celičnih linijah manjša, kar nakazuje na pozitivni učinek transfekcije in seleksijskega pritiska na robustnost celic.

5.1.1.3 Povzetek hitrosti rasti populacije, viabilnosti in metabolizma celic

Znižana temperatura gojenja je pri vseh celičnih linijah rezultirala v nižji maksimalni koncentraciji živih celic, kar lahko povežemo z upadom celične delitve in podaljšano fazo celičnega cikla G1 oziroma zakasnitevjo apopotoze. Višja vrednost pCO_2 v kulturi pri temperaturi 37 °C ni bistveno vplivala na hitrost rasti populacije celic, medtem ko se je pri temperaturi 33 °C maksimalna koncentracija živih celic znižala, kar je lahko posledica znižane vrednosti intracelularnega pH in pH celičnih organelov (kot posledica večje topnosti CO_2 pri nižji temperaturi), kar posredno vpliva na celično delitev, poleg tega pa celica pri suboptimalnih pogojih porabi veliko energije za vzdrževanje. Viabilnost celic je pri vseh testiranih pogojih ostala konstantno visoka.

Pri temperaturi 33 °C je bil v primerjavi z gojenjem celic pri 37 °C njihov metabolizem pričakovano upočasnjen, saj se pri nižjih temperaturah viabilnost in energijsko stanje celic običajno ohranjata, metabolizem pa se posledično upočasni. Čeprav vrednost pCO_2 v okviru tridnevnega gojenja pri 37 °C ni vplivala na hitrost rasti populacije celic, je bila metabolna aktivnost celic vseh treh celičnih linij zmanjšana pri zvišani vrednosti pCO_2 . Pri temperaturi 33 °C sta profila matabolnih aktivnosti pri vseh treh celičnih linijah pričakovano sovpadala z rastnimi profili, saj je bila pri nižjih koncentracijah živih celic opazna tudi zmanjšana metabolna aktivnost. Zmanjšana metabolna aktivnost je pri obeh temperaturah gojenja lahko posledica inhibicije glikolize. Glede na rezultate je bila metabolna aktivnost upočasnjena glede na vse tri kontrolirane metabolne parametre (poraba glukoze in glutamina ter tvorba laktata).

Razmerje med specifično produkcijo laktata in specifično porabo glukoze kaže, da na metabolizem v pomenu večje produkcije laktata glede na količino porabljeni glukoze vplivata temperatura in vrednost pCO_2 . Izrazitejša povečana specifična produkcija laktata glede na specifično porabo glukoze pri višji vrednosti pCO_2 in nižji temperaturi je po vsej verjetnosti posledica kombiniranega vpliva kislega in oksidativnega okolja na glikolizo, mitohondrijski energijski metabolizem in oksidativno stanje celice (nastanek ROS).

Metabolizem celične linije mAb CHO-Der3 se nekoliko razlikuje od metabolizma preostalih dveh celičnih linij. Celična linija mAb CHO-Der3 kot vir energije očitno bolj efektivno porablja glutamin, zato se specifična tvorba laktata glede na specifično porabo glukoze pri spremenjenih pogojih gojenja ne spremeni v taki meri. Na metabolizem in robustnost celic očitno vplivata tudi transfekcija in selekcijski pritisk, saj se rekombinantni celični liniji na neugodne pogoje gojenja iz metabolnega vidika odzoveta manj intenzivno. Z adaptacijo na MTX se je v primeru celične linije mAb CHO-Der3-MTX metabolizem celic spremenil v primerjavi z mAb CHO-Der3 v pomenu večje produkcije laktata glede na porabljeno glukozo ne glede na pogoje gojenja.

5.1.2 Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 37 °C

Število proteinskih lis, katerih relativni povprečni volumen signala je bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 37 °C, je relativno majhno (17) glede na število lis v osnovnem setu kvantitativnih podatkov (2178) in v primerjavi s številom proteinskih lis, ki so v volumnu signala statistično značilno različne glede na vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 33 °C (329). Z masno spektrometrijo smo identificirali le eno od 17 proteinskih lis, katerih relativni povprečni volumen signala je bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂. Vzrok za to je način izbora proteinskih lis, ki smo jih poslali na analizo z masno spektrometrijo, saj smo poslali le tiste, ki smo jih lahko uskladili med reprezentativnim analitskim in preparativnim gelom.

Identificiran protein, vsebnost katerega je bila povečana pri vseh treh celičnih linijah pri višji vrednosti pCO₂ (20 %), predstavlja 78 kDa-protein, uravnavan z glukozo (GRP78, št. lise 1120; preglednica 5). Gre za protein toplotnega šoka (HSP) oziroma stresni protein iz družine proteinov toplotnega šoka 70 (HSP 70). Protein je udeležen pri združevanju proteinskih kompleksov v endoplazemskejem retikulumu ter pri pravilnem zvijanju proteinov in razgradnji napačno zvitih proteinov (P20029; UniProt, 2014). Proteini HSP niso udeleženi le v odzivih na zvišano temperaturo, temveč tudi v odzivih na stresne pogoje na splošno. Prav tako imajo pomembno vlogo pri popravljalnih mehanizmih in mehanizmih obrambe, ki se sprožijo kot odziv celic na stresne pogoje in so udeleženi pri apoptozi, ki jo v endoplazemskejem retikulumu sprožijo stresni pogoji (FitzGerald in sod., 2006).

5.1.2.1 Relativna vsebnost rekombinantnega mAb v celici pri 37 °C in zvišani vrednosti pCO₂

Relativni povprečni volumen signala pri treh proteinskih lisah, ki predstavljajo HC in LC rekombinantnega mAb (št. lis 1609, 3046 in 4036; preglednica 5), ni bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂, kar pomeni, da zvišana vrednost pCO₂ v kulturi (20 %) pri temperaturi gojenja 37 °C ni vplivala na relativno vsebnost rekombinantnega mAb v celici.

5.1.2.2 Povzetek odziva celic na zvišano vrednost pCO₂ pri 37 °C

Iz le enega identificiranega proteina težko sklepamo na splošen odziv celic na zvišano vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 37 °C. Če primerjamo število proteinov, katerih vsebnost je bila statistično značilno različna glede na vrednost pCO₂ v kulturah, gojenih pri temperaturi 37 °C, in v kulturah, gojenih pri temperaturi 33 °C, lahko sklepamo, da je odziv celic pri 33 °C s 329 v volumnu signala statistično značilno različnimi proteinskimi lisami veliko intenzivnejši od odziva celic pri 37 °C, kjer je v volumnu signala statistično značilno različnih le 17 proteinskih lis. Manjša občutljivost celičnih linij, gojenih pri temperaturi 37 °C, na zvišano vrednost pCO₂ je dodatno podprta z analizami PCA (poglavlji 4.4.2 in 4.4.3), iz katerih je razvidno, da eksperimentalne skupine celičnih kultur, gojenih pri 37 °C, niso ločene glede na vrednost pCO₂, medtem ko so eksperimentalne skupine celičnih kultur, gojenih pri 33 °C, jasno razdeljene. Relativna intracelularna vsebnost rekombinantnega mAb se pri višji vrednosti pCO₂ v kulturi ni spremenila.

5.1.3 Primerjava odziva celic šestih eksperimentalnih skupin na zvišano vrednost pCO₂ pri 33 °C

Od 329 proteinskih lis, katerih relativni povprečni volumen signala je bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 33 °C, jih je bilo identificiranih 23 in predstavljajo 22 individualnih proteinov (preglednica 6).

Identificirane proteine, katerih vsebnost je bila statistično značilno različna glede na vrednost pCO₂ v kulturi, lahko razdelimo v devet kategorij:

- i. Protein, ki je neposredno vpletен v regulacijo procesiranja mRNK (FUBP1).
- ii. Proteini, vpleteni v glikolizo (PGK1, ENOA, LDHA).
- iii. Protein, vpletен в PFP (TKT).
- iv. Proteina, vpletена в синтезу пуринов (PUR9, NDKA).
- v. Proteini, vpleteni в антиоксидативно обрамбо (GSH0, GSTA1, GSTP1, IDHC, GLRX3, PRDX1, PRDX6, PARK7, ESTD, ALD2, ALDH2).
- vi. Protein, vpletен в разградњо протеинов (PSA4).
- vii. Структурни протеин (COF1).
- viii. Protein, vpletен в метаболизем маščobnih кислинов (ANXA1).
- ix. Protein, vpletен в метаболизем липидов (ACBP).

Vsebnost vseh omenjenih identificiranih proteinov, razen enega (protein, ki se veže na daljni zgornji element zaporedja; FUBP1), je bila v celicah kultur, gojenih pri višji vrednosti pCO₂ (20 %), statistično značilno povečana. Vsebnost proteina FUBP1 je bila pri vseh treh celičnih linijah pri višji vrednosti pCO₂ zmanjšana. Statistično značilna razlika glede na relativni povprečni volumen signala posamezne proteinske lise, ki predstavlja povečanje ali zmanjšanje vsebnosti posameznega identificiranega proteina v celicah, se pri 21 proteinskih lisah nanaša na vse tri celične linije, v primeru dveh proteinskih lis pa se statistično značilna razlika med celičnimi linijami razlikuje v smislu povečanja in zmanjšanja. Vsebnost proteinov ANXA1 in PUR9 je bila namreč pri višji vrednosti pCO₂ statistično značilno povečana pri starševski celični liniji CHO-Der3 in celični liniji mAb CHO-Der3-MTX ter statistično značilno zmanjšana pri celični liniji mAb CHO-Der3.

5.1.3.1 Oksidativni stres

Veliko število identificiranih proteinov, katerih vsebnost je bila pri 33 °C statistično značilno povečana pri višji vrednosti pCO₂ v primerjavi z nižjo, je vpletene v antioksidativni mehanizem celic, ki ga predstavlja dva glavna redoks regulatorna sistema: antioksidativni mehanizem GSH in antioksidativni mehanizem Trx.

Šest identificiranih proteinskih lis, katerih relativni povprečni volumen signala je bil statistično značilno povečan v celicah pri višji vrednosti pCO₂, predstavlja proteine, vpletene v redoks regulatorni sistem, ki bazira na GSH. Omenjenih šest proteinskih lis predstavlja pet individualnih proteinov: regulacijska podenota glutamat-cistein ligaze (GSH0); citoplazemska izocitrat dehidrogenaza [NADP] (IDHC1); GSH-S-transferaza A1 (GSTA1); GSH-S-transferaza P1 (GSTP1); glutaredoksin 3 (GLRX3); in peroksiredoksin 6 (PRDX6). Vsebnost proteinov, ki neposredno spadajo v antioksidativni mehanizem GSH, GSH0, GSTPA1, GSTP1 in PRDX6, se je pri vseh treh celičnih linijah povprečno povečala od 1,42- do 1,67krat in v primeru GLRX3 – 1,12-krat. Vsebnost IDHC, ki pri antioksidativnem mehanizmu GSH sodeluje posredno, se je pri vseh treh celičnih linijah povprečno povečala 1,22-krat.

Encimski kompleks glutamat-cistein ligaza (GLC) je heterodimer, sestavljen iz katalitične (GCLC) in modifikacijske (GLCM) podenote. Kompleks je vpletен v sintezo GSH in katalizira vezavo glutamata in cisteina ter formira glutamilcistein (Lu, 2013). GSH0 (št. lise 2600) je del podenote GLCM. Dejstvo, da je vsebnost proteina GSH0 statistično značilno povečana v celicah kultur, ki so bile gojene pri višji vrednosti pCO₂, kaže, da je pri omenjenih pogojih sinteza GSH povečana.

GSTA1 in GSTP1, ki sta kot GLC del antioksidativnega mehanizma GSH, spadata v družino izoencimov GST, ki omogočajo konjugacijo GSH z različnimi elektrofili. Glavni vlogi izoencimov GST sta zaščita celice pred oksidativno toksičnostjo (npr. neposredna vezava elektrofilov, posredovanje pri uničevanju lipidnih peroksidov) in regulacija apoptoze, ki jo povzročajo stresni dejavniki (Sharma in sod., 2004). Do zdaj je bilo v sesalcih identificiranih sedem različnih razredov GST (mu, pi, teta, alfa, sigma, omega in zeta). Geni GST kažejo na funkcionalne poliformizme glede na tip in aktivnosti GST. Ti poliformizmi so po vsej verjetnosti vzrok za razlike med individualnimi GST pri njihovem delovanju v odgovoru na ksenobiotike in pri odstranjevanju produktov ozioroma posledic oksidativnih dejavnikov (McIlwain in sod., 2006). Več izoencimov različnih razredov GST so povezali tudi z mitogeni aktivirano protein kinazno (MAPK) potjo in so tako vključeni v signaliziranje preživetja ali smrti celice (Davis, 2000).

Rezultati so pokazali statistično značilno povečano vsebnost izoencimov GST GSTA1 (št. lise 1909) in dveh različnih izoform GSTP1 (št. lis 3143 in 3146) v celicah kultur, gojenih pri višji vrednosti pCO_2 . GSTA1 spada v razred alfa družine GST in je eden glavnih akterjev zaščite pred peroksidacijo lipidov, poleg tega pa sodeluje pri regulaciji kaskade signalizacije preko lipidnih hiperoksidov in pri zaščiti celice proti oksidativni toksičnosti (Sharma in sod., 2004). GSTP1 spada v razred pi družine GST, njegova glavna vloga je kataliza konjugacije elektrofilnih ksenobiotikov z GSH. Poleg tega ima visoko afiniteto do nizko molekularnih aldehidov, regulira c-Jun N-terminalno kinazo in katalizira glutationacijo in deglutationacijo proteinov (Wetzelberger in sod., 2010).

Encim Grx (GLRX3, št. lise 2055), katerega vsebnost se je statistično značilno povečala pri celicah kultur, gojenih pri višji vrednosti pCO_2 , je tiol-disulfid oksidoreduktaza. Tioldisulfid oksidoreduktaze s hkratno pretvorbo GSH v GSSG katalizirajo redukcijo disulfidov v prisotnosti NADPH in GSH-reduktaze (Mieyal in sod., 2008). Zaradi svoje sposobnosti redukcije tiolov sodelujejo tudi pri alternativnih sinteznih poteh, kot na primer formiranju deoksiribonukleotidov za sintezo DNK (ribonukleotid reduktaza), generiranje reducirane oblike žvepla (3'-fosfoadenililsulfat reduktaza), signalni transdukcijski in odzivu celice na oksidativni stres (Fernandes in sod., 2004).

