

Stanični ciklus i smrt stanice u proizvodnoj staničnoj liniji

Ivanić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:613160>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studenog 2020.

Ana Ivanić

1177/BPI

**STANIČNI CIKLUS I SMRT
STANICE U PROIZVODNOJ
STANIČNOJ LINIJI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Radošević u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3848 "Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica".

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveni polje: Biotehnologija

STANIČNI CIKLUS I SMRT STANICE U PROIZVODNOJ STANIČNOJ LINIJI

Ana Ivanić, 1177/BPI

Sažetak: Proizvodne stanične linije važan su ekspresijski sustav za proizvodnju biofarmaceutika koji se primjenjuju u terapiji mnogih oboljenja poput autoimunih bolesti, hematoloških poremećaja, hormonalne neravnoteže, karcinoma, infekcija, genetičkih poremećaja i dr. Kako bi se zadovoljili rastući zahtjevi za biofarmaceuticima te povećala ekonomska isplativost proizvodnje važno je optimirati proces proizvodnje obzirom da se kulturom životinjskih stanica dobivaju niži prinosi proizvoda u odnosu na druge ekspresijske sustave. Neke od strategija koje se primjenjuju u tu svrhu su kontrola staničnog ciklusa, stanične smrti i metabolizma stanica zbog čega je vrlo važno poznavati mehanizme tih staničnih procesa. Navedene strategije pokazale su veliki potencijal primjene u proizvodnji biofarmaceutika. U ovom radu dan je pregled najčešće korištenih proizvodnih staničnih linija, procesa stanične diobe i smrti te kako se kontrolom navedenih staničnih procesa mogu ostvariti poboljšanja u proizvodnji biofarmaceutika.

Ključne riječi: proizvodna stanična linija, stanični ciklus, stanična smrt

Rad sadrži: 41 stranica, 11 slika, 2 tablice, 52 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Igor Slivac
2. Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević
3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
4. Doc. dr. sc. Teuta Murati (zamjena)

Datum obrane: 4. studenog 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

CELL CYCLE AND CELL DEATH IN THE PRODUCTION CELL LINE

Ana Ivanić, 1177/BPI

Abstract: Production cell lines are an important expression system for the production of biopharmaceuticals that are used in the treatment of many diseases such as autoimmune diseases, hematological disorders, hormonal imbalance, cancer, infections, genetic disorders etc. In order to meet growing demands for biopharmaceuticals and increase the economic profitability of production, it is important to optimize the production process, since animal cell cultures result with lower production yields compared to the other expression systems. Some of the strategies applied for this purpose are control of cell cycle, cell death, and cell metabolism, so it is very important to know the mechanisms of these cellular processes. These strategies have shown great potential for application in the production of biopharmaceuticals. This graduation thesis provides an overview of the most commonly used production cell lines, cell division and death and how improvements in the production of biopharmaceuticals can be achieved by controlling these cellular processes.

Keywords: production cell line, cell cycle, cell death

Thesis contains: 41 pages, 11 figures, 2 tables, 52 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:

Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Kristina Radošević, Associate professor

Reviewers:

1. PhD Igor Slivac, Associate professor
2. PhD Kristina Radošević, Associate professor
3. PhD Ivana Kmetič, Associate professor
4. PhD Teuta Murati, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 4 November 2020

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PROIZVODNE STANIČNE LINIJE	2
2.1.1. Povijest	2
2.1.2. Najvažnije stanične linije u proizvodnji biofarmaceutika	6
2.1.2.1. CHO	6
2.1.2.2. NS0 i Sp2/0-Ag14	7
2.1.2.3. BHK-21	8
2.1.2.4. HEK-293	9
2.1.2.5. Hibridoma stanice	9
2.1.3. Prednosti i nedostaci životinjskih stanica u odnosu na druge ekspresijske sustave	10
2.2. STANIČNI CIKLUS	11
2.2.1. Interfaza	12
2.2.2. Mitoza	13
2.2.3. Regulacija staničnog ciklusa	13
2.2.3.1. Pozitivni regulatori	14
2.2.3.2. Negativni regulatori	15
2.2.3.3. Kontrolne točke	16
2.3. STANIČNA SMRT	17
2.3.1. Apoptoza	17
2.3.2. Autofagija	21
2.3.3. Nekroza	24
2.3.4. Morfološke promjene pri različitim oblicima stanične smrti	24
2.4. OPTIMIRANJE BIOPROCESA PROIZVODNJE BIOFARMACEUTIKA	26
2.4.1. Kontrola staničnog ciklusa	27
2.4.1.1. Zaustavljanje staničnog ciklusa blagom hipotermijom	28
2.4.1.2. Zaustavljanje staničnog ciklusa kemijskim reagensima	28
2.4.1.3. Zaustavljanje staničnog ciklusa primjenom genetičkog inženjerstva	29
2.4.2. Kontrola stanične smrti	30
2.4.2.1. Prekomjerna ekspresija anti-apoptotičkih gena	31
2.4.2.2. Negativna regulacija pro-apoptotičkih proteina	31
2.4.3. Kontrola metabolizma stanica	32
2.4.3.1. Formulacija medija za uzgoj stanica	33

2.4.3.2. Kontrola metabolizma genetičkim inženjerstvom	33
3. ZAKLJUČCI.....	36
4. LITERATURA.....	37

1. UVOD

Biofarmaceutici proizvedeni kulturom životinjskih stanica važan su čimbenik u terapiji mnogih medicinskih stanja poput autoimunih bolesti, hematoloških poremećaja, hormonalne neravnoteže, karcinoma, infekcija, genetičkih poremećaja i dr. Tržište biofarmaceutika proizvedenih primjenom kulture životinjskih stanica iz godine u godinu sve više raste (Dumont i sur., 2015). Najčešće primjenjivane stanice domaćini, u proizvodnji komercijalno važnih rekombinantnih terapijskih proteina, su CHO, NS0, Sp2/0-Ag14, HEK-293, BHK-21 te hibridoma stanice. Od navedenih staničnih linija, u proizvodnji biofarmaceutika najviše se primjenjuju CHO stanice (Kuytermans i Al-Rubeai, 2015). Osim životinjskih stanica koriste se i drugi ekspresijski sustavi za proizvodnju biofarmaceutika poput stanica bakterija, kvasaca, plijesni te insekti, no najviše se primjenjuju životinjske stanice zbog mogućnosti proizvodnje velikih, kompleksnih proteina i provođenja posttranslacijskih modifikacija sličnim onima u ljudskim stanicama (Berlec i Štrukelj, 2013).