PRDX6 (št. lise 2937) je edini predstavnik družine Prx, katerega katalitična funkcija ni odvisna od Trx, ampak od GSH. Njegova vsebnost je bila statistično značilno povečana v celicah, gojenih pri višji vrednosti pCO_2 . Encim ima dve funkciji – peroksidazno in fosfolipazno A₂. Kot peroksidaza reducira fosfolipidne hidroperokside in tako sodeluje pri obrambi celice proti oksidativni toksičnosti. S svojo fosfolipazno aktivnostjo A₂ in hidrolizo reduciranih oziroma nativnih fosfolipidov sodeluje tudi pri katabolizmu fosfolipidov pri kislem pH (Fisher, 2011).

Povečana vsebnost petih encimov, ki so del antioksidativnega mehanizma GSH (GSH0, GSTPA1, GSTP1, GLRX3 in PRDX6), kaže, da je bil pri temperaturi gojenja 33 °C v celicah pri višji vrednosti pCO_2 omenjeni mehanizem inducirani oziroma bolj aktiven kot pri nižji vrednosti pCO_2 .

IDHC1 (št. lise 4050) je encim, ki je povezan z antioksidativnim mehanizmom GSH preko oskrbovanja celice oziroma omenjenega mehanizma z reduksijskim ekvivalentom NADPH. Protein je namreč citosolni encim, ki reducira NADP⁺ v NADPH. Reakcija je povezana z redukcijo GSSH v GSH, ki jo katalizira GSH-reduktaza (GR) in poteče hkrati z oksidacijo NADPH v NADP⁺ (sliki 6 in 7). Redukcijski ekvivalent NADPH v celici v glavnem zagotavlja oziroma obnavlja izocitrat dehidrogenaza (IDH), manj pa tudi malat dehidrogenaza (MDH), glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) in fosfoglukonat

dehidrogenaza (6PGD) (Will, 1999). Vsi ti encimi so zaradi svoje vloge del antioksidativnega mehanizma GSH. Statistično značilno povečanje vsebnosti encima IDHC pri celicah kultur, gojenih pri višji vrednosti pCO_2 , kaže na povečano aktivnost antioksidativnega mehanizma GSH.

Podobno, a indirektno, nakazuje statistično značilno 1,48-kratno povečanje vsebnosti encima transketolaze (TKT; št. lise 1200). TKT je namreč vpletena v cikel PFP, v katerem encima G6PD in 6PGD katalizirata prvi dve od štirih reakcij cikla PFP (pretvorba glukoze-6-fosfat do riboze-5-fosfat) in hkrati tvorbo NADPH (slika 1). TKT katalizira pretvorbo substrata riboze-6-fosfat v gliceraldehid-3-fosfat, ki se nadalje preko reakcij glikolize pretvori v končni produkt glikolize, piruvat (slika 1). Encimov G6PD in 6PGD v študiji nismo identificirali z masno spektrometrijo in o njuni morebitni spremenjeni vsebnosti nimamo podatkov. Vendar pa lahko na temelju statistično značilno povečane vsebnosti encima TKT pri celicah kultur, gojenih pri višji vrednosti pCO_2 , sklepamo na povečano sintezo substrata za TKT, riboza-5-fosfat, ki se s pomočjo encimov G6PD in 6PGD tvori iz glukoze-6-fosfat. Tako predvidena povečana vsebnost encimov G6PD in 6PGD ozioroma aktivnost cikla PFP kaže na povečano tvorbo NADPH, na podlagi česar lahko sklepamo o povečanih potrebah celice po omenjenem reduksijskem ekvivalentu, ki sodeluje pri reduktivnih biosintezah in redukciji molekul, ki so vključene v obrambne mehanizme celice pri oksidativnem stresu (Stryer, 1997).. Povečana aktivnost cikla PFP torej posredno nakazuje na povečano aktivnost antioksidativnega mehanizma GSH.

Rezultati torej nakazujejo neposredno s statistično značilnim povečanjem vsebnosti encima IDHC in posredno s statistično značilnim povečanjem vsebnosti encima TKT posledično predpostavljene povečane aktivnosti PFP in s tem tudi encimov G6PD in 6PGD, da je pri pri 33 °C pri višji vrednosti pCO_2 tvorba reduksijskega ekvivalenta NADPH v celicah povečana v primerjavi s celicami, gojenimi pri višji vrednosti pCO_2 .

Glede na literaturo se aktivnost cikla PFP poveča v primeru povečanih potreb celice po reduksijskem ekvivalentu NADPH (Stryer, 1997). Do potrebe celic po večjih količinah NADPH privedejo naslednje okoliščine: (i) ko so kot vir energije na voljo pentozni sladkorji, (ii) ko je povečana reduktivna biosinteza in (iii) ko je povečana sinteza nukleotidov, nukleinskih kislin, ATP in koencimov ter je zato večja tudi poraba substrata riboza-6-fosfat (Stryer, 1997). Glede na rezultate sprememb v vsebosti identificiranih proteinov lahko sklepamo, da so pri 33 °C, pri višji vrednosti pCO_2 v primerjavi z nižjo vrednostjo v celicah povečane naslednje reduktivne biosintezne poti: redukcija GSH (neposredno ali posredno povezani proteini z antioksidativnim mehanizmom GSH so: GSH0, št. lise 2600; IDHC1, št. lise 4050; GSTA1, št. lise 1909; GSTP1, št. lis 3143 in 3146; GLRX3, št. lise 2055; PRDX1, št. lise 3215; PRDX6, št. lise 2937, ter TKT, št. lise

1200), metabolni procesi maščobnih kislin (ANXA1, št. lise 2356), metabolni procesi lipidov (ACBP, št. lise 3891) in sinteza purinov (PUR9, št. lise 1314; NDKA, št. lise 3397), ki med celično delitvijo vodi do pretvorbe ribonukleotidov v deoksiribonukleotide.

V celicah kultur, gojenih pri 33 °C, sta bila pri višji vrednosti pCO₂ zaznana statistično značilno 1,67-kratno povečanje vsebnosti proteina PRDX1 (št. lise 3215) in trend povečane vsebnosti Trx (THIO, št. lise 3435). Oba proteina sta del antioksidativnega mehanizma Trx. Že v pregledu objav (poglavlje 2.5) je omenjeno, da je antioksidativni mehanizem Trx preko reducirajočih encimov ribonukleotid reduktaze in metionin sulfoksid reduktaze (Msr) vpleten v popravljalne mehanizme DNK in proteinov ter ima vlogo pri regulaciji signalizacije redoks občutljivih transkripcijskih faktorjev. Glavna funkcija Trx je posredovanje elektronov tiol odvisnim Prx pri odstranjevanju ROS in NOS (Lu in Holmgren, 2014). Do zdaj je bilo pri sesalcih identificiranih šest različnih Prx (PRDX1-6), ki so glede na lokacijo in prisotnost cisteinskih ostankov razdeljeni v tri razrede: PRDX1-4, izoforme 2-Cys; PRDX5, atipična izoforma 2-Cys; in PRDX6, izoforma 1-Cys (Rhee in sod., 2012). PRDX1 skupaj s Trx reducira perokside in ima posledično pomembno vlogo pri odstranjevanju metabolno nastalih peroksidov. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da PRDX1 deluje kot signalna peroksidaza, ki med drugim regulira aktivacijo poti ASK1/p38 MAPK (Jarvis in sod., 2012). Omenili smo, da je PRDX6 (št. lise 2937) edini predstavnik družine Prx, katerega katalitična funkcija ni odvisna od Trx, ampak od GSH (Fisher, 2011), njegova vsebnost pa je bila statistično značilno povečana v celicah pri višji vrednosti pCO₂.

Poleg encimov, vpletenih v dva glavna antioksidativna mehanizma, GSH in Trx, so bili identificirani še širje, za katere je znano, da imajo vlogo pri odzivu celice na oksidativni stres. Ti encimi so: mitohondrijska aldehid dehidrogenaza 2 (ALDH2, št. lise 1527), aldoza reduktazi podoben protein 2 (ALD2, št. lise 2400), protein DJ 1 (PARK7, št. lise 3188) in S-formilglutation hidrolaza (ESTD, št. lise 2418). Tudi vsebnost teh je bila statistično značilno povečana v celicah pri temperaturi gojenja 33 °C in višji vrednosti pCO₂, in sicer pri vseh treh celičnih linijah v povprečju od 1,19 (PARK7) do 1,63 (ALD2).

Aldehid dehidrogenaze so oksidoreduktaze, ki katalizirajo oksidacijo aldehidov. Reakcija je odvisna od prisotnosti NAD(P)⁺. Od NAD⁺ odvisna ALDH2 ima pomembno vlogo pri presnovi alkohola *in vivo*, saj katalizira pretvorbo acetaldehyda, ki nastane iz etanola, v acetat (Bosron in Li, 1986). Ugotovljeno je bilo, da ALDH2 sodeluje pri detoksifikaciji citotoksičnih produktov peroksidacije lipidov in posledično deluje kot zaščita pred oksidativno toksičnostjo. Pomanjkanje ALDH2 poveča občutljivost celic na oksidativne dejavnike oziroma oksidativni stres, kar dokazuje antioksidativno vlogo encima (Ohsawa in sod., 2003; Galbis-Estrada in sod., 2012).

ALD2 je kot ALDH2 oksidoreduktaza, katere katalitična aktivnost je odvisna od prisotnosti NADP⁺. Encim katalizira redukcijo glukoze v sorbitol, poleg tega pa reducira aldehyde, ki nastanejo pri peroksidaciji lipidov in nenasičene aldehyde konjugirane z GSH. Zaradi vpletenosti v zadnji dve reakciji je očitno, da ima encim ALD2 pomembno vlogo pri obrambi celice pred oksidativno toksičnostjo (Srivastava in sod., 1999).

Protein DJ 1 je bil zaradi svoje vloge pri Parkisonovi bolezni v zadnjih desetletjih dodobra raziskan. Protein je vpletен v vrsto celičnih procesov, med katerimi so celična transformacija, regulacija transkripcije, apoptoza in celična smrt, deluje pa tudi kot šaperon in ima pomembno vlogo pri odzivu celice na oksidativni stres (Junn in sod., 2005; Xu in sod., 2005). Njegovo delovanje, povezano z odzivom na oksidativni stres, je zelo raznovrstno in zajema naslednje celične poti: pozitivno regulacijo sinteze GSH (Zhou in Fred, 2005), odstranjevanje H₂O₂ (Mitsumoto in Nakagawa, 2001; Taira in sod., 2004) in regulacijo transkripcije encimov detoksifikacije (npr. GST) in antioksidantov preko faktorja 2, sorodnega eritroidnemu jedrnemu faktorju-2 (Nrf2). Nrf2 se namreč pri oksidativnem stresu odcepi od represorja Keap1 in se iz citoplazme prenese v jedro, kjer deluje kot transkripcijski aktivator. Veže se na zaporedje antioksidativno odzivnega faktorja (ARE) številnih transkripcijski faktorjev, kar rezultira v specifičnem profilu izražanja proteinov, ki so vpleteni v antioksidativne mehanizme (Itoh in sod., 1997; Gan in sod., 2010).

ESTD je GSH-odvisna serinska hidrolaza, homolog esteraze D, ki sodeluje pri detoksifikaciji formaldehida, saj deluje kot formaldehidna dehidrogenaza. Formaldehid se veže na GSH, nastane S-formil-GSH, kar ESTD s hidrolizo tiolnih estrov GSH pretvori v GSH in manj toksičen format (Lee in sod., 1986; Harms in sod., 1996). Nedavno je bilo potrjeno, da ima ESTD oksidacijsko občutljiv motiv (oksidacija cisteina), ki bi lahko vplival na aktivnost encima in posledično na potek antioksidativnega mehanizma. Že dolgo namreč predpostavlja, da ima oksidacija cistenov med oksidativnim stresom pomembno vlogo pri redoks signalizaciji (Legler in sod., 2012).

Poleg vseh naštetih in opisanih proteinov, ki neposredno ali posredno sodelujejo pri odzivu celice na oksidativne dejavnike in katerih vsebnost se je povečala pri zvišani oziroma višji vrednosti pCO₂, lahko omenimo tudi aneksin (ANXA1, št. lise 2356). Družina aneksinov predstavlja proteine, odvisne od kalcija, ki se vežejo na fosfolipide. Aneksini imajo precej raznovrstne vloge in so vpleteni v številne celične funkcije. Sodelujejo namreč pri inhibiciji fosfolipaze A₂ (metabolizem maščobnih kislin), celični adheziji, eksocitozi in interakciji s citoskeletnimi proteinimi. ANXA1 je vpletен v številne biološke procese, med katerimi so sprožitev apoptoze, aktivacija kaspaze-3, inhibicija celične rasti in delitve ter fagocitoza (Tabe in sod., 2007; Rhee in sod., 2000; Lim in Pervaiz, 2007). Poleg naštetega

je bilo ugotovljeno, da ANXA1 deluje kot stresni protein, katerega gen se pospešeno prepisuje kot odgovor na vročino, H₂O₂ in arzenit. Povečanje vsebnosti proteina kot odgovor na zvišano koncentracijo H₂O₂ posredno nakazuje na njegovo vlogo pri oksidativnem stresu (Rhee in sod., 2000).

Od vseh identificiranih proteinov, katerih vsebnost je bila pri temperaturi 33 °C v celicah statistično značilno povečana pri višji vrednosti pCO₂, je največ takih, ki so vpleteni v obrambo proti oksidativnim dejavnikom oziroma sodelujejo pri antioksidativnih mehanizmih. Od skupno 22 proteinov jih namreč kar 12 (vključno z ANXA1) tako ali drugače sodeluje pri celičnem antioksidativnem odzivu. Navedeno dejstvo nakazuje, da je bilo pri temperaturi gojenja celic 33 °C pri višji vrednosti pCO₂ (20 %) redoks okolje spremenjeno oziroma se je koncentracija ROS v celicah zvišala. Na podlagi tega lahko sklepamo, da so bile celice pri navedenih pogojih izpostavljene oksidativnim dejavnikom in oksidativnemu stresu. Najverjetnejša razloga za povečanje oksidativnih dejavnikov in posledičnega oksidativnega stresa, ki je bil zaznan pri omenjenih manj ugodnih pogojih kultivacije, je nizek intracelularni pH, ki je rezultat namerno zvišane vrednosti pCO₂ v kulturi in hkrati večje topnosti pCO₂ pri nižjih temperaturah, in hiperoksija, do katere prav tako lahko pride zaradi večje topnosti kisika pri nižjih temperaturah. Nizek intracelularni pH spremeni metabolizem glukoze in aktivnost dihalne verige, kar vodi v tvorbo dodatnih ROS (Kimura and Miller, 1996; Riemann, 2013), prav tako pa se nastanek ROS v mitohondriih poveča zaradi hiperoksije, ki vpliva na komponente elektronskega transporta, celotno dihalno verigo in glikolizni in mitohondriski metabolizem (Kumuda 2013). Kapaciteta zaščite celic pred oksidativnimi dejavniki in njihovimi posledicami med tridnevno izpostavljenostjo celic nižji temperaturi in višji vrednosti pCO₂ očitno ni bila presežena, saj je bila viabilnost celic v tem časovnem okvirju ohranjena. V nasprotnem primeru bi posledice oksidativnih dejavnikov in oksidativnega stresa vodile v celično apoptozo ali smrt, kar bi zasledili kot upad viabilnosti celic. Hkrati je treba poudariti, da na podlagi meritev, ki smo jih izvajali v študiji, ne moremo izključiti morebitne predapoptotične faze celic.

5.1.3.2 Glikoliza in PFP

Z masno spektrometrijo smo identificirali šest od 10 encimov, ki so vpleteni v glikolizo: fruktoza-bisfosfat aldolaza A (ALDOA, št. lise 2206), triozafosfat izomeraza (TPIS, št. lise 2783), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH; G3P, št. lise 2443), fosfoglicerat-kinaza 1 (PGK1, št. lise 1950), fosfoglicerat mutaza 1 (PGAM1, št. lis 2855 in 4038) in alfa enolaza (ENO1, št. lise 1796). Poleg omenjenih encimov glikolize je bila z masno spektrometrijo identificirana tudi veriga A L-laktat dehidrogenaze (LDHA, št. lise 2568).

L-laktat dehidrogenaza je glavni akter tako imenovane anaerobne glikolize, torej pretvorbe končnega produkta glikolize, piruvata, v laktat.

Vsebnost encimov PGK1, ENOA in LDH je bila statistično značilno povečana v celicah kultur, gojenih pri nižji temperaturi in višji vrednosti pCO_2 . Sprememba v vsebnosti preostalih štirih encimov, GAPDH, ALDOA, TPIS in PGAM1, ni bila statistično značilna, zato pri teh lahko govorimo le o trendu njihovega povečanja v celicah. V primeru encima GAPDH je bil pri zvišani vrednosti pCO_2 opazen trend povečanja njegove vsebnosti v obeh celičnih linijah, ki producirata mAb, in trend zmanjšanja pri starševski celični liniji CHO-Der3 (posledično je bil povprečni faktor razlike za vse tri celične linije 1, preglednica 6). V primerih encimov ALDOA, TPIS in PGAM1 je bil pri vseh treh celičnih linijah pri zvišani vrednosti pCO_2 opazen trend povečanja njihove vsebnosti (pri vseh treh celičnih linijah v povprečju od 1,05 do 1,16). Vsi omenjeni encimi glikolize, razen encima ALDOA, so vpleteni v drugo fazo glikolize, v kateri se gliceraldehid-3-fosfat, produkt prve faze glikolize, končno pretvori v piruvat, encim LDH pa je vpletен в tako imenovano anaerobno glikolizo in pretvorbo piruvata v laktat.

Na podlagi statistično značilnega 1,12- in 1,17-kratnega povečanja vsebnosti obeh encimov druge faze glikolize (PGK1 in ENOA) lahko sklepamo o njeni povečani aktivnosti in posledično povečani tvorbi piruvata v celicah. Piruvat, produkt druge faze glikolize, se nadalje s pomočjo piruvat dehidrogenaznega kompleksa pretvori v acetil-CoA in kot tak vstopi v cikel TCA (aerobna glikoliza), ali pa se s pomočjo laktat dehidrogenaze pretvori v laktat (anaerobna glikoliza). Statistično značilno 1,37-kratna povečana vsebnost encima anaerobne glikolize LDH (LDHA) nakazuje na povečano anaerobno metabolno pot. Rezultati torej kažejo, da se v celicah kultur, gojenih pri temperaturi 33 °C, pri višji vrednosti pCO_2 tvori več piruvata in laktata kot pri nižji vrednosti pCO_2 .

Na podlagi statistično značilno povečane vsebnosti encimov druge faze glikolize in posledične predpostavke o povečani aktivnosti omenjene faze lahko sklepamo tudi o večji količini gliceraldehid-3-fosfata, ki je potreben za potek druge faze glikolize. Gliceraldehid-3-fosfata je produkt prve faze glikolize, o kateri na podlagi proteomskih rezultatov ne moremo sklepati, da je njena aktivnost povečana, saj večina encimov iz omenjene faze ni bila identificirana. Identificiran je bil le encim ALDOA, katerega vsebnost pa ni bila statistično značilno povečana, ampak lahko govorimo le o trendu rahlega povečanja (pri vseh treh celičnih linijah povprečno 1,05-kratno). Povečano količino gliceraldehid-3-fosfata, ki vstopa v drugo fazo glikolize, bolj verjetno nakazuje statistično značilno 1,48-kratno povečanje vsebnosti encima transketolaza (TKT; št. lise 1200), saj lahko na tej podlagi predvidevamo večjo aktivnost cikla PFP. V drugo fazo glikolize namreč poleg

gliceraldehid-3-fosfata, ki je produkt prve faze glikolize, vstopa tudi gliceraldehid-3-fosfat, ki predstavlja produkt PFP.

Poleg že omenjene predvidene posledice statistično značilne povečane vsebnosti encima TKT, torej povečane aktivnosti cikla PFP in posledično povečane količine njegovega produkta, gliceraldehid-3-fosfata, lahko na podlagi povečanja vsebnosti encima TKT sklepamo tudi o povečani količini njegovega substrata riboze-5-fosfat. Ta nastane iz glukoze-6-fosfat s pomočjo encimov G6PD in 6PGD. Predpostavljena povečana aktivnost encimov G6PD in 6PGD nakazuje povečano tvorbo NADPH, katerega oksidacija v NADP^+ je potrebna za redukcijo GSSH v GSH. Povečan nastanek NADPH (predpostavljeno z G6PD in 6PGD ter IDH, katerega vsebnost je bila statistično značilno povečana, vloga pa opisana v poglavju 5.1.3.1) nakazuje povečane potrebe celic po tem reduktijskem ekvivalentu, ki je med drugim nujen pri antioksidativnem mehanizmu GSH in lahko posredno nakazuje povečano aktivnost omenjenega mehanizma.

Znano je, da se pri hitro rastочih celicah, ki porabijo velike količine glukoze, večino te, kljub aerobnim pogojem, pretvori v laktat (Waburgov efekt aerobne glikolize). Glede na literaturo lahko predpostavimo (Warburg, 1956; Zagari, 2012), da anaerobna glikoliza poteka preferenčno tudi v primeru obravnavanih treh celičnih linij CHO. Glede na rezultate je razvidno, da je v celicah kultur, gojenih pri $33\text{ }^\circ\text{C}$ pri zvišani vrednosti pCO_2 , anaerobna glikoliza še povečana, kar lahko razložimo na podlagi povečane aktivnosti cikla PFP in druge faze glikolize. V primeru povečane tvorbe piruvata, produkta druge faze glikolize, je lahko namreč kapaciteta cikla TCA presežena, zato presežek piruvata vstopi v anaerobno glikolizo in se pretvori v laktat (DeBerardinis in sod., 2008; Zagari, 2012). Druga mogoča razlaga pa je povečana aktivnost aerobne glikolize kot odgovor celice na oksidativne spremembe v celici. Povečana sinteza laktata je namreč predpostavljen mehanizem obrambe celic pred oksidativnimi dejavniki oziroma odziva celic pri oksidativnem stresu, saj se s preusmeritvijo piruvata v anaerobno metabolno pot zmanjša aktivnost mitohondrijskih metabolnih procesov, kar pomeni tudi zmanjšanje aktivnosti oksidativne fosforilacije, ki je glavni celični generator ROS (Brand, 1997; Ralph in sod., 2010). V tem primeru bi bila aktivnost cikla TCA verjetno zmanjšana, za kar pa v našem primeru nimamo podatkov, saj nismo identificirali nobenega od encimov cikla TCA.

Rezultati nakazujejo, da se je bil v celicah pri $33\text{ }^\circ\text{C}$ pri zvišani vrednosti pCO_2 spremenjen metabolism celic, in sicer se je to manifestiralo kot povečanje aktivnosti cikla PFP, druge faze glikolize in anaerobne glikolize. Aktivnost cikla PFP se poveča v primeru povečanih potreb celice po reduktijskem ekvivalentu NADPH (Stryer, 1997), ki sodeluje pri reduktivni biosintezi in tudi pri antioksidativnem mehanizmu GSH, kar je bilo z rezultati tudi potrjeno, saj je bila zaznana povečana vsebnost proteinov oziroma encimov cikla PFP

(TKT) in več reduktivnih biosintežnih poti – metabolni proces maščobnih kislin (ANXA1), metabolni proces lipidov (ACBP), sinteza purinov (PUR9 in NDKA) in redukcija GSH (GSH0, IDHC1, GSTA1, GSTP1, GLRX3, PRDX6). Zaradi pospešene tvorbe gliceraldehid-3-fosfata pri ciklu PFP se je povečala tudi aktivnost druge faze glikolize (povečana vsebnost encimov PGK1 in ENOA), posledica česar je bil po vsej verjetnosti nastanek večjih količin produkta glikolize, piruvata. Ta se nato pospešeno pretvarja v laktat s procesom anaerobne glikolize, aktivnost katere je glede na rezultate prav tako povečana (LDH). Omenjeno potrjujejo tudi rezultati analize metabolne aktivnosti celic, kjer je bilo opaženo, da je bila specifična produkcija laktata glede na specifično porabo glukoze pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 povečana. Najverjetnejši vzrok za to je odgovor celice na oksidativne dejavnike, saj celica na tak način zmanjšuje aktivnosti mitohondrijskih metabolnih poti in posledično tudi produkcijo ROS (Brand, 1997; Ralph in sod., 2010). Znano je namreč, da se pri celicah CHO pri hiperoksičnih pogojih povečata tako poraba glukoze in tvorba laktata, s čimer se kompenzira motena oksidativna fosforilacija (Schoonen in sod., 1990). Znano je tudi, da nizek intracelularni pH spremeni metabolizem glukoze in aktivnost dihalne verige, kar vodi v tvorbo dodatnih ROS (Kimura and Miller, 1996; Riemann, 2013). Povečana aktivnosti cikla PFP, reduktivnih biosintežnih poti in anaerobne glikolize podpira predpostavko, da so bile celice pri 33 °C in zvišani vrednosti pCO_2 (20 %) izpostavljeni oksidativnemu stresu.

5.1.3.3 Drugi proteini

Poleg opisanih proteinov, ki so del katerega od metabolnih procesov ali obrambe celice na oksidativni stres, smo z masno spektrometrijo identificirali še dva, ki nista neposredno povezana z omenjenimi celičnimi procesi, vendar pa je bila njuna vsebnost pri temperaturi gojenja celic 33 °C v celicah statistično značilno spremenjena pri zvišani vrednosti pCO_2 . To sta proteina FUBP1 (št. lise 979) in PSA4 (št. lise 2721).

Edini protein, katerega vsebnost je bila statistično značilno zmanjšana pri višji vrednosti pCO_2 , je FUBP1 (št. lise 979). To je jedrni protein, ki se v apoptočnih celicah traslocira iz jedra v citoplazmo in tam akumulira. V jedru FUBP1 pozitivno regulira traskripcijo promotorja RNK-polimeraze II in regulira tudi izražanje MYC. Izražanje MYC regulira z vezavo na enojno viačnico daljnega zgornjega elementa promotorja MYC in lahko deluje kot aktivator ali represor traskripcije (Q91WJ8; UniProt, 2014). Promotor MYC kontrolira izražanje kar 10 % celičnih genov, med katerimi so tudi taki, ki so ključni za celično delitev, diferenciacijo in apoptozo. V rakavih celicah je promotor MYC pogosto mutiran, kar vodi v deregulacijo številnih genov (Zhang in Chen, 2013).

Protein FUBP1 je povezan tudi z odgovorom celice na oksidativni stres. Mreži kaskadnega delovanja c-myc in p53 nadzirata proliferacijo, diferenciacijo in apoptozo celice. Eden izmed stabilizatorjev p53 je tudi sintetazni kompleks multi-aminoacil-t-RNK, s strukturno podenoto JTV1/AIMP2. V primeru oksidativnega stresa JTV1 disocira iz kompleksa in se traslocira iz citoplazme v jedro, tam pa poveže s proteinom FUBP1. Povezava JTV1 in FUBP1 aktivira USP29, ki regulira izražanje c-myc in p21, ter nivo proteinov p53 (Liu in sod., 2011). Glede na to, da je vsebnost proteina FUBP1 statistično značilno zmanjšana v celicah kultur, gojenih pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 , omenjeni mehanizem v našem primeru verjetno ni bil pospešen. Vendar je treba omeniti še eno možnost, in sicer, da je zaznano zmanjšanje njegove vsebnosti posledica pospešene razgradnje proteina in da zaznana spremembra ni realni odraz njegove prisotnosti v celicah. FUBP1 se namreč v apoptotičnih celicah traslocira iz jedra v citoplazmo in tam veže z JTV1 in p38, kar povzroči ubikvitinacijo FUBP1 in posledično njegovo proteasomsko razgradnjo (Zhang in Chen, 2013). Dejstvo, da je bila vsebnost FUBP1 statistično značilno zmanjšana in da je bila hkrati vsebnost proteina PSA4, ki predstavlja del proteasoma, statistično značilno povečana, lahko nakazuje, da je bil pri pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 povečan apoptozni ali vsaj predapoptotzni celični proces, zaradi česar se je v končni fazi povečala razgradnja proteina FUBP1. Čeprav v treh dneh gojenja celic pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 nismo opazili znižane viabilnosti celic, kar nakazuje na nespremenjeno apoptozno stanje, so bile celice lahko v zgodnjih fazah apoptoze, česar z določanjem viabilnosti ni mogoče zaznati.