Obzirom da su u počecima primjene životinjskih stanica prinosi rekombinantnog proteina bili mali, oko 50 mg L^{-1} , bilo je važno unaprijediti proces proizvodnje kako bi on bio ekonomski isplativ i mogao zadovoljiti rastuće potrebe za biofarmaceuticima (Lim i sur., 2010). Neke od strategija koje se primjenjuju u cilju postizanja veće produktivnosti procesa jesu kontrola staničnog ciklusa, stanične smrti i metabolizma stanice. Istraživanja su pokazala da ekspresija rekombinantnog proteina može biti vezana uz određenu fazu staničnog ciklusa. Najveći fokus je na postizanju zastoja staničnog ciklusa proizvodne stanične linije u G_1 fazi jer se smatra da stanice u toj fazi imaju najveću metaboličku aktivnost te da ekspimiraju mnoge gene vezane za biogenezu ribosoma i translaciju proteina (Baek i sur., 2015). Postizanjem maksimalne gustoće stanica u proizvodnom procesu dolazi do brze stanične smrti što za posljedicu ima smanjenu proizvodnju biofarmaceutika te može imati negativni utjecaj na kvalitetu samog proizvoda zbog čega je važno primijentiti metode kojima se odgađa stanična smrt. Osim toga, stanična smrt povezana je i sa načinom na koji proizvodne stanične linije metaboliziraju izvore ugljika i dušika te stvaraju toksične metabolite koji imaju negativni utjecaj na produktivnost procesa pa njihovo nastajanje treba smanjiti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROIZVODNE STANIČNE LINIJE

Stanična linija je trajna stanična kultura koja ima svojstvo da se u *in vitro* uvjetima može neograničeno dijeliti ukoliko se nalazi u odgovarajućem mediju za uzgoj stanica i odgovarajućim okolišnim uvjetima (Urlich i Pour, 2001). Stanična linija se dobiva u laboratoriju spontanom transformacijom stanice ili određenim postupkom imortalizacije čime poprima svojstvo "besmrtnosti", a zadržava one ključne, željene karakteristike specifične za samu stanicu.

Stanične linije imaju važnu ulogu u znanosti i industriji. Eksperimenti na staničnim linijama uvelike su pridonijeli razumijevanju različitih područja znanosti kao što su fiziologija stanica, biokemija, genetika, imunologija, virologija, onkologija, toksikologija i dr. Osim toga, drugom polovicom 20. stoljeća započelo se s industrijskom primjenom proizvodnih staničnih linija za dobivanje velikog broja različitih bioloških proizvoda, od cjepiva, rekombinantnih proteina, monoklonskih protutijela i drugo.

2.1.1. Povijest

Gotovo sto godina je prošlo od početka kultivacije životinjskih stanica do njihove široke primjene u proizvodnji raznih proizvoda. Uzgoj životinjskih stanica započeo je u zadnjem desetljeću 19. stoljeća kada su znanstvenici nastojali uzgojiti komadiće tkiva u krvnoj plazmi. Uspješnost tih eksperimenata prije svega je ovisila o kvaliteti nutrijenata prisutnih u mediju te o sterilnosti eksperimenata. 1907. g. Ross Harrison je prvi koji je zabilježio održavanje i rast živčanih stanica u visećoj kapljici tijekom 30-ak dana. Taj eksperiment je pokazao da je moguće održati normalnu funkciju stanica u *in vitro* uvjetima te se stoga 1907. g. smatra početkom stanične kultivacije. Također, Harrison i njegovi nasljednici uočili su veliku važnost održavanja aseptičnih uvjeta za uspješnost eksperimenata (Kretzmer, 2002).

Sljedeći događaj koji je doveo do napretka u uzgoju staničnih kultura bio je razvoj antibiotika 1940-ih godina. Dodatak antibiotika pri uzgoju kultura životinjskih stanica znatno je pomogao u sprječavanju kontaminacije kulture raznim mikroorganizmima, koji bi konkurirali za nutrijente te zbog veće specifične brzine rasta, nego što je ona za životinjske stanice, prerasli medij i onemogućili rast životinjskih stanica. Osim toga, istovremeno su se razvijale i druge tehnike za održavanje sterilnih uvjeta (Kretzmer, 2002).

Izolacija agresivnih stanica raka grlića maternice pacijentice Henriette Lacks, poznatih kao HeLa stanice, 1951. g. i njihov uzgoj u *in vitro* uvjetima bio je najznačajniji iskorak prema trajnim, ljudskim staničnim kulturama koje imaju svojstvo neograničene diobe u *in vitro* uvjetima što je karakteristika kancerogenih stanica (Kretzmer, 2002).

1950-ih godina razvijen je proces proizvodnje virusnog cjepiva protiv dječje paralize, uzrokovane poliovirusom, pomoću životinjskih stanica, odnosno primarne stanične kulture bubrega majmuna. Time je to cjepivo postalo prvi komercijalno dostupan proizvod dobiven primjenom kulture životinjskih stanica. No, tom proizvodnjom su prepoznati i mnogi problemi kao što su kontaminacija cjepiva virusom majmuna SV-40, korištenje nedovoljno poznatih stanica kao stanica domaćina za proizvodnju, limitirajući rast stanica te korištenje isključivo adherentne kulture (Merten, 2006).

Veliki napredak u korištenju životinjskih stanica u proizvodne svrhe vezan je uz razvoj trajnih staničnih linija, kemijski definiranih medija za uzgoj stanica te uzgoj stanica u suspenziji. 1955. g. Harry Eagle opisuje prvi kemijski definiran medij za kulture stanica EMEM (eng. *Eagle's minimum essential medium*) koji je uspješno zamijenilo dotadašnje kemijski nedefinirane medije za uzgoj životinjskih stanica. Kemijski definirani mediji omogućili su reproducibilnost rezultata i proizvodnog procesa i dr. Jedini nedostatak ranijih kemijski definiranih medija bio je nužni dodatak kemijski nedefiniranog krvnog seruma.