Ker je protein FUBP1 preko regulacije transkripcije vpletен v številne celične procese, njegove vloge v celicah kultur, gojenih pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 , ni mogoče natančno predpostaviti.

Vsebnost proteina PSA4 je bila v celicah kultur, gojenih pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 , statistično značilno povečana. PSA4 je multikatalitični proteinazni kompleks s široko specifičnostjo in predstavlja del 20S podenote proteasoma. Proteasom 26S ima ATP-odvisno proteolitično aktivnost in je sestavljen iz glavne podenote 20S in dveh regulatornih podenot 19S. Proteasomi so del sistema ubikvitin-proteasom (UPS), ki je pomemben regulatorni sistem, ki nadzira ustreznost proteinov v celici. UPS ima s tega vidika tudi pomembno vlogo pri obrambi proti oksidativnem stresu, poleg tega pa je proteasom 26S občutljiv na reodoks okolje v celici, saj je bilo opaženo, da je bila zaradi oksidativnega okolja ATPazna aktivnost zmanjšana, kar je posledično vplivalo na delovanje proteasoma 26S (Ishii in sod., 2005). Zmanjšana aktivnost proteasoma vpliva na razmerje oksidiranih proteinov, ubikvitinacije in degradacije proteinov v celici (Ishii in sod., 2005; Farout in sod., 2005). Čeprav je bil PSA4 statistično značilno bolj izražen v celicah kultur, gojenih pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 , ni mogoče

zanesljivo trditi, da je bila posledično povečana tudi razgradnja proteinov, saj so bili lahko proteasomi pri spremenjenih oksidativnih pogojih gojenja, torej pri 33 °C in 20 % pCO₂, manj aktivni ali celo neaktivni.

5.1.3.4 Relativna vsebnost rekombinantnega mAb v celici pri 33 °C in zvišani vrednosti pCO₂

Podobno kot pri 37 °C tudi pri 33 °C relativni povprečni volumen signala pri treh proteinskih lisah, ki predstavljajo HC- in LCrekombinantnega mAb (št. lis 1609, 3046 in 4036; preglednica 6), ni bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂. Zvišana vrednosti pCO₂ v kulturi (20 %) pri temperaturi gojenja 33 °C torej ni značilno vplivala na relativno vsebnost rekombinantnega mAb v celici.

5.1.3.5 Povzetek odziva celic na zvišano vrednost pCO₂ pri 33 °C

Od vseh identificiranih proteinov, katerih vsebnost je bila statistično značilno povečana v celicah kultur, gojenih pri nižji temperaturi (33 °C) in zvišani vrednosti pCO₂ (20 %) v primerjavi z nižjo vrednostjo pCO₂ pri isti temperaturi, je največ takih, ki so del odgovora celice pri oksidativnem stresu in torej vpleteni v obrambo proti oksidativnim dejavnikom oziroma sodelujejo pri antioksidativnih mehanizmih. Od skupno 22 jih namreč kar 12 (GSH0, GSTA1, GSTP1, IDHC, GLRX3, PRDX1, PRDX6, PARK7, ESTD, ALD2, ALDH2, ANXA1) tako ali drugače sodeluje pri antioksidativnem odzivu. Glede na omenjeno dejstvo lahko sklepamo, da so bile celice pri temperaturi 33 °C in vrednosti pCO₂ 20 % izpostavljeni oksidativnemu stresu, ki je posledica spremenjenega redoks okolja in zvišane koncentracije ROS v celicah. Antioksidativna zaščita celice je bila v tem času uspešna, saj je bila njihova viabilnost ohranjena. Lahko torej rečemo, da antioksidativna kapaciteta celic ni bila presežena, saj bi v nasprotnem primeru posledice oksidativnega stresa vodile v celično apoptozo ali smrt, kar bi zasledili kot upad viabilnosti celic.

Z metabolnega vidika se je pri 33 °C odziv celic na zvišano vrednost pCO₂ manifestiral v povečani aktivnosti cikla PFP, druge faze glikolize in anaerobne glikolize. Aktivnost cikla PFP se poveča v primeru povečanih potreb celice po redukcijskem ekvivalentu NADPH, ki sodeluje pri reduktivni biosintezi in tudi pri antioksidativnem mehanizmu GSH, kar je bilo z rezultati tudi potrjeno, saj je bila zaznana povečana vsebnost proteinov oziroma encimov cikla PFP (TKT) in več reduktivnih biosintežnih poti – metabolni proces maščobnih kislin (ANXA1), metabolni proces lipidov (ACBP), sinteza purinov (PUR9 in NDKA) in redukcija GSH (GSH0, IDHC1, GSTA1, GSTP1, GLRX3, PRDX6). Povečana aktivnost

druge faze glikolize (povečana vsebnost encimov PGK1 in ENOA) je najverjetneje posledica pospešene tvorbe gliceraldehid-3-fosfata pri ciklu PFP. Posledica obojega je nastanek večjih količin produkta glikolize, piruvata, zato se nato pospešeno pretvarja v laktat preko procesa anaerobne glikolize, aktivnost katere je glede na rezultate (povečana vsebnost LDHA) prav tako povečana. Omenjeno potrjujejo tudi rezultati analize metabolne aktivnosti celic, kjer je bilo opaženo, da je bila specifična produkcija laktata glede na specifično porabo glukoze pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO_2 povečana. Najverjetnejši vzrok za to je odgovor celice na oksidativne dejavnike, saj celica na tak način zmanjšuje aktivnosti mitohondrijskih metabolnih poti in posledično tudi produkcijo ROS. Povečana aktivnosti cikla PFP, reduktivnih biosintežnih poti in anaerobne glikolize podpira predpostavko, da so bile celice pri 33 °C in zvišani vrednosti pCO_2 (20 %) izpostavljeni oksidativnemu stresu. Čeprav so bile celice obremenjene z oksidativnim stresom, se relativna vsebnost rekombinantnega mAb v celici pri višji vrednosti pCO_2 v kulturi ni spremenila.

5.1.4 Splošna primerjava odziva celic vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO_2

V namen splošnega pregleda podobnosti oziroma različnosti med obravnavanimi eksperimentalnimi skupinami smo na podlagi primerjave vseh določili 504 v relativnem povprečnem volumnu signala statistično značilno različne proteinske lise glede na temperaturo gojenja, 240 glede na vrednost pCO_2 , ter 17 glede na povezani vpliv obeh parametrov. Z masno spektrometrijo smo identificirali 14 proteinov, katerih vsebnost je bila statistično značilno različna glede na temperaturo gojenja (preglednica 7), 4 proteine glede na vrednost pCO_2 (preglednica 8) ter 4 glede na povezan vpliv obeh proučevanih parametrov (preglednica 9).

Glede na število v relativnem povprečnem volumnu signala statistično značilno različnih proteinskih lis glede na posamezni parameter lahko trdimo, da ima temperatura gojenja večji vpliv na celice oziroma na njihov proteomski odziv kot vrednost pCO_2 v kulturi.

5.1.4.1 Primerjava odziva celic glede na temperaturo gojenja

Identificirane proteine, katerih vsebnost je bila pri primerjavi vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin statistično značilno različna glede na temperaturo gojenja, lahko razdelimo v naslednje kategorije:

- i. Stresni proteini oziroma šaperoni (HSP7C, GRP78, HS90B ter njegov aktivator AHSA1 in ENPL).
- ii. Protein, vpleteni v glikolizo (LDHA).
- iii. Proteina, vpletena v antioksidativno obrambo (ALDH2 in PRDX1).
- iv. Proteina, vpletena v metabolizem maščobnih kislin (ANXA1, THIC).
- v. Strukturni oziroma citoskeletalni protein (VIME).
- vi. Protein, vpletten v sintezo lipidov (HMCS1).
- vii. Protein, vpletten v celično delitev (NUDC).
- viii. Protein, vpletten v razgradnjo proteinov (CYBP).

Proteini, katerih vsebnost se je statistično značilno spremenila tudi pri primerjavah šestih eksperimentalnih skupin pri dveh temperaturah gojenja glede na vrednost pCO₂, so GRP78, ALDH2, ANXA1, LDHA in PRDX1.

Vsebnost proteina GRP78 (preglednica 7, št. lise 1120) je bila statistično značilno spremenjena tako glede na temperaturo gojenja pri primerjavi vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin kot glede na vrednost pCO₂ pri primerjavi šestih eksperimentalnih skupin celičnih kultur, gojenih pri 37 °C. Njegova vsebnost je bila v celicah večja pri temperaturi gojenja 33 °C (1,73-krat), medtem ko se njegova vsebnost pri isti temperaturi glede na spremembo pCO₂ ni statistično značilno spremenila, pri 37 °C pa se je pri zvišani vrednosti pCO₂ povečala (1,21-krat).

Vsebnost štirih proteinov, in sicer ALDH2 (št. lise 1527), ANXA1 (št. lise 2356), LDHA (št. lise 2568) in PRDX1 (št. lise 3215), je bila statistično značilno povečana pri temperaturi gojenja 33 °C pri primerjavi vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin (preglednica 7) in tudi pri zvišani vrednosti pCO₂ pri primerjavi šestih eksperimentalnih skupin celičnih kultur, gojenih pri 33 °C (preglednica 6). Trije od navedenih proteinov imajo specifično vlogo pri antioksidativni obrambi celice (ALDH2, ANXA1 in PRDX1), eden pa je del anaerobne glikolize (LDHA) ter ima preko preusmeritve piruvata iz aerobne v anaerobno glikolizno pot prav tako antioksidativno vlogo (poglavlje 5.1.3). Rezultati potrjujejo, da je bila pri nižji temperaturi gojenja povečana aktivnost antioksidativnih mehanizmov in anaerobne poti metabolizma glukoze, kar potrjuje rezultate statistične obdelave glede na vrednost pCO₂ (poglavlji 5.1.2 in 5.1.3), ter tudi dejstvo, da so celice pri nižji temperaturi gojenja proizvedle več laktata glede na porabljeno glukozo (poglavlje 5.1.1.2).

5.1.4.2 Primerjava odziva celic glede na zvišano vrednost pCO₂

Trije od štirih identificiranih proteinov, katerih vsebnost je bila statistično značilno povečana glede na vrednost pCO₂ pri primerjavi vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin (preglednica 8), sodelujejo pri antioksidativni obrambi celice (GSTP1, št. lise 3143; PRDX1 št. lise 3215; in ALD2 št. lise 2400), eden pa je del cikla PFP (TKT, št. lise 1200). Vsebnost vseh omenjenih proteinov je bila statistično značilno povečana tudi pri višji vrednosti pCO₂ pri primerjavi šestih eksperimentalnih skupin pri temperaturi gojenja 33 °C (preglednica 8).

5.1.4.3 Primerjava odziva celic glede na povezani vpliv temperature gojenja in vrednosti pCO₂ (interakcija)

Pet proteinskih lis, katerih volumen signala je bil statistično značilno odvisen od obeh proučevanih parametrov hkrati, T in pCO₂ (interakcija obeh parametrov, preglednica 9), predstavlja štiri individualne proteine, ki sodelujejo pri antioksidativni obrambi celice (GSTA1, št. lise 2909; GSTP1, št. lis 3143 in 3146; ESTD, št. lise 2418; in ALD2, št. lise 2400). Vsebnost vseh štirih proteinov je bila statistično značilno povečana tudi pri zvišani vrednosti pCO₂ pri temperaturi gojenja 33 °C (preglednica 9).

5.1.4.4 Povzetek odziva celic vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja in vrednost pCO₂

Splošna primerjava odziva celic vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin glede na vrednost pCO₂ potrjuje rezultate primerjave šestih eksperimentalnih skupin pri dveh različnih temperaturah gojenja glede na vrednost pCO₂, saj so bili glede na vrednost pCO₂ statistično značilno spremenjeni proteini, ki sodelujejo pri antioksidativni obrambi celice. Dodatno je bila s splošno primerjavo odziva celic vseh dvanajstih eksperimentalnih skupin glede na temperaturo gojenja potrjena zvišana vsebnost LDH pri nižji temperaturi gojenja, kar sovpada z rezultati analize metabolne aktivnosti, kjer je bila pri nižji temperaturi gojenja specifična produkcija laktata glede na specifično porabo glukoze večja.

5.2 SKLEPI

Znižana temperatura gojenja je pri vseh treh celičnih linijah, starševska celična linija CHO-Der3, celična linija mAb CHO-Der3 in celična linija mAb CHO-Der3-MTX, rezultirala v nižji maksimalni koncentraciji živih celic, vpliv vrednosti pCO₂ na hitrost rasti populacije celic pa se je razlikoval glede na temperaturo gojenja celic. Višja vrednost pCO₂ v kulturah, gojenih pri temperaturi 37 °C, namreč ni bistveno vplivala na rast populacije celic, medtem ko se je pri temperaturi 33 °C pri višji vrednosti pCO₂ maksimalna koncentracija živih celic znižala. Vpliv vrednosti pCO₂ na rast celic se je torej razlikoval glede na temperaturo gojenja celic, kar je verjetno posledica večje topnosti CO₂ pri nižji temperaturi in nižjega intracelularnega pH, ki preko vpliva na celične organele negativno vpliva na celično delitev. Temperatura in vrednost pCO₂ v treh dneh kultivacije nista vplivali na viabilnost celic, saj je ta pri vseh testiranih pogojih ostala konstantno visoka.