Veliki korak za primjenu kulture životinjskih stanica u proizvodne biotehnoške svrhe bio je uspjeh Capsticka i njegovih suradnika koji su 1962. g. uspješno uzgojili BHK (eng. *Baby hamster kidney*) stanice u suspenziji i time omogućili kultivaciju životinjskih stanica u velikom mjerilu (Kretzmer, 2002.). Nadalje, tijekom 1960-ih godina razvijeno je nekoliko humanih cjepiva dobivenih kulturom životinjskih stanica kao što su protiv ospica, bjesnoće, mumpsa i rubeole (Kretzmer, 2002). Prvi val komercijalno dostupnih proizvoda dobivenih pomoću kulture životinjskih stanica upravo je vezan uz razvoj virusnih cjepiva. Druge vrste biofarmaceutika su bile dobivene u vrlo malim prinosima tako da njihova komercijalna proizvodnja u to doba nije bila ekonomski isplativa.

1978. g. Američka agencija za hranu i lijekove, FDA (eng. *U.S. Food and Drug Administration*), dozvolila je upotrebu kontinuiranih staničnih linija za proizvodnju bioloških proizvoda za ljudsku upotrebu. Ta odluka je prethodila komercijalnoj proizvodnji glikoproteina interferona pomoću Namalwa limfoblastoidne stanične linije izolirane iz pacijenta s Burkittovim limfomom. Time se proizvodnja primjenom kultura životinjskih

stanica, osim na dotadašnja virusna cjepiva, proširila na još jednu vrstu biološkog proizvoda (Merten, 2006).

Sljedeći val razvoja industrijski važnih proizvoda, dobivenih primjenom kultura životinjskih stanica, vezan je uz fuziju stanica limfocita s besmrtnim mijeloma stanicama kasnih 1970-ih čime su dobivene hibridne stanice koje su imale svojstvo limfocita da proizvode antitijela za određeni antigen, a s druge strane svojstvo kancerogene stanice da se mogu beskonačno dijeliti u *in vitro* uvjetima. Tehnika hibridizacije omogućila je kompanijama proizvodnju monoklonskih protutijela protiv bilo kojeg poznatog antigena. Monoklonska protutijela su, zbog svoje visoke selektivnosti, široko primjenjiva u terapiji karcinoma, autoimunih i drugih upalnih bolesti te medicinskoj dijagnostici virusa, bakterija, parazita i drugih antigena (Kretzmer, 2002).

Rane 1980-e obilježila je proizvodnja novog oblika biofarmaceutika, heterolognih proteina pomoću CHO (eng. *Chinese hamster ovary*) stanica te razvoj amplifikacijskih i selekcijskih markera dihidrofolat reduktaze (DHRF) i glutamin sintetaze (GS) (Merten, 2006). Prvi heterologni protein proizveden pomoću životinjskih stanica bio je tkivni aktivator plazminogena (tPA), koji je iznimno važan za otapanje ugrušaka u kapilarama u terapiji srčanog infarkta (Kretzmer, 2002).

Sljedeća vrsta proizvoda kulture životinjskih stanica odobrena 1989. g. za ljudsku upotrebu je hormon eritropoetin koji kontrolira dozrijevanje crvenih krvnih stanica. Eritropoetin je također dobiven tehnologijom rekombinantne DNA pomoću CHO stanica (Kretzmer, 2002).

Danas biotehnoške i farmaceutske industrije zahvaljujući tehnologiji rekombinante DNA i optimizaciji procesa proizvodnje, proizvode cijeli niz bioloških terapeutika (biofarmaceutika) dobivenih primjenom kulture životinjskih stanica kao što su različita antitijela, citokini, hormoni, faktori zgrušavanja, cjepiva, enzimi i dr. Među navedenim proizvodima, najzastupljenija je proizvodnja monoklonskih protutijela te je upravo to najbrže rastući segment biofarmaceutika (Kuystermans i Al-Rubeai, 2015) (tablica 1).

Tablica 1. Primjeri komercijalno važnih biofarmaceutika dobivenih primjenom životinjskih staničnih linija (Kuystermans i Al-Rubeai, 2015)

Trgovački naziv	Proizvođač	Godina odobrenja	Kategorija proizvoda	Primjena	Životinjska stanična linija
Zaltrap	Regeneron/Sanofi Aventis	2013. (EU), 2012. (SAD)	Humanizirano monoklonsko protutijelo	Terapija metastatskog raka debelog crijeva	CHO
Humira	AbbVie & Eisai	2003. (EU), 2002. (SAD)	Humano monoklonsko protutijelo	Regulacija upalnih procesa	CHO
Avonex	Biogen	1997. (EU)	Citokin	Terapija multiple skleroze	CHO
Epogen	Amgen & JNJ & Kyowa	1989. (EU), 1988. (SAD)	Hormon	Terapija anemije	CHO
Herceptin	Genentech/Roche	2000. (EU), 1998. (SAD)	Humanizirano monoklonsko protutijelo	Terapija određenih karcinoma dojke	CHO
NovoSeven	Novo Nordisk	1999. (EU), 1996. (SAD)	Faktor zgrušavanja	Terapija hemofilije	CHO
Bexxar	GlaxoSmithKline	2003. (SAD)	Mišje monoklonsko protutijelo	Terapija ne-Hodkingovog limfoma	Hibridoma
Kogenate Bayer	Bayer Healthcare	2000. (EU)	Faktor zgrušavanja	Terapija hemofilije	BHK
Zenapax	Roche	1999. (EU)	Humanizirano monoklonsko protutijelo	Prevenција odbacivanja organa nakon transplantacije	Sp2/0
Synagis Palivizumab	Medimmune Inc.	1999. (EU)	Kimerno monoklonsko protutijelo	Terapija infekcija respiratornog sincicijskog virusa	NS0