Pri temperaturi 33 °C je bil v primerjavi z gojenjem pri 37 °C celični metabolizem pričakovano upočasnjeno, saj se pri nižjih temperaturah viabilnost in energijsko stanje celic običajno ohranjata, metabolizem pa se posledično upočasni. Čeprav vrednost pCO₂ v okviru tridnevnega gojenja pri 37 °C ni vplivala na hitrost rasti populacije celic, je bila metabolna aktivnost celic z vidika porabe glukoze in glutamina ter produkcije laktata pri vseh treh celičnih linijah pri zvišani vrednosti pCO₂ zmanjšana. Pri temperaturi 33 °C sta profila matabolnih aktivnosti (pri nižji in višji vrednosti pCO₂) pri vseh treh celičnih linijah sovpadala z rastnimi profili, saj je bila pri nižji koncentraciji živih celic, ki je bila zaznana pri višji vrednosti pCO₂, opazna tudi zmanjšana metabolna aktivnost. Zmanjšana metabolna aktivnost pri višji vrednosti pCO₂ je lahko posledica inhibicije matabolnih poti zaradi nižje vrednosti intracelularnega pH. Primerjava specifičnih vrednosti porabe substratov in produkcije metabolita je pokazala, da na metabolizem v pomenu večje produkcije laktata glede na količino porabljeni glukoze vplivata temperatura in vrednost pCO₂. Izrazitejša povečana specifična produkcija laktata glede na specifično porabo glukoze pri višji vrednosti pCO₂ in nižji temperaturi je po vsej verjetnosti posledica kombiniranega vpliva znižane vrednosti intracelularnega pH pri višji vrednosti pCO₂ in povečane topnosti kisika in ogljikovega dioksida pri nižji temperaturi ter posledičnega kislega in oksidativnega okolja. Tovrstno okolje negativno vpliva na metabolno aktivnost celic in metabolizem glukoze, produkcija ROS v mitohondrijih se poveča, celice pa so po vsej verjetnosti s preusmeritvijo pretvorbe piruvata v laktat regulirale moteno oksidativno stanje.

Primerjava proteomskega odziva obravnavanih treh celičnih linij glede na različno vrednost pCO₂ pri posamezni temperaturi je pokazala, da so celice glede na število statistično značilno različnih proteinskih lis pri nižji temperaturi bolj občutljive za zvišano

vrednost pCO₂ kot pri višji temperaturi. Število proteinskih lis, katerih relativni povprečni volumen signala je bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 37 °C je bilo namreč 17, medtem ko je bilo takih proteinskih lis pri temperaturi gojenja 33 °C kar 329. Od skupno 77 individualnih proteinov, identificiranih v 83 proteinskih lisah, je bil identificiran le eden, ki je bil statistično značilno spremenjen glede na vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 37 °C, in 22, ki so bil statistično značilno spremenjeni glede na vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 33 °C.

Pri temperaturi gojenja 37 °C je bil identificiran le en protein, stresni protein, ki se je v celicah statistično značilno povečal pri višji vrednosti pCO₂. Iz le enega identificiranega proteina težko sklepamo na splošen odziv celic na zvišano vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 37 °C. Iz rezultatov je tudi razvidno, da zvišana vrednost pCO₂ ni vplivala na relativno vsebnost rekombinantnega proteina v celici.

Od 22 proteinov, ki so bili statistično značilno spremenjeni glede na vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 33 °C, jih kar 12 sodeluje pri antioksidativni obrambi celic oziroma pri oksidativnemu stresu. Vseh 12 proteinov je bilo v celicah pri višji vrednosti pCO₂ statistično značilno povečanih, kar pomeni, da je bil mehanizem antioksidativne obrambe pospešen in so bile celice pri temperaturi 33 °C in vrednosti pCO₂ 20 % izpostavljene oksidativnemu stresu. Kapaciteta zaščite celic pred oksidativnimi dejavniki in njihovimi posledicami med tridnevno izpostavljenostjo celic nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO₂ očitno ni bila presežena, saj je bila viabilnost celic v tem času ohranjena. V nasprotnem primeru bi posledice oksidativnega stresa vodile v celično apoptozo ali smrt, kar bi zasledili kot upad viabilnosti celic.

Z metabolnega vidika se je odziv celic, gojenih pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO₂, manifestiral v povečani aktivnosti cikla PFP, druge faze glikolize in anaerobne glikolize, kar kaže na povečano potrebo celic po redukcijskem ekvivalentu NADPH. Rezultati namreč preko povečane vsebnosti sodelujočih encimov nakazujejo pospešen cikel PFP, pri katerem NADPH (pospešeno) nastaja, in pospešitev reduktivnih biosinteznih poti, kot so metabolni proces maščobnih kislin, metabolni proces lipidov, sinteza purinov in redukcija GSH, ki je ključni del antioksidativnega mehanizma GSH, ki za svoj potek NADPH porablja. Povečana aktivnost glikolize in anaerobne glikolize je lahko povezana s presežkom produkta glikolize in posledično preseženo kapaciteto cikla TCA, ali pa je posledica odgovora na oksidativni stres, s čimer celica zmanjšuje aktivnost mitohondrijskih metabolnih poti, s tem pa zmanjša produkcijo ROS. Oboje, povečana aktivnosti cikla PFP in povečana aktivnost predvsem anaerobne glikolize, podpira predpostavko, da so bile celice pri nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO₂ izpostavljene oksidativnemu stresu.

Čeprav so bile celice obremenjene z oksidativnim stresom, se relativna vsebnost rekombinantnega mAb v celici pri višji vrednosti pCO₂ v kulturi ni spremenila.

Ugotovili smo, da oba proučevana fizikalna parametra, znižana temperatura in zvišana vrednost pCO₂, negativno vplivata na hitrost rasti populacije in metabolno aktivnost celic CHO, kljub temu pa njihova viabilnost ni bila znižana. Izkazalo se je, da so celice CHO pri 33 °C bolj občutljive za zvišanje vrednosti pCO₂ v kulturi kot pri 37 °C in da so pri omenjenih neoptimalnih pogojih izpostavljene oksidativnemu stresu, ki je posledica zvišane koncentracije ROS oziroma spremenjenega redoks okolja. Koncentriranje ROS v celici je verjetno posledica seštevka vpliva dejavnikov spremenjenega okolja, torej povečane topnosti kisika pri nižji temperaturi, znižane vrednosti intracelularnega pH pri višji vrednosti pCO₂ in povečanih energijskih potreb za vzdrževanje celice in sintezo rekombinantnega produkta, saj njegova relativna vsebnost kljub neugodnim pogojem gojenja ni bila zmanjšana.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Celice CHO se za produkcijo rekombinantnih proteinov uporablajo že desetletja. Na podlagi zgodovine že lansiranih, regulatorno odobrenih, varnih in kakovostnih produktov ter dobre produkcijske učinkovitosti so najpogosteje uporabljen produksijski sistem. Kljub dolgoletni uporabi celic CHO so bili njihovi celični mehanizmi dolgo slabo raziskani in razumljeni. Poznavanje temeljnih bioloških mehanizmov celic CHO v industrijskih celičnih kulturah je bistveno za izboljšanje stanovitnosti procesov in kakovosti produktov. Zadnja leta je uporaba omičnih pristopov in sistemski biologije omogočila globlji vpogled v celično fiziologijo in produkcijo rekombinantnih proteinov celic CHO.

V zadnjih letih je bila opažena pozitivna korelacija med gojenjem sesalskih celičnih linij pri nižjih temperaturah in zvišano produktivnostjo rekombinantnega proteina, zato celične linije CHO čedalje pogosteje gojijo pri subfizioloških temperaturnih pogojih. Ugoden učinek znižane temperature gojenja celic povezujejo z ohranjanjem viabilnosti celic v daljšem časovnem obdobju, z znižanjem akumulacije zaviralnih stranskih produktov metabolizma celic, zadrževanjem celic v fazi G1 celičnega cikla, zakasnitev apoptoze, upočasnjeno metabolno aktivnostjo in upočasnjeno rastjo populacije celic ter posledično zvišano specifično produktivnostjo celic. Nižje temperature gojenja so nujno povezane z večjo topnostjo plinov v kulturi, zato so posledice prvega na odziv celic navadno seštevek obeh dejavnikov.

Znižana temperatura gojenja in podaljšano ohranjanje celične kulture v reguliranih bioreaktorskih sistemih sovpadata z zvišano koncentracijo producirajočih celic, povečano topnostjo plinov v kulturah in posledično akumulacijo CO₂. CO₂ predstavlja odpadni produkt celičnega metabolizma, pogosto pa se uporablja za regulacijo vrednosti pH v kulturi industrijskih procesov. Odstranjevanje akumuliranega CO₂ postane še posebno zahtevno v velikih industrijskih bioprosesih, ki potekajo v velikih volumnih in pri visokih koncentracijah celic, zato je zvišana vrednost pCO₂ pogost bioprosesni pojav. Zvišana vrednost pCO₂ vpliva na številne celične procese, med drugim tudi na metabolizem in celično rast, kar pa je glede na literaturo posledica znižane vrednosti pH v kulturi, predvsem pa v celicah in celičnih organelih.

Namen našega dela je bil na proteomskem nivoju proučiti odziv celic na zvišano koncentracijo raztopljenega CO₂ pri fiziološki in znižani temperaturi gojenja. Uporabili smo tri celične linije CHO, ki so bile izpostavljene različnim predhodnim manipulacijam, in sicer izhodiščno ali starševsko celično linijo (starševska CHO-Der3), celično linijo z

vstavljenim genom za želeni rekombinantni protein (mAb CHO-*Der3*) in celično linijo z vstavljenim genom za želeni rekombinantni protein, adaptirano na gojišče z dodanim metotreksatom (mAb CHO-*Der3*-MTX).

Celice smo nekaj pasaž gojili pri običajnih pogojih gojenja (37°C , 10 % pCO₂), da bi si opomogle od odtalitve in dosegle optimalno vitalnost, nato pa smo jih gojili v štirih različnih pogojih, kombinacijah, ki so zajemale dve različni temperaturi (33 in 37°C) in dve različni vrednosti pCO₂ (10 in 20 %). Vzorce za proteomsko analizo 2D-DIGE smo pobrali po 72 urah gojenja in so predstavljali 12 eksperimentalnih skupin (tri celične linije, vsaka gojena pri štirih različnih pogojih), od katerih je vsaka vsebovala po štiri biološke ponovitve. Pred vzorčenjem smo v vsaki kulturi določili koncentracijo živih celic in viabilnost celic ter koncentracijo laktata, glutamina in glukoze. Koncentracijo živih celic in viabilnost celic smo med 72-urnim gojenjem celičnih kultur pri različnih pogojih vsak dan pomerili v celični kulturi, ki je predstavljala peto biološko ponovitev.

Znižana temperatura gojenja je pri vseh treh celičnih linijah rezultirala v nižji maksimalni koncentraciji živih celic, kar lahko razložimo z znanim pojavom upada celične delitve in podaljšano fazo celičnega cikla G1 oziroma zakasnitvijo apopotoze pri celicah, gojenih pri nižjih temperaturah. Vpliv vrednosti pCO₂ na hitrost rasti populacije celic se je razlikoval glede na temperaturo gojenja celic, saj višja vrednost pCO₂ v kulturah, gojenih pri temperaturi 37°C , ni bistveno vplivala na hitrost rasti populacije celic, medtem ko se je pri temperaturi 33°C pri višji vrednosti pCO₂ maksimalna koncentracija živih celic znižala. Omenjeni vpliv pCO₂ na hitrost rasti populacije celic pri nižji temperaturi je verjetno posledica kombiniranega vpliva niže temperature na celice in večje topnosti CO₂ pri nižji temperaturi, ki ima v primerjavi s temperaturo gojenja 37°C za posledico nižji intracelularni pH. Omenili smo tudi, da ta prek vpliva na celične organe negativno vpliva na celično delitev. Dodatno celica pri suboptimalnih pogojih porabi več energije za vzdrževanje. Temperatura in vrednost pCO₂ v treh dneh kultivacije nista vplivali na viabilnost celic, saj je ta pri vseh testiranih pogojih ostala konstantno visoka.

Z metabolnega vidika smo pri vseh treh celičnih linijah opazili štiri različne profile, ki ustrezajo štirim različnim pogojem gojenja. Metabolni profili so se med celičnimi linijami nekoliko razlikovali v smislu porabe glutamina in glukoze ter produkcije laktata. Opaziti je bilo, da sta si starševska celična linija CHO-*Der3* in celična linija mAb CHO-*Der3*-MTX metabolno nekoliko bolj podobni, celična linija mAb CHO-*Der3* pa se nekoliko razlikuje. Pri temperaturi 33°C je bil v primerjavi z gojenjem celic pri 37°C njihov metabolizem pričakovano upočasnen, saj se pri nižjih temperaturah viabilnost in energijsko stanje celic običajno ohranja, metabolizem pa se posledično upočasni. Čeprav vrednost pCO₂ v okviru tridnevnega gojenja pri 37°C ni vplivala na hitrost rasti populacije celic, je bila metabolna

aktivnost celic z vidika porabe glukoze in glutamina ter produkcije laktata pri vseh treh celičnih linijah pri zvišani vrednosti pCO_2 zmanjšana. Pri temperaturi 33 °C sta profila matabolnih aktivnosti (pri nižji in višji vrednosti pCO_2) pri vseh treh celičnih linijah sovpadala z rastnimi profili, saj je bila pri nižji koncentraciji živih celic, ki je bila zaznana pri kulturah, gojenih pri višji vrednosti pCO_2 , opazna tudi zmanjšana metabolna aktivnost. Zmanjšana metabolna aktivnost pri višjih vrednostih pCO_2 je ne glede na temperaturo gojenja lahko posledica inhibicije matabolnih poti, predvsem glikolize, kar je znan pojav pri nižji vrednosti intracelularnega pH.

Primerjava specifičnih vrednosti porabe substratov in produkcije metabolita je pokazala, da na matabolizem v pomenu večje produkcije laktata glede na količino porabljeni glukoze vplivata temperatura in vrednost pCO_2 . Izrazitejša povečana specifična produkcija laktata glede na specifično porabo glukoze pri višji vrednosti pCO_2 in nižji temperaturi je po vsej verjetnosti posledica kombiniranega vpliva znižane vrednosti intracelularnega pH pri višji vrednosti pCO_2 in povečane topnosti kisika in ogljikovega dioksida pri nižji temperaturi ter posledičnega kislega in oksidativnega okolja. Tovrstno okolje negativno vpliva na metabolno aktivnost celic in matabolizem glukoze, produkcija ROS v mitohondrijih se poveča, celice pa so po vsej verjetnosti s preusmeritvijo pretvorbe piruvata v laktat regulirale moteno oksidativno stanje.