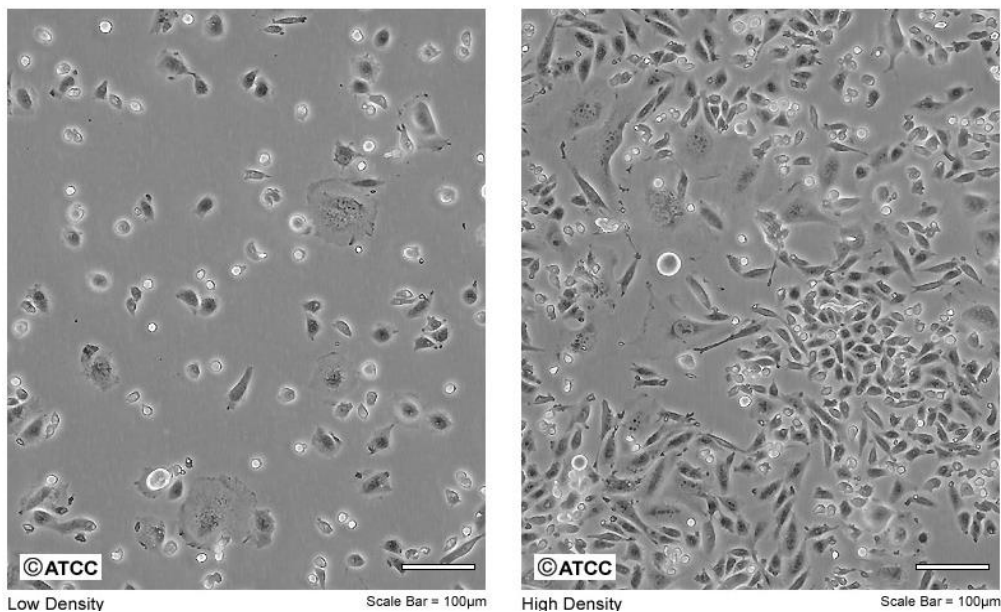
2.1.2. Najvažnije stanične linije u proizvodnji biofarmaceutika

Mnogo je čimbenika koje treba uzeti u obzir prije odabira određene proizvodne stanične linije za proizvodnju određene vrste biofarmaceutika. Idealna proizvodna stanična linija prije svega bi trebala ostvariti dobar rast u suspenziji, u mediju bez dodatka seruma, imati visoku produktivnost te provoditi potrebne posttranslacijske modifikacije. Iz sigurnosnih i zakonskih razloga, proizvodna stanična linija trebala bi biti poznata, dobro opisana i genetički stabilna (Zhang, 2010). Iako se većina terapijskih proteina proizvodi staničnom kulturom životinjskih stanica poput CHO i mišjih mijeloma stanica (NS0, Sp2/0), proizvodnja se pomalo okreće prema korištenju humanih staničnih linija. Većina životinjskih staničnih linija mogu provoditi posttranslacijske modifikacije slične onima u ljudskim stanicama, no one također provode i posttranslacijske modifikacije kojih nema u ljudskim stanicama (poput sinteze glikana galaktoza- α -1,3-galaktoza i N-glikolilneuraminska kiselina) što može potencijalno izazvati imunogenu reakciju prilikom primjene u terapiji ljudi (Dumont i sur., 2015).

2.1.2.1. CHO

CHO (eng. *Chinese hamster ovary*) stanična linija uspostavljena je 1957. g. iz ovarija odrasle ženke kineskog hrčka (slika 1). Najbolje je okarakterizirana životinjska stanična linija i najčešće korištena u biotehnološkoj industriji. Preko dvije trećine biofarmaceutika prisutnih na tržištu 2014. g., dobivenih kulturom životinjskih stanica, proizvedeno je primjenom suspenzijskih CHO stanica (Kuystermans i Al-Rubeai, 2015). Upravo zbog svoje široke primjene - metabolizam, karakteristike rasta, ponašanje u bioreaktorima, potencijalne nečistoće CHO linije dobro su poznate (Zhang, 2010). Ova stanična linija ima nekoliko važnih prednosti. Stanice mogu rasti u suspenziji što omogućuje proizvodnju u velikom mjerilu i u kemijski definiranom mediju bez dodatka seruma, čime je izbjegnuto onečišćenje proteinima i patogenima podrijetlom iz životinjskog seruma. Također, veći prinosi rekombinantnih proteina (više od 1 g L^{-1} za neke proteine) uspješno su ostvareni primjenom amplifikacijskih i selekcijskih markera: dihidrofolat reduktaze (DHFR) i glutamin sintetaze (GS). Ova stanična linija neznatno je osjetljiva na promjene u pH, koncentraciji kisika, tlaka i temperature tijekom proizvodnje. CHO stanice sposobne su proizvoditi proteine kompleksnih posttranslacijskih modifikacija slično kao u ljudskim stanicama. No, određene posttranslacijske modifikacije proteina glikozilacijom ne mogu provoditi, dok s druge strane

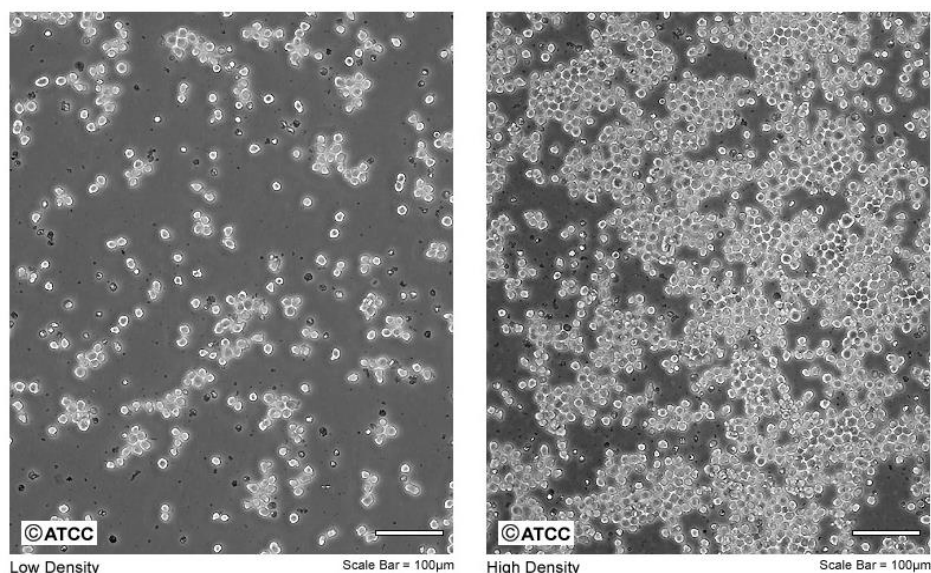
proizvode neke glikane koji se ne eksprimiraju u ljudskim stanicama, kao što su galaktoza- α -1,3-galaktoza i N-glikolilneuraminska kiselina. Za oba glikana se nalaze protutijela u ljudskoj krvi što teoretski može pridonijeti povećanom imunom odgovoru, iako to još uvijek nije jasno dokazano (Dumont i sur., 2015). No, vezanje takvih glikana nije problem prilikom proizvodnje proteina koji nisu glikozilirani. Obzirom da je prvi bioterapeutik tkivni plazminogeni aktivator (tPA) proizveden pomoću CHO stanica odobren još 1986. g. od čega je prošlo više od 30 godina, do sada su se CHO stanice pokazale sigurnim stanicama domaćinima za biosintezu proizvoda za upotrebu kod ljudi.



Slika 1. CHO/dhfr- stanična linija (ATCC, 2020)

2.1.2.2. NS0 i Sp2/0-Ag14

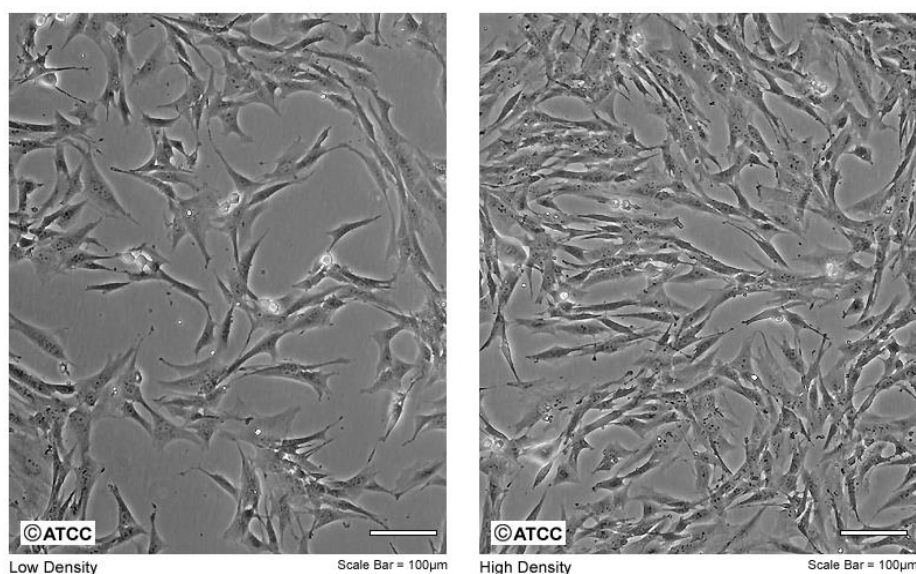
Stanične linije mišjeg mijeloma NS0 i Sp2/0-Ag14 dobivene su prije tridesetak godina iz tumorske stanične linije plazmocitoma BALB/c miša (slika 2). Takve stanice imaju potrebne sustave za sintezu i sekreciju imunoglobulina zbog čega se koriste u proizvodnji monoklonskih protutijela (Dumont i sur., 2015). Početne stanične linije prošle su kroz niz postupaka kloniranja i selekcije, a u slučaju Sp2/0 i fuzije sa stanicama slezene drugog BALB/c miša kako bi se u konačnici dobile ove dvije stanične linije sposobne dati visoke prinose protutijela. Osim toga, NS0 i Sp2/0 stanične linije rastu dobro u suspenziji čak i nakon adaptacije na rast u mediju bez seruma. No, primijećeno je da NS0 stanična linija, kao i CHO, može pri posttranslacijskim modifikacijama dodati Gal- α -1,3-Gal šećerni ostatak na N-glikane proteina koji potencijalno može biti imunogen kod ljudi (Zhang, 2010).



Slika 2. Sp2/0-Ag14 stanična linija (ATCC, 2020)

2.1.2.3. BHK-21

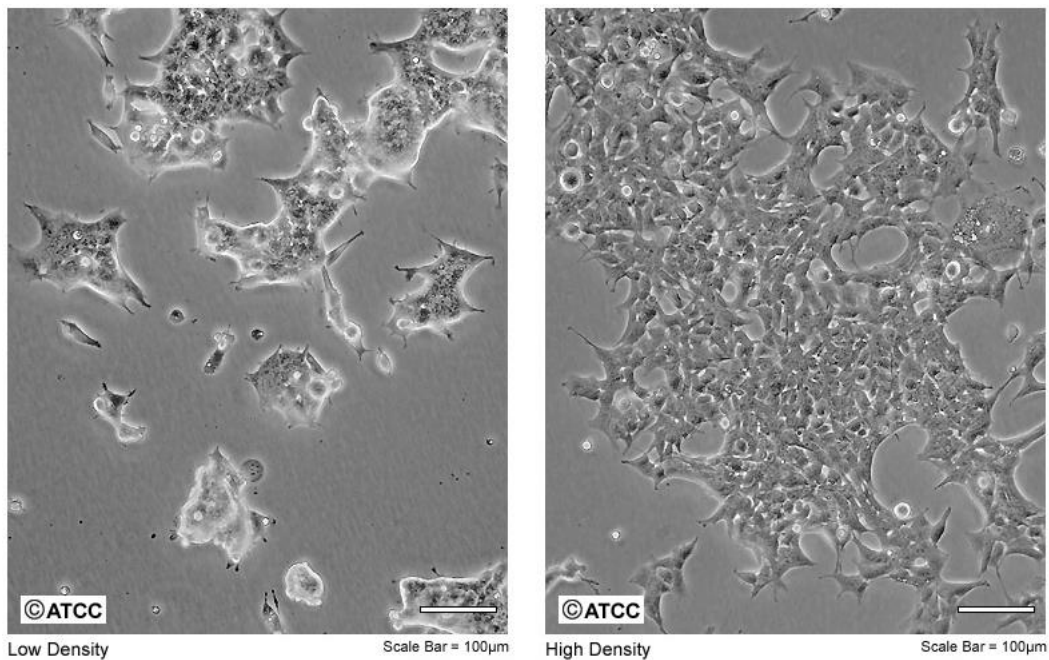
BHK-21 (*eng. Baby hamster kidney*) stanična linija izvedena je 1961. g. iz primarne stanične kulture bubrega sirijskog hrčka. Stanice su izolirane iz hrčka starog 1 dan i legla broja 21 po čemu je stanična kultura i dobila ime (Jordan i Sandig, 2015) (slika 3). Davne, 1962. g. Capstick i suradnici razvili su cjepivo protiv sliavke i šape u BHK-21 suspenzijskim stanicama za veterinarsku uporabu. Danas se BHK-21 stanice koriste u proizvodnji VIIa i VIII faktora zgrušavanja i vrlo su pogodne za uzgoj i istraživanje virusa (Butler i Spearman, 2014), no za sada niti jedno humano virusno cjepivo nije proizvedeno ovom staničnom linijom.