Matabolizem se med celičnimi linijami nekoliko razlikuje, saj celična linija mAb CHO-Der3 kot vir energije očitno bolj učinkovito porablja glutamin, zato se specifična tvorba laktata glede na specifično porabo glukoze pri spremenjenih pogojih gojenja ne spremeni v taki meri. Na matabolizem in robustnost celic očitno vplivata tudi transfekcija in selekcijski pritisk, saj se rekombinantni celični liniji na neugodne pogoje gojenja iz matabolnega vidika odzoveta manj intenzivno v primerjavi s starševsko CHO-Der3. Z adaptacijo na MTX se je v primeru celične linije mAb CHO-Der3-MTX matabolizem celic v primerjavi z mAb CHO-Der3 spremenil v pomenu večje produkcije laktata glede na porabljeno glukozo ne glede na spremembo pCO_2 ali temperature.

Primerjava proteomskega odziva obravnavanih treh celičnih linij glede na različno vrednost pCO_2 pri posamezni temperaturi je pokazala, da so celice glede na število statistično značilno različnih proteinskih lis pri nižji temperaturi bolj občutljive za zvišano vrednost pCO_2 . Število proteinskih lis, katerih relativni povprečni volumen signala je bil statistično značilno različen glede na vrednost pCO_2 pri temperaturi gojenja 37 °C, je bilo namreč 17, medtem ko je bilo takih proteinskih lis pri temperaturi gojenja 33 °C kar 329. Od skupno 77 individualnih proteinov, identificiranih v 83 proteinskih lisah, ki so predstavljale endogene celične proteine, je bil identificiran eden, ki je bil statistično značilno spremenjen glede na vrednost pCO_2 pri temperaturi gojenja 37 °C, in

22, ki so bili statistično značilno spremenjeni glede na vrednost pCO₂ pri temperaturi gojenja 33 °C. Tri identificirane proteinske lise so predstavljale rekombinantno mAb.

Od vseh identificiranih proteinov, ki so bili statistično značilno bolj izraženi v celicah kultur, gojenih pri temperaturi 33 °C in zvišani vrednosti pCO₂ (20 %), je največ takih, ki so vpleteni v antioksidativno obrambo celic. Od skupno 22 proteinov jih je namreč kar 12 vključenih v antioksidativni odziv celic. Navedeno nakazuje, da je bil pri temperaturi 33 °C in vrednosti pCO₂ 20 % mehanizem antioksidativne obrambe pospešen oziroma so bile celice izpostavljene oksidativnemu stresu. Spremenjeno redoks okolje in akumulacija ROS, dejavnika, ki sta povzročila opažen antioksidativni odziv celic, sta povezana z intacelularno oziroma metabolno tvorbo ROS, ki je lahko povečana zaradi vpliva znižanega intracelularnega pH (posledica zvišane vrednosti pCO₂ v kulturi) na metabolizem glukoze in aktivnost dihalne verige. Dodatni dejavnik predstavlja povečana topnost plinov, kisika in CO₂, pri nižjih temperaturah, ki lahko vodi do hiperoksije in še dodatnega znižanja intracelularnega pH. Kapaciteta zaščite pred oksidativnimi dejavniki in njihovimi posledicami med tridnevno izpostavljenostjo celic nižji temperaturi in zvišani vrednosti pCO₂ (zaradi povečane topnosti plinov tudi zvišani vrednosti pO₂) očitno ni bila presežena, saj je bila viabilnost celic v tem času ohranjena. V nasprotnem primeru bi posledice oksidativnega stresa namreč vodile v celično apoptozo ali smrt, kar bi zasledili kot upad viabilnosti celic. Hkrati je treba poudariti, da na podlagi meritev, ki smo jih izvajali v študiji, ne moremo izključiti morebitne predapoptotične faze celic.

Statistično značilna razlika preostalih identificiranih proteinov pri temperaturi gojenja 33 °C kaže na spremembo metabolnih poti pri zvišani vrednosti pCO₂, in sicer na povečano aktivnost oziroma pospešitev cikla PFP, druge faze glikolize in anerobne glikolize. Pri zvišani vrednosti pCO₂ se predvideno poveča potreba celic po redukcijskem ekvivalentu NADPH, saj rezultati preko povečane vsebnosti sodeljujočih encimov nakazujejo na pospešen cikel PFP, pri katerem NADPH (pospešeno) nastaja, in na pospešitev reduktivnih biosintežnih poti, kot so metabolni proces maščobnih kislin, metabolni proces lipidov, sinteza purinov in redukcija GSH, ki je ključni del antioksidativnega mehanizma GSH, ki pa za svoj potek NADPH porablja. Povečana aktivnost cikla PFP in druge faze glikolize vodi do nastanka večjih količin piruvata. Ta se v primeru omenjenih pogojev pospešeno, s procesom anaerobne glikolize pretvarja v laktat. Povečano oziroma pospešeno aktivnost anaerobne glikolize lahko pojasnimo na dva načina. Prvi temelji na predpostavki o preseženi kapaciteti cikla TCA zaradi povečane tvorbe piruvata in se zato njegov višek po anerobni glikolizni poti pretvorji v laktat. Druga razloga temelji na antioksidativnem odgovoru celice na oksidativne dejavnike, saj celica s preusmeritvijo pretvorbe piruvata preko anareobne glikolize zmanjšuje aktivnost (aerobnih) mitohondrijskih metabolnih poti in posledično tudi produkcijo ROS. Na podlagi povezav cikla PFP, reduktivnih

biosintežnih poti in anaerobne glikolize rezultati tudi z metabolnega vidika potrjujejo predpostavko, da so bile celice pri temperaturi 33 °C in zvišani vrednosti pCO₂ izpostavljeni oksidativnemu stresu.

Ne glede na temperaturo gojenja se pri višji vrednosti pCO₂ relativna vsebnost rekombinantnega mAb v celici oziroma produkcija rekombinantnega mAb ni statistično značilno spremenila. Čeprav so bile celice pri nižji temperaturi gojenja obremenjene z oksidativnim stresom, so ohranile raven produkcije rekombinantnega mAb in viabilnosti celic.

Nezmanjšana produkcija pri neoptimalnih pogojih gojenja, predvsem pri nižji temperaturi 33 °C in višji vrednosti pCO₂, je lahko eden izmed dejavnikov povečane tvorbe ROS, ki se jih celica ob predpostavljenem hiperoksičnem in kislem okolju metabolno ni mogla znebiti ter je bila posledično izpostavljena oksidativnemu stresu. Za vzdrževanje viabilnosti celic in preprečevanja apoptoze so se vključili antioksidativni mehanizmi, kamor spada tudi anerobna glikoliza oziroma Warburgov efekt.

S študijo smo dobili globlji vpogled v proteomski odziv celic na zvišano vrednost pCO₂ pri nižji temperaturi gojenja. Ugotovili smo, da oba proučevana fizikalna parametra, nižja temperatura in zvišana vrednost pCO₂, negativno vplivata na hitrost rasti populacije in metabolno aktivnost celic CHO, kljub temu pa njihova viabilnost ni bila znižana. Izkazalo se je, da so celice CHO pri 33 °C bolj občutljive za zvišanje vrednosti pCO₂ v kulturi kot pri 37 °C in da so pri omenjenih oziroma preučevanih neoptimalnih pogojih te izpostavljeni oksidativnemu stresu, ki je posledica zvišane koncentracije ROS oziroma spremenjenega redoks okolja. Koncentriranje ROS v celici je verjetno posledica seštevka vpliva dejavnikov spremenjenega okolja, torej povečane topnosti plinov (O₂ in CO₂) pri nižji temperaturi, znižane vrednosti intracelularnega pH pri višji vrednosti pCO₂ in povečanih energijskih potreb za vzdrževanje celice in produkcijo rekombinantnega mAb, saj njegova relativna intracelularna vsebnost kljub neugodnim pogojem gojenja ni bila zmanjšana.

6.2 SUMMARY

CHO cells are the most widely used expression system in the manufacture of recombinant proteins. They have been shown to be very robust during recombinant manipulation, they are well characterized, have good growth and production characteristics, are safe, since they do not represent hosts for human proteins, and are positively accepted by regulatory authorities. Despite being widely used for decades, CHO cell mechanisms were for a long time not well known. Gaining a better insight into the basic biological mechanisms of CHO cells in industrial cell cultures is becoming crucial for improving process robustness and product quality profiles. The application of omics approaches and systemic biology has provided valuable tools for investigating cell physiology and recombinant protein production in CHO cells.

Several studies in recent years have shown a good correlation between mammalian cell culture at lower temperatures and increased production of recombinant proteins. Consequently, CHO cell lines are often cultured at sub-physiological temperatures. A positive effect of decreased culturing temperature is prolonged maintenance of cell viability, decreased accumulation of inhibitory by-products of cell metabolism, accumulation of cells in the G1-phase of the cell cycle and decreased growth, with consequent increased specific cell productivity. Reduced culture temperatures are correlated, or seem to coincide, with changes in gas solubility, so the impact of reduced temperature is in fact a combined effect of these two altered parameters.

Decreased culturing temperature and prolonged maintenance of cells in regulated bioreactor systems coincides with increased densities of producing cells, increased solubility of gasses in cell cultures and accumulation of CO₂. CO₂ is a waste product of cell metabolism and is often additionally used as a pH decreasing agent in industrial bioprocesses. Stripping accumulated CO₂ becomes especially difficult and problematic in large scale industrial bioprocesses with high viable cell densities. According to the literature, increased pCO₂ levels lead to decreased culture and intracellular pH, which has a concurrent impact on various cell processes, including metabolism and growth.

The aim of our work was to investigate the proteome response of CHO cell lines to an increased concentration of dissolved CO₂ at physiological and decreased culturing temperatures. In the experiment we used three different CHO cell lines with different manipulation backgrounds: parental cell line (parental CHO-Der3), mAb-secreting CHO-Der3 (mAb CHO-Der3) cell line and mAb-secreting CHO-Der3 cell line adapted to methotrexate (MTX), in the medium (mAb CHO-Der3-MTX cells).

The cells were first cultured and passaged several times at 37 °C and 10 % pCO₂ to adapt and reach optimal vitality. The cells were further cultured under four different conditions, representing the combination of two different temperatures (33 and 37 °C) and two different pCO₂ levels. The cultures were sampled 72 h after their inoculation under these four culture conditions, for protein extraction from four independent replicates. The samples consisted of 12 experimental groups (three cell lines, each cultured at four different culturing conditions). Each biological replicate was sampled for analysis of lactate, glutamine and glucose, and viable cell density and cell viability. The fifth shake flask for each cell line and each culture condition was concurrently cultivated as a control for the daily measurements of viable cell density and cell viability.

Comparison of growth among the parental CHO-*Der3*, mAb CHO-*Der3* and mAb CHO-*Der3*-MTX cell lines showed the most intensive growth for mAb CHO-*Der3* cells at 37 °C and both 10 % pCO₂ and 20 % pCO₂. mAb CHO-*Der3* cells reached high maximum viable cell density, while the parental CHO-*Der3* and mAb CHO-*Der3*-MTX cells showed lower growth under the same culturing conditions.

At the lower culturing temperature, all three cell lines showed slower growth and they all reached lower maximum viable cell density comparing to cultures raised at physiological temperature. The impact of increased pCO₂ level on cell growth varied according to the culture temperature; at 37 °C the increased level of pCO₂ did not have a major impact on cell growth whereas at 33 °C, maximum viable cell densities were much lower. Decreased growth at lower temperature can be explained by the known effects of reduced temperatures, such as decreased cell growth, G1-phase cell-cycle arrest and delayed apoptosis. Additionally, at lower temperatures, the solubility of CO₂ is higher, causing a decrease in intracellular pH and thus affecting the cell organelles and further cell proliferation and growth. Furthermore, at sub-optimal conditions, the cells spend more energy for their own maintenance. However, neither the reduced culturing temperature nor increased pCO₂ level had a major impact on cell viability, which was constantly very high in all of the test groups.

In general, metabolic activities in the present study showed four distinct profiles, corresponding to the four culture conditions. The parental CHO-*Der3* and mAb CHO-*Der3*-MTX cells showed similar metabolic activity in terms of their consumption of glutamine and glucose and their production of lactate, while increased metabolic activity was noticed for the mAb CHO-*Der3* cells. At 37 °C, increased pCO₂ did not have a major impact on the growth of these cell lines; whereas a decrease in their metabolic activity was observed. At 33 °C, metabolic activity followed the growth profiles in all three of these cell lines, in which lower metabolic activities were measured at lower viable cell densities. The

phenomenon of reduced metabolic activity at lower temperature was expected, since the viability and energetic state of cells at reduced temperatures are known to be usually maintained, whereas their metabolism is generally reduced. Decreased metabolic activity at both culturing temperatures could be a result of metabolic pathway inhibition, caused by decreased intracellular pH.

In contrast, when cell specific values of glutamine and glucose consumption and lactate production were compared, the parental CHO-*Der3* cells showed the highest metabolic activity and the mAb CHO-*Der3* cells the lowest. In general, the reduced culture temperature resulted in decreased specific glutamine and glucose consumption in all three cell lines, while specific lactate production was unaffected or increased. Furthermore, the ratio between specific lactate production and specific glucose consumption revealed that, at decreased temperature, cells produced more lactate per consumed glucose at both pCO₂ levels. Both the negative effect of elevated pCO₂ level on cell specific metabolic activity and the increased ratio between specifically produced lactate and consumed glucose were more pronounced at 33 °C. On the basis of higher solubility of gases at lower temperature, it was assumed that in our case the environment became more acidic with increased pCO₂ and decreased culture temperature and more oxic with increased solubility of oxygen at decreased culture temperature. The combined effect is believed to be the cause of the more pronounced change in the cell metabolism at lower temperature, indicated as increased specific production of lactate per consumed glucose and, according to the literature, changed metabolic activity and glucose metabolism with an enhanced production of ROS. When ROS production increases under these unfavourable conditions, cells switch the glucose metabolism towards the anaerobic pathway, whereby pyruvate is preferentially converted into lactate. The switch represents a mechanism for preventing excessive ROS production and regulating the changed redox state.

Comparison of specific metabolic activity between cell lines revealed a positive (adaptational) effect of transfection and selective pressure on cell response to changed pCO₂ and temperature which was manifested by a much lower extent of change in metabolism at recombinant cell lines in comparison to parental CHO-*Der3*. Interestingly, adaptation to MTX caused a change in metabolism whereby generally more lactate per consumed glucose was produced, independently of altered pCO₂ or temperature.