Slika 3. BHK-21 stanična linija (ATCC, 2020)

2.1.2.4. HEK-293

Trajna stanična linija bubrega ljudskog embrija, HEK-293 (eng. *Human embryonic kidney*) (slika 4), dobivena je 1977. g. transformacijom stanica virusnom DNA. Transformacija stanica provedena je fragmentima DNA adenovirusa tipa 5 "kalcijevom tehnikom" (Graham i sur., 1977). HEK-293 stanice lako rastu u suspenziji u mediju bez seruma i stanice su domaćini u proizvodnji nekih rekombinantnih proteina koji se koriste u terapiji hemofilije, dijabetesa tipa 2 i septičkog šoka (Dumont i sur., 2015).



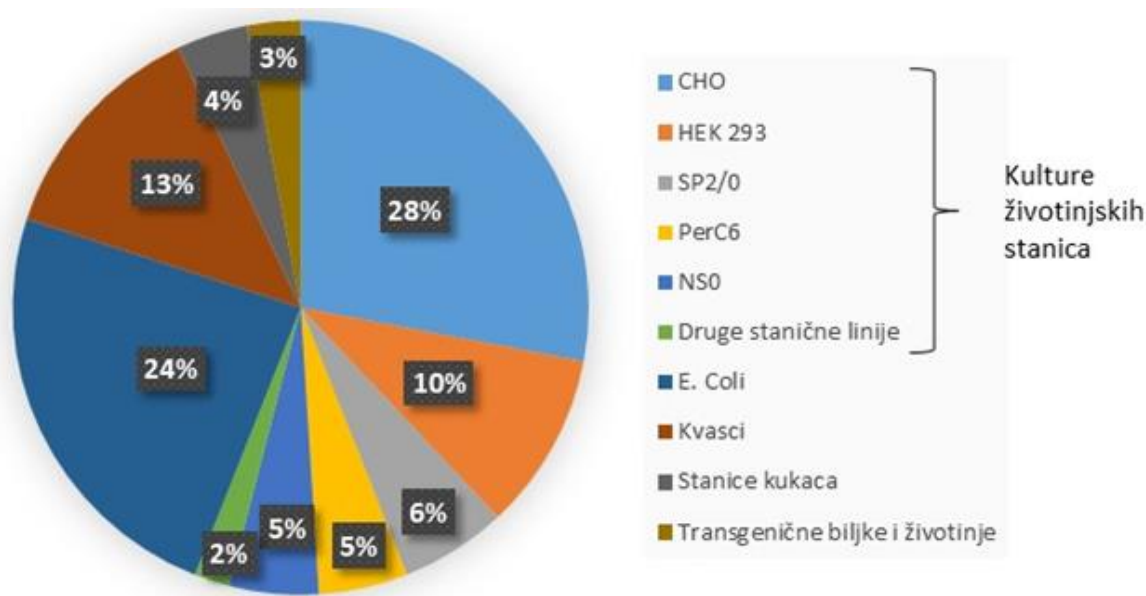
Slika 4. HEK-293 stanična linija (ATCC, 2020)

2.1.2.5. Hibridoma stanice

Hibridoma stanice su trajna stanična linija dobivena postupkom hibridizacije, odnosno fuzijom mijeloma stanica i B – limfocita slezene prethodno imunizirane životinje (najčešće miša). Karakteristika dobivenih hibridnih stanica je da su sposobne proizvesti protutijelo za određeni antigen te se beskonačno dijeliti u *in vitro* uvjetima. Upravo pomoću hibridoma stanica su proizvedena prva monoklonska protutijela. No, ovakve stanične linije često ne daju željene prinose proteina i rastu do umjerene stanične gustoće u bioreaktorima te se zbog toga hibridoma stanice uglavnom koriste za sintezu monoklonskih protutijela koja se koriste u istraživačke i analitičke svrhe (Zhang, 2010).

2.1.3. Prednosti i nedostaci životinjskih stanica u odnosu na druge ekspresijske sustave

Većina odobrenih biofarmaceutika proizvedena je u jednom od sljedeća tri ekspresijska sustava: bakterija *Escherichia coli*, kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* ili životinjskim stanicama. Osim toga, manji dio odobrenih biofarmaceutika proizvodi se pomoću stanične kulture biljaka i insekata, transgeničnim biljkama i životinjama i dr (slika 5). Odabir ekspresijskog sustava prije svega ovisi o tipu rekombinantnog proteina koji se želi proizvesti (Berlec i Štrukelj, 2013).



Slika 5. Ekspresijski sustavi za proizvodnju terapeutskih proteina (Radošević, 2020)

Danas su životinjske stanice najčešće korišteni ekspresijski sustavi za proizvodnju biofarmaceutika. Glavni razlog tomu je mogućnost sinteze velikih, kompleksnih proteina i provođenja posttranslacijskih modifikacija sličnih onima u ljudskim stanicama koje su ponekad preduvjet biološkoj aktivnosti rekombinantnog proteina. Posttranslacijske modifikacije glikozilacije su od najveće važnosti za mnoge rekombinante proteine, a bakterijske stanice ih nemaju mogućnost provoditi. Šećerni dio glikoproteina pokazao se iznimno važan za postizanje potrebne konformacije, funkcije, stabilnosti, poluživota proteina prilikom primjene u terapiji ljudi (Berlec i Štrukelj, 2013). Većina proteina biva izlučena u okolni medij i time je izbjegnuta potreba za lizom stanica, ekstrakcijom proteina i renaturacijom (što je slučaj s prokariotskim stanicama) (Dumont i sur., 2015). No, s ekonomske strane primjena životinjskih stanica nije poželjna obzirom da su koncentracije proizvoda u mediju često male, svega oko $1-2 \text{ g L}^{-1}$, a samim time mala količina proizvoda u mediju znatno poskupljuje cijenu "downstream" procesa, odnosno izolacije i pročišćivanja

proizvoda (Zhang, 2010). Prisutni su različiti problemi pri rastu životinjskih stanica u bioreaktoru poput osjetljivosti na sile smicanja (zbog nedostatka stanične stijenke) i promjene okolišnih uvjeta te zahtjev za kompleksnijim, pa samim time i skupljim hranjivim medijima za uzgoj životinjskih stanica. Također, kontaminacija kulture životinjskih stanica mikoplazmama i virusima, posebice kod primjene humanih stanica, predstavlja opasnost zbog mogućnosti prijenosa na ljude koji koriste tako proizvedene biofarmaceutike.

2.2. STANIČNI CIKLUS

Stanični ciklus ili ciklus stanične diobe (slika 6) je visoko regulirani proces koji se sastoji od niza vremenski odvojenih događaja u kojima se kromosomi i drugi stanični dijelovi udvostručuju i ravnomjerno raspoređuju na dvije stanice kćeri. Kod jednostaničnih organizama stanična dioba znači tvorbu cijelog novog organizma, a kod višestaničnih organizama, bezbrojne diobe početne stanice (zigote) rezultiraju tvorbom niza različitih vrsta stanica koje tvore tkiva i organe, a u konačnici i cijeli organizam. Također, dioba stanica kod odraslih organizama omogućuje zamjenu oštećenih stanica novim i zdravim stanicama (Morgan, 2007).

Stanični ciklus životinjskih stanica se dijeli na dvije faze: interfazu i mitozu. Interfaza je prvi dio staničnog ciklusa u kojem stanice provedu najviše vremena s ciljem udvostručenja staničnih komponenti što rezultira udvostručenjem veličine same stanice. Nakon interfaze slijedi proces mitoze, odnosno raspodjele udvostručenih staničnih komponenti u dvije stanice kćeri čime se završava proces stanične diobe (Morgan, 2007). Trajanje staničnog ciklusa varira od organizma do organizma, ali i o dijelu organizma iz kojega je stanica izolirana. Za životinjske i ljudske stanice ono je u prosjeku 24 h.

Znanstvenici nastoje utvrditi postoji li veza između specifične brzine nastajanja rekombinantnog proteina i faze staničnog ciklusa u kojem se stanica nalazi. Različiti znanstvenici su dobili različite rezultate svojih istraživanja. Prema nekim autorima sinteza rekombinantnih proteina vezana je uz G₁ fazu, prema nekima S ili G₂/M, a prema nekima je nevezana uz fazu staničnog ciklusa. No, različiti rezultati istraživanja nisu nužno krivi. Ispitivane su različite proizvodne linije i proizvodi pri različitim uvjetima proizvodnog procesa koji mogu dovesti do promjene u metabolizmu. No, povezivanje sinteze rekombinantnog proteina s fazom staničnog ciklusa može biti važno zbog optimizacije vođenja procesa proizvodnje (Lloyd i sur., 2000).

2.2.2. Mitoza

Mitoza ili M faza je druga velika faza staničnog ciklusa koja se sastoji iz dva, međusobno povezana značajna događaja: kariokineze (podijela jezgre) i citokineze (podijela stanice). Proces kariokineze obično se dijeli na četiri zasebne faze: profazu, metafazu, anafazu i telofazu.

U profazi dolazi do kondenzacije kromatina DNA u kromosome čime je onemogućena replikacija i transkripcija DNA, odnosno sinteza RNA molekula i proteina sve do kraja procesa mitoze. Svaki centrosom, iz para centrosoma, se kreće gibati prema svojem polu stanice i oko njih se počinju formirati niti diobenog vretena. Razgrađuje se jezgrina membrana i nestaje jezgra. Na centromerama kromosoma formiraju se kinetohore za koje se prihvaćaju niti diobenog vretena. U metafazi je mitotičko vreteno u potpunosti razvijeno, centrosomi su položeni na suprotnim polovima stanice i kromosomi su položeni u ekvatorilanoj ravnini. Tijekom anafaze dolazi do kidanja veze između parova kromatida i svaka kromatida (sada kromosom) iz para se počinje gibati prema svojem polu stanice. Stanica se izdužuje. U telofazi se kromosomi nalaze na polovima stanice i započinju se dekondezirati. Formira se jezgrina membrana i jezgra oko svakog seta kromosoma te se razgrađuju niti diobenog vretena. Nakon kariokineze slijedi citokineza u kojoj se stanica majka fizički dijeli na dvije stanice kćeri (Khan Academy, 2020).

2.2.3. Regulacija staničnog ciklusa

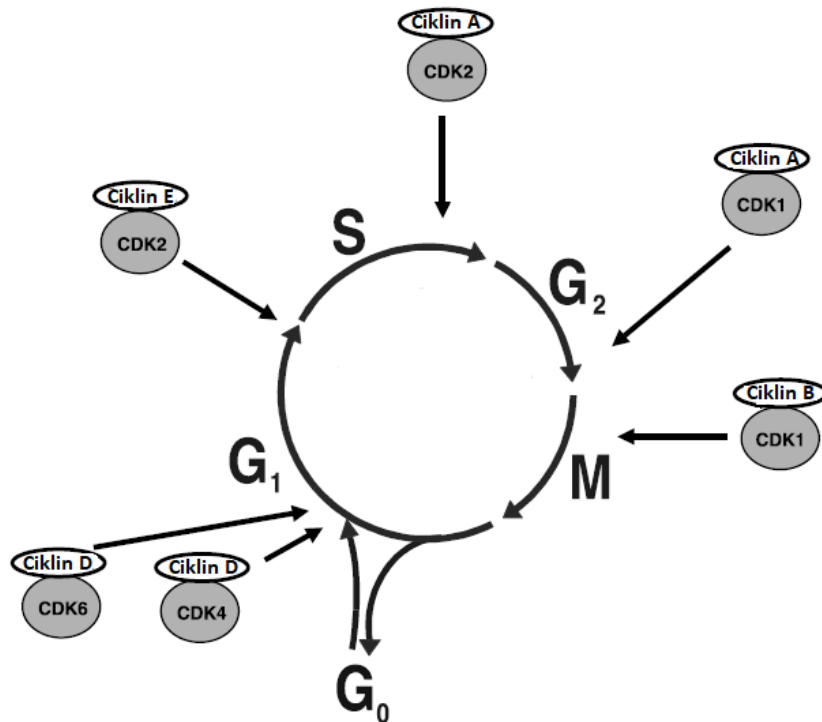
Stanični ciklus mora biti dobro reguliran proces kako se genetičke abnormalnosti (greške u replikaciji ili raspodjeli genetičkog materijala) ne bi prenijele na stanice kćeri. Zbog toga postoje mnoge razine i mehanizmi regulacije kojima se stanica osigurava da se greške ne prenesu na stanice potomke. Regulacija se provodi kroz kontrolne točke staničnog ciklusa, fosforilacijama, defosforilacijama, periodičnom sintezom i razgradnjom proteina uključenih u kontrolu staničnog ciklusa, inhibitorima, aktivatorima, kompartmenizacijom itd.

Stanični ciklus ima nekoliko kontrolnih točki, odnosno regulatornih puteva koji kontroliraju redoslijed i vrijeme prijelaza staničnog ciklusa iz jedne u drugu fazu. Kontrolne točke osiguravaju da se ključni događaji staničnog ciklusa dovrše s velikom preciznošću, poput replikacije DNA i segregacije kromosoma. U suprotnom, dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa kako bi se popravila oštećenja (transkripcijom gena za ispravak oštećenja) (Elledge, 1996). Postoje dva tipa signala koji će odrediti hoće li stanice ići u smjeru diobe ili zaustavljanja staničnog ciklusa. Dominantni proteini koji signaliziraju da je sve u redu i da

stanica može napredovati kroz stanični ciklus su ciklini, ciklin ovisne kinaze (CDK) te neke fosfataze. Drugi signali koji signaliziraju da nešto nije u redu (npr. DNA je oštećena), zaustavit će stanični ciklus i pokrenuti procese ispravljanja pogreški. Među negativnim regulatorima staničnog ciklusa ističu se najbolje proučeni proteini poput p53, p21 i dr.

2.2.3.1. Pozitivni regulatori

Ciklini i ciklin ovisne kinaze (CDK, eng. *Cyclin-dependent kinases*) su skupine proteina koji su pozitivni regulatori staničnog ciklusa. Različite CDK se aktiviraju uvijek na točno određenim točkama ciklusa. Pripadaju obitelji serin i treonin protein kinaza vrlo konzerviranih sekvenci. Posljedica njihove aktivacije je fosforilacija drugih proteina na CDK konsenzus sekvenci, odnosno pokretanje fosforilacijske kaskade koja bi trebala rezultirati prelaskom u sljedeću fazu staničnog ciklusa, te u konačnici i podijelom stanice (Vermeulen i sur., 2003). Osim u regulaciji staničnog ciklusa, CDK sudjeluju i u regulaciji transkripcije, popravku DNA, diferencijaciji i apoptozi (Johnson i Walker, 1999). Njihova koncentracija je stalna tijekom cijelog ciklusa (za razliku od njihovih aktivatora ciklina). U stanični ciklus uključeni su CDK4, CDK6, CDK2 i CDK1 (Vermeulen i sur., 2003). Za aktivaciju CDK potrebno je njihovo kompleksiranje s ciklinima. Svi ciklini sadrže zajedničku homolognu regiju tzv. "*cyclin box*" za vezanje na CDK. Njihova koncentracija oscilira tijekom određenih faza staničnog ciklusa (izuzev ciklina D čija je koncentracija regulirana prisutnošću određenih faktora rasta). Uvijek su prisutni u malim količinama, ali ovisno o fazi staničnog ciklusa u kojem se nalaze, njihova koncentracija raste i pada što uzrokuje periodičnu aktivaciju i inaktivaciju CDK. U protivnom bi se istovremeno odvijalo više faza staničnog ciklusa. Proteoliza ciklina potaknuta je vezanjem molekula ubikvitina na "*destruction box*" ili PEST sekvencu (Johnson i Walker, 1999). Svaka faza staničnog ciklusa ima svoje kombinacije CDK-ciklin kompleksa koje će voditi prema sljedećoj fazi. CDK4-ciklin D i CDK6-ciklin D omogućuju uzlazak u G₁ fazu. CDK2-ciklin E prijelaz iz G₁ u S fazu. CDK2-ciklin A kompleks omogućuje progresiju kroz S fazu, CDK1-ciklin A uzlaz iz G₁ u M fazu te CDK1-ciklin B regulaciju mitoze (Vermeulen i sur., 2003) (slika 7). Za aktivaciju kinazne aktivnosti CDK-ciklin kompleksa potrebna je također fosforilacija (ciklin-aktivirajućom kinazom) i defosforilacija (Cdc25 fosfataznom obitelji) određenih konzerviranih treoninskih i tirozinskih aminokiselinskih ostataka što dovodi do konformacijskih promjena koje omogućuju punu aktivnost ciklin-CDK kompleksa (Pucci sur., 2000). Dakle, potrebna je višestruka regulacija kako bi stanica bila sigurna može li se podijeliti.



Slika 7. Regulacija staničnog ciklusa ciklin-CDK kompleksima (Vermeueln i sur. 2003)

2.2.3.2. Negativni regulatori

Negativni regulatori zaustavljaju stanični ciklus i usmjeravaju stanicu prema rješavanju nastalog problema, odnosno prema programiranoj staničnoj smrti (apoptozu) ukoliko je problem za stanicu nerješiv. U negativne regulatore staničnog ciklusa ubrajaju se proteini inhibitori ciklin ovisnih kinaza (CKI) koji se vežu ili na samu CDK ili na CDK-ciklin kompleks. Njihova aktivnost regulirana je unutarstaničnim i izvanstaničnim signalima (npr. oštećenje DNA, oksidativni stres, osmotski šok itd.). Inhibitori ciklin ovisnih kinaza dijele se u dvije obitelji proteina: Cip/Kip i Ink4. Cip/Kip obitelj proteina čine p21, p27, p57 proteini koji dominantno inhibiraju prijelaz iz G₁ u S fazu, a p21 je uključen i u inhibiciju sinteze DNA (Pucci i sur., 2000). U Ink4 obitelj proteina ubrajaju se p15, p16, p18 i p19 proteini koji smanjuju afinitet vezanja ciklina na CDK4 i CDK6 (Morgan, 2007). Među najbolje proučenim proteinima koji dovode do zastoja staničnog ciklusa ili