Seventeen protein spots were defined, which were significantly differently abundant according to the pCO₂ at 37 °C. Furthermore, the number of significantly abundant protein spots according to the pCO₂ level was much higher at 33 °C, and resulted in 329 distinguished protein spots, which indicates that the cell lines were more sensitive to the pCO₂ increase when cultured at 33 °C. A total of 83 protein spots were identified as

endogenous cellular proteins and they represented 77 unique proteins. One of these proteins was statistically differentially abundant according to pCO₂ at a culture temperature 37 °C, while 22 proteins were statistically differentially abundant according to pCO₂ at a culture temperature of 33 °C. Three protein spots were identified as recombinant mAbs.

Most of the identified proteins that were significantly differentially abundant in cells at a culture temperature of 33 °C and increased pCO₂ level (20 %) are involved in antioxidative defence mechanisms (12 out of 22). This suggests that the cells were exposed to oxidative stress under these unfavourable growth conditions. Oxidative stress and consequent antioxidative defence mechanisms are triggered by an accumulation of ROS and changed redox environment, which are presumably the result of the combined effect of intracellular (metabolic) ROS production and extracellular factor(s), such as increased oxygen solubility at a lower temperature, and the hyperoxic environment. However, the maintained cell viability of all the cell lines throughout the study shows that the antioxidant protection capacity of the cells was not exceeded, which would otherwise have led to cell apoptosis. However, a pre-apoptotic cell stage cannot be excluded by viable cell densities and cell viability measurements.

Other identified significantly differently abundant proteins at a culturing temperature of 33 °C indicated a change of metabolic pathways at increased pCO₂, specifically an increased PPP, the second phase of glycolysis and anaerobic glycolysis. PPP is normally favoured when a reduction of equivalent NADPH is needed for reductive biosynthesis reactions within the cell. Indeed, the results indicate an increased rate of PPP, which produces NADPH, as well as an increased rate of (NADPH consuming) reductive biosynthesis paths, such as fatty-acid metabolic processes, lipid metabolic processes, purine synthesis, and a reduction of GSH, a key mechanism of antioxidative defence. An increased rate of PPP and the second phase of glycolysis leads to increased production of pyruvate, which is then increasingly converted into lactate, as was indicated by the results. The rate of anaerobic glycolysis may be increased due to an increased amount of pyruvate, which exceeds the capacity of TCA and is instead converted through anaerobic glycolysis, or as a consequence of an antioxidative response, by which the cell reduces the activity of mitochondrial metabolic paths and so decreases the production of ROS. These metabolic changes, which were indicated by the results of proteomic analysis, additionally support the assumption of increased oxidative stress and antioxidative defence at a lower culturing temperature and increased pCO₂ level.

The results also indicate that the relative intracellular abundance of the recombinant mAb was not altered by the increase in the pCO₂ level. Despite challenging antioxidative stress and defence at a lower culture temperature, the cells maintained unaltered recombinant mAb production and viability.

Non-reduced recombinant protein production and the increased energy requirements for cell maintenance under these unfavourable culture conditions (33 °C and 20 % pCO₂) appear to have led to endogenous generation of ROS, which cannot be eliminated metabolically in this potentially hyperoxic and acidic environment. Antioxidative mechanisms, including anaerobic glycolysis, are then activated to protect the cells against this flood of ROS, to maintain cell viability and to prevent apoptosis.

This study provided further insight into the proteome responses of CHO cell lines to decreased culturing temperature and increased pCO₂. We concluded that both investigated parameters had a negative effect on the growth and metabolic activity of CHO cells. However, cell viability and recombinant mAb production were not decreased. The cells appeared to be more sensitive to increased pCO₂ (20 %) at a lower culturing temperature (33 °C), and to be exposed to oxidative stress, caused by the accumulation of ROS and changed redox environment when cultured under these unfavourable conditions. Accumulation of ROS is presumably a consequence of the combined effects of increased gas solubility (O₂ in CO₂) at lower temperatures, decreased intracellular pH at higher pCO₂, and increased energy requirements for cell maintenance and recombinant mAb production under these unfavourable growth conditions.

The accumulation of ROS in cells is probably the result of multiple factors in the changed environment, such as increased oxygen solubility at the lower culturing temperature, decreased intracellular pH at increased pCO₂ and increased energy demands for cell maintenance and recombinant protein production.

7 VIRI

- Al-Fageeh M.B., Marchant R.J., Carden M.J., Smales C.M. 2006. The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 5: 829–835
- Al-Fageeh M.B., Smales C.M. 2006. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochemical Journal*, 397, 2: 247–259
- Baik J.Y., Lee G.M. 2010. A DIGE approach for the assessment of differential expression of the CHO proteome under sodium butyrate addition: effect of Bcl-xL overexpression. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 2: 358–367
- Baik J.Y., Lee M.S., An S.R., Yoon S.K., Joo E.J., Kim Y.H., Park H.W., Lee G.M. 2006. Initial transcriptome and proteome analyses of low culture temperature-induced expression in CHO cells producing erythropoietin. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 2: 361–371
- Baycin-Hizal D., Tabb D.L., Chaerkady R., Chen L., Lewis N.E., Nagarajan H., Sarkaria V., Kumar A., Wolozny D., Colao J., Jacobson E., Tian Y., O'Meally R.N., Krag S.S., Cole R.N., Palsson B.O., Zhang H., Betenbaugh M. 2012. Proteomic Analysis of Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Proteome Research*, 11, 11: 5265–5276
- Beckmann T.F., Krämer O., Klausing S., Heinrich C., Thüte T., Büntemeyer H., Hoffrogge R., Noll. T. 2012. Effects of high passage cultivation on CHO cells: a global analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 3: 659–671
- Beer C., Buhr P., Hahn H., Laubner D., Wirth M. 2003. Gene expression analysis of murine cells producing amphotropic mouse leukaemia virus at a cultivation temperature of 32 and 37 degrees C. *Journal of General Virology*, 84, 7: 1677–1686
- Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 1: 9–19
- Bosron W.F., Li T.K. 1986. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology*, 6, 3: 502–510
- Brand K. 1997. Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29, 4: 355–364
- Butler M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 3: 283–291
- Cacciatore J.J., Chasin L.A., Leonard E.F. 2010. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnology Advances*, 28, 6: 673–681

- Carlage T., Kshirsagar R., Zang L., Janakiraman V., Hincapie M., Lyubarskaya Y., Weiskopf A., Hancock W.S. 2012. Analysis of dynamic changes in the proteome of a Bcl–XL overexpressing Chinese hamster ovary cell culture during exponential and stationary phases. *Biotechnology Progress*, 28, 3: 814–823
- Chen K., Liu Q., Xie L., Sharp P.A., Wang D.I.C. 2000. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 1: 55–61
- Chen Q., Vazquez E., Moghaddas S., Hoppel C., Lesnfsky E. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38: 36027–36031
- Chu L., Robinson D.K. 2001. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 2: 180–187
- Chuppa S., Tsai Y.S., Yoon S., Shackleford S., Rozales C., Bhat R., Tsay G., Matanguihan C., Konstantinov K., Naveh D. 1997. Fermenter temperature as a pool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 55, 2: 328–338
- Creative proteomics. 2016.
<http://www.creative-proteomics.com/services/2d-electrophoresis.htm> (14. 3. 2016)
- Dass C. 2001. Principles and practice of biological mass spectrometry. New York, Wiley-Interscience: 416 str.
- Davis R.J. 1999. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical Society Symposium*, 64: 1–12
- DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7, 1: 11–20
- deZengotita V., Schmelzer A.E., Miller W.M. 2002. Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO₂ and osmolality: Intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolism. *Biotechnology and bioengineering*, 77, 4: 369–380
- Doolan P., Meleady P., Barron N., Henry M., Gallagher R., Gammell P., Melville M., Sinacore M., McCarthy K., Leonard M., Charlebois T., Clynes M. 2010. Microarray and proteomics expression profiling identifies several candidates, including the valosin-containing protein (VCP), involved in regulating high cellular growth rate in production CHO cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, 1: 42–56
- Dresios J., Aschrafi A., Owens G.C., Vanderklish P.W., Edelman G.M., Mauro V.P. 2005. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 6: 1865–1870

- Du Y., Zhang H., Zhang X., Lu J., Holmgren A. 2013. Thioredoxin 1 is inactivated due to oxidation induced by peroxiredoxin under oxidative stress and reactivated by the glutaredoxin system. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 45: 32241–32247
- Eng J.K., McCormack A.I., Yates J.R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5, 11: 976–989
- Farout L., Mary J., Vinh J., Szweda L., Friguet B. 2006. Inactivation of the proteasome by 4-hydroxy-2-nonenal is site specific and dependant on 20S proteasome subtypes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453, 1: 135–142
- Farrell A., McLoughlin N., Milne J.J., Marison I.W., Bones J. 2014. Application of Multi-Omics Techniques for Bioprocess Design and Optimization in Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Proteome Research*, 13, 7: 3144–3159
- Feng H.T., Sim L.C., Wan C., Wong N.S.C., Yang Y. 2011. Rapid characterization of protein productivity and production stability of CHO cells by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 10: 1407–1412
- Feng H.T., Wong N.S.C., Sim L.C., Wati L., Ho Y., Lee M.M. 2010. Rapid characterization of high/low producer CHO cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 9: 1226–1230
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246, 4926: 64–71
- Fernandes A.P., Holmgren A. 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6, 1: 63–74
- Fidelman M., Seeholzer S.H., Walsh K.B., Moore R.D. 1982. Intracellular pH mediates action of insulin on glycolysis in frog skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 242, 1: 87–93
- Fisher A.B. 2011. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15, 3: 831–844
- FitzGerald U., Gorman A.M., Samali A. 2006. Heat shock proteins and the regulation of apoptosis. V: Heat shock proteins in neural cells. Richter-Landsberg C. (ed.). New York, Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, LLC: 53–65
- Fogolin M.B., Wagner R., Etcheverrigaray M., Kratje R. 2004. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 109, 1–2: 179–191
- Fox S.R., Patel U.A., Yap M.G., Wang D.I.C. 2004. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, 2: 177–184

- Galbis-Estrada C., Pons-Vázquez S., Gallego-Pinazo R., Lleó-Perez A., Garcia-Medina J.J., Bou V.V., Sanz-Solana P., Pinazo-Durán M.D. 2012. Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (ADH3) and low km mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). New evidence for differential expression in the rat retina in response to oxidative stress. *Free Radical Research*, 46, 1: 77–84
- Gan L., Johnson D.A., Johnson J.A. 2010. Keap1-Nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1. *European Journal of Neuroscience*, 31, 6: 967–977
- GE Healthcare. 2D Electrophoresis principles and methods. 2012. Munich, Technical University Munich: 162 str.
http://www.med.unc.edu/pharm/sondeklab/Lab%20Resources/protein_purification_handbooks/2D%20electrophoresis.pdf (13. 5. 2014)
- Gòdia F., Cairó J.J. 2006. 4. Cell Metabolism. V: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies. Ozturk S., Hu W-S. (eds.). New York, Taylor & Francis: 81–112
- Gon Y., Hashimoto S., Matsumoto K., Nakayama T., Takeshita I., Horie T. 1998. Cooling and rewarming-induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 MAP kinase-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249, 1: 156–160
- Görg A., Postel W., Günther S. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 9: 531–546
- Görg A., Postel W., Weser J., Günther S., Strahler J.R., Hanash S. M., Somerlo L. 1987. Elimination of point streaking on silver stained twodimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer *Electrophoresis*, 8; 122–124
- Gray D.R., Chen S., Howarth W., Inlow D., Maiorella B.L. 1996. CO₂ in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture. *Cytotechnology*, 22, 1–3: 65–78
- Hammond S., Swanberg J.C., Kaplarevic M., Lee K.H. 2011. Genomic sequencing and analysis of a Chinese hamster ovary cell line using Illumina sequencing technology. *BMC genomics*, 12, 1: e67, doi:10.1186/1471-2164-12-67: 8 str.
- Harms N., Ras J., Reijnders W.N.M., Van Spanning R.J.M., Stouthamer A.H. 1996. S-Formylglutathione hydrolase of *Paracoccus denitrificans* is homologous to human esterase D: a universal pathway for formaldehyde detoxification? *Journal of Bacteriology*, 178, 21: 6296–6299
- Hayduk E.J., Choe L.H., Lee K.H. 2004. A two-dimensional electrophoresis map of Chinese hamster ovary cell proteins based on fluorescence staining. *Electrophoresis*, 25, 15: 2545–2556
- Holmgren A., Johansson C., Berndt C., Lönn M.E., Hudemann C., Lillig C.H. 2005. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions*, 33, 6: 1375–1377

- Ishii T., Sakurai T., Usami H., Uchida K. 2005. Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. *Biochemistry*, 44, 42: 13893–13901
- Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y. 1997. An Nrf2 / small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 2: 313–322
- Jan D.C.H., Petch D.A., Huzel N., Butler M. 1997. The effect of dissolved oxygen on the metabolic profile of a murine hybridoma grown in serumfree medium in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 54, 2: 153–164
- Jarvis R.M., Hughes S.M., Ledgerwood E.C. 2012. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 7: 1522–1530
- Jenkins N., Parekh R.B., James D.C. 1996. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology*, 14, 8: 975–981
- Jones D.P. 2006. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*; 163, 1–2: 38–53
- Junn E., Taniguchi H., Jeong B.S., Zhao X., Ichijo H., Mouradian M.M. 2005. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 27: 9691–9696
- Kaufmann H., Mazur X., Fussenegger M., Bailey J.E. 1999. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 5: 573–582
- Kim J.Y., Kim Y.G., Lee G.M. 2012. Differential In-Gel Electrophoresis (DIGE) Analysis of CHO Cells Under Hyperosmotic Pressure: Osmoprotective Effect of Glycine Betaine Addition. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 6: 1395–1403
- Kimura R., Miller W.M. 1996. Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 52, 1: 152–160
- Kislinger T., Emili A. 2005. Multidimensional protein identification technology: current status and future prospects. *Expert Review of Proteomics*, 2, 1: 27–39
- Kumar N., Gammell P., Clynes M. 2007. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology*, 53, 1–3: 33–46
- Kumar N., Gammell P., Meleady P., Henry M., Clynes M. 2008. Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC Biotechnology*, 8: e42, doi:10.1186/1472-6750-8-42: 13 str.

- Kumuda C.D. 2013. Hyperoxia decreases glycolytic capacity, glycolytic reserve and oxidative phosphorylation in MLE-12 cells and inhibits complex I and II function, but not complex IV in isolated mouse lung mitochondria. PLoS ONE, 8, 9: e73358, doi:10.1371/journal.pone.0073358: 11 str.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 5259: 680–685
- Lee W.H., Wheatley W., Benedict W.F., Huang C.M., Lee E.Y. 1986. Purification, biochemical characterization, and biological function of human esterase D. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 83, 18: 6790–6794
- Legler P.M., Leary D.H., Hervey W.J. 4th, Millard C.B. 2012. A role for His-160 in peroxide inhibition of *S. cerevisiae* S-formylglutathione hydrolase: evidence for an oxidation sensitive motif. Archives of Biochemistry and Biophysics, 528, 1: 7–20
- Lim L.H.K., Pervaiz S. 2007. Annexin 1: the new face of an old molecule. The FASEB Journal, 21, 4: 968–975
- Liu J., Chung H.J., Vogt M., Jin Y., Malide D., He L., Dundr M., Levens D. 2011. JTV1 co-activates FBP to induce USP29 transcription and stabilize p53 in response to oxidative stress. The EMBO Journal, 30, 5: 846–858
- Lu J., Holmgren A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. Free Radical Biology and Medicine, 66: 75–87
- Lu S.C. 2013. Glutathione synthesis. Biochimica et Biophysica Acta, 1830, 5: 3143–3153
- Ma N., Ellet J., Okediadi C., Hermes P., McCormick E., Casnocha S. 2009. A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism. Biotechnology progress, 25, 5: 1353–1363
- McIlwain C.C., Townsend D.M., Tew K.D. 2006. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. Oncogene, 25, 11: 1639–1648
- Meleady P., Doolan P., Henry M., Barron N., Keenan J., O'Sullivan F., Clarke C., Gammell P., Melville M.W., Leonard M., Clynes M. 2011. Sustained productivity in recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. BMC Biotechnology, 11: 78
- Meleady P., Gallagher M., Clarke C., Henry M., Sanchez N., Barron N., Clynes M. 2012. Impact of miR-7 over-expression on the proteome of Chinese hamster ovary cells. Journal of Biotechnology, 160, 3–4: 251–262
- Miccoli L., Oudard S., Sureau F., Poirson F., Dutrillaux B., Poupon M. F. 1996. Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line. Biochemical Journal, 313, 3:957–962
- Mieyal J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D. 2008. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. Antioxidants & Redox Signaling, 10, 11: 1941–1988

- Mitsumoto A., Nakagawa Y. 2001. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radical Research*, 35, 6: 885–893
- Moore A., Mercer J., Dutina G., Donahue C.J., Bauer K.D., Mather J.P., Etcheverry T., Ryll T. 1997. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology*, 23, 1–3: 47–54
- Muñoz Morón U., Castilla-Cortázar I. 2012. Protection against oxidative stress and “IGF-I deficiency conditions”. V: Antioxidant enzyme. El-Missiry M.A. (ed.). Rijeka, InTech: 1–28
<http://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/protection-against-oxidative-stress-and-igf-i-deficiency-conditions-> (9. 9. 2014)
- Neuhoff V. 1990. Colloid coomassie blue staining of proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 371, 11: A10–A11
- Noori S. 2012. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports*, 1, 8: e413, doi:10.4172/scientificreports.413: 9 str.
- Ohsaka Y., Ohgiya S., Hoshino T., Ishizaki K. 2002. Phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase in human hepatoblastoma cells is transiently increased by cold exposure and further enhanced by subsequent warm incubation of the cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 12, 2–3: 111–118
- Ohsawa I., Nishimaki K., Yasuda C., Kamino K., Ohta S. 2003. Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells, *Journal of Neurochemistry*, 84, 5: 1110–1117
- Olsson I., Larsson K., Palmgren R., Bjellqvist B. 2002. Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics*, 2; 1630–1632
- Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 18: 3551–3567
- Puck T.T., Cieciura S.J., Robinson A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine*, 108, 6: 945–56
- Rabilloud T. 1998. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 19:758–760
- Rabilloud T. 2000. Proteome Research: Two dimensional gel electrophoresis and identification methods. Heidelberg (Nemčija), Springer-Verlag: 248 str.
- Ralph S.J., Rodríguez-Enríquez S., Neuzil J., Moreno-Sánchez R. 2010. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 1: 29–59

- Rhee H.J., Kim G.Y., Huh J.W., Kim S.W., Na D.S. 2000. Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. European Journal of Biochemistry, 267, 11: 3220–3225
- Rhee S.G., Woo H.A., Kil I.S., Bae S.H. 2012. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. Journal of Biological Chemistry, 287, 7: 4403–4410
- Riemann A., Ihling A., Schneider B., Gekle B., Thews O., 2013. Impact of extracellular acidosis on intracellular pH control and cell signaling in tumor cells. V: Oxygen Transport to Tissue XXXV. Van Huffel S., Naulaers G., Caicedo A., Bruley D.F., Harrison D.K. (eds.). New York, Springer Science + Business Media: 221–228
- Schmelzer A.E., Miller W.M. 2002. Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. Biotechnology Progress, 18, 2: 346–353
- Schoonen W.G., Wanamarta A.H., van der Klei-van Moorsel J.M., Jakobs C., Joenje H. 1990. Respiratory failure and stimulation of glycolysis in Chinese hamster ovary cells exposed to normobaric hyperoxia. Journal of Biological Chemistry, 265, 19: 1118–1124
- Selivanov V.A., Zeak J.A., Roca J., Cascante M., Trucco M., Votyakova T.V. 2008. The role of external and matrix pH in mitochondrial reactive oxygen species generation. Journal of Biological Chemistry, 283, 43: 29292–29300
- Seth G., Hossler P., Yee J. C., Hu W.S. 2006. Engineering cells for cell culture bioprocessing - physiological fundamentals. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, 101: 119–64
- Sharma R., Yang Y., Sharma A., Awasthi S., Awasthi Y.C. 2004. Antioxidant role of glutathione S-Transferases: Protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. Antioxidants & Redox Signaling, 6, 2: 289–300
- Shen A.Y., Van de Goor J., Zheng L., Reyes A.E., Krummen L. A. 2006. Recombinant DNA technology and cell line development. V: Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. Ozturk S.S., Hu W.S. (ur.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 15–40
- Sikalidis A.K., Mazor K.M., Lee J.I., Roman H.B., Hirschberger L.L., Stipanuk M.H. 2014. Upregulation of capacity for glutathione synthesis in response to amino acid deprivation: regulation of glutamate–cysteine ligase subunits. Amino Acids, 46, 5: 1285–1296
- Sonna L.A., Fujita J., Gaffin S.L., Lilly C.M. 2002. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. Journal of Applied Physiology, 92, 4: 1725–1742
- Srivastava S., Watowich S.J., Pettrash J.M., Srivastava S.K., Bhatnagar A. 1999. Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase. Biochemistry, 38, 1: 42–54

- St-Pierre J., Buckingham J., Roebuck S., Brand M. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 47: 44784–44790
- Stryer L. 1997. *Biochemistry*. 4. izdaja. New York. W.H. Freeman & Company: 1064 str.
- Tabe Y., Jin L., Contractor R., Gold D., Ruvolo P., Radke S., Xu Y., Tsutsumi-Ishii Y., Miyake K., Miyake N., Kondo S., Ohsaka A., Nagaoka I., Andreeff M., Konopleva M. 2007. Novel role of HDAC inhibitors in AML1/ETO AML cells: activation of apoptosis and phagocytosis through induction of annexin A1. *Cell Death and Differentiation*, 14, 8: 1443–1456
- Taira T., Saito Y., Niki T., Iguchi-Ariga S.M., Takahashi K., Ariga H. 2004. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Reports*, 5, 2: 213–218
- Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. 1988. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2, 20: 151–153
- Turrens J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552, 2: 335–344
- UniProt. Uniprot consortium. 2014.
<http://www.uniprot.org> (15. 5. 2014)
- Unlü M., Morgan M.E., Minden J.S. 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 11: 2071–2077
- Van Dyk D.D., Misztal D.R., Wilkins M.R., Mackintosh J.A., Poljak A., Varnai J.C., Teber E., Walsh B.J., Gray P.P. 2003. Identification of cellular changes associated with increased production of human growth hormone in a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Proteomics*, 3, 2: 147–56
- Varela D., Simon F., Riveros A., Jorgensen F., Stutzin A. 2004. NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 14:13301–13304
- Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 3191: 309–314
- Wei Y.Y., Naderi S., Meshram M., Budman H., Scharer J.M., Ingalls B.P., McConkey B.J. 2011. Proteomics analysis of chinese hamster ovary cells undergoing apoptosis during prolonged cultivation. *Cytotechnology*, 63, 6: 663–677
- Wellmann S., Buhrer C., Moderegger E., Zelmer A., Kirschner R., Koehne P., Fujita J., Seeger K. 2004. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *Journal of Cell Science*, 117, 9: 1785–1794
- Wetzelberger K., Baba S.P., Thirunavukkarasu M., Ho Y.S., Maulik N., Barski O.A., Conklin D.J., Bhatnagar A. 2010. Postischemic Deactivation of Cardiac Aldose Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 34: 26135–26148

- Will Y. 1999. Overview of Glutathione Function and Metabolism. V: Current Protocols in Toxicology. John Wiley & Sons, Inc. USA, 6.1: 6.1.1–6.1.18
- Winyard P.G., Moody C.J., Jacob C. 2005. Oxidative activation of antioxidant defence, Trends in Biochemical Sciences, 30, 8: 453–461
- Wurm F.M. 1990. Integration, amplification and stability of plasmid sequences in CHO cell cultures. Biologicals, 18, 3: 159–164
- Wurm F.M. 1999. Chinese hamster ovary cells, recombinant protein production. V: Encyclopedia of bioprocess technology, fermentation, biocatalysis and bioseparation. Flickinger M.C., Drew S.W. (ur.). New York, Taylor & Francis Group: 570–581
- Xing Z., Li Z., Chow,V., Lee S.S. 2008. Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysismethods. Biotechnology progress, 24, 3: 675–83
- Xu J., Zhong N., Wang H., Elias J.E., Kim C.Y., Woldman I., Pifl C., Gygi S.P., Geula C., Yankner B.A. 2005. The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. Human Molecular Genetics, 14, 9: 1231–1241
- Xu X., Nagarajan H., Lewis N.E., Pan S., Cai Z., Liu X., Chen W., Xie M., Wang W., Hammond S., Andersen M.R., Neff N., Passarelli B., Koh W., Fan H.C., Wang J., Gui Y., Lee K.H., Betenbaugh M.J., Quake S.R., Famili I., Palsson B. O. 2011. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. Nature Biotechnology, 29, 8: 735–41
- Yoon S.K., Hwang S.O., Lee G.M. 2004. Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: Clonal variation. Biotechnology Progress, 20, 6: 1683–1688
- Yoon S.K., Kim S.H., Lee G.M. 2003a. Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. Biotechnology Progress, 19, 1: 1383–1386
- Yoon S.K., Song J.Y., Lee G.M. 2003b. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. Biotechnology and Bioengineering, 82, 3: 289–298
- Zagari F. 2012. Multidisciplinary analysis of the metabolic shift to lactate consumption in CHO cell culture. Thèse No 5420 (2012), Losanne, École polytechnique fédérale de Lausanne: 122 str.
http://infoscience.epfl.ch/record/180623/files/EPFL_TH5420.pdf. (15. 5. 2014)
- Zanghi J.A., Schmelzer A.E., Mendoza T.P., Knop R.H., Miller W.M. 1999. Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO₂ or pH. Biotechnology and Bioengineering, 65, 2: 182–191

- Zhang J., Chen Q.M. 2013. Far upstream element binding protein 1: a commander of transcription, translation and beyond. *Oncogene*, 32, 24: 2907–2916
- Zhou W., Freed C.R. 2005. DJ-1 Up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T α -synuclein toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 52: 43150–43158
- Zhu M.M., Goyal A., Rank D.L., Gupta S.K., Vanden Boom T., Lee S.S. 2005. Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnology Progress*, 21, 1: 70–77

ZAHVALA

Delo sem opravila v podjetju Lek, d. d., na področju biofarmacevtike, ki je delo tudi finančno podprlo, najprej na oddelku Celična in molekularna biologija, končala pa sem ga na oddelku Analitike, na katerem so mi omogočili čas za pripravo članka in pisnega dela doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr. Branki Javornik za mentorsko delo, vso spodbudo in pomoč ter za hiter in strokoven pregled doktorskega dela. Hvala tudi članom komisije prof. dr. Mojci Narat, prof. dr. Petru Dovču in doc. dr. Bojanu Doljaku za pregled doktorskega dela in prispevek pri zaključni fazi podiplomskega študija. Zahvaljujem se tudi Martinu Cregeenu za lektoriranje članka in angleškega teksta v doktorski disertaciji.

K uspešni izvedbi doktorske disertacije so pomembno pripomogli sodelavci in sodelavke. Zahvaljujem se Andreju Franckyju, ki mi je omogočil izvedbo dela na oddelku Celična in molekularna biologija, in dr. Lei Bojić, ki mi je na oddelku Analitike omogočila čas za pripravo članka in pisnega dela doktorske disertacije, natančno pregledala obe deli in dala koristne nasvete. Obema se zahvaljujem tudi za zaupanje in podporo. Predvsem pa se zahvaljujem dr. Stanislavu Mandelcu za pomoč pri spoznavanju metode 2D-DIGE in konstruktivne nasvete ter pomoč pri obdelavi proteomskeih podatkov in dr. Saši Stojkoviću za nasvete pri načrtovanju eksperimenta in pomoč pri interpretaciji rastnih in metabolnih podatkov. Hvala tudi ožnjim sodelavcem za prijetno in prijateljsko vzdušje ter njihovo podporo.

Največja zahvala gre moji družini, ki je verjela vame in me na vsakem koraku spodbujala ter priskočila na pomoč, kadar sem jo potrebovala. Za toplino, modre nasvete in pomoč pri študiju se zahvaljujem tudi dedku in babici, ki sta budno spremljala to mojo pot, vendar težko pričakovanega zaključka žal nista dočakala.

Posebna zahvala pa gre mojima Saši in Ajani, ki sta mi potprežljivo stala ob strani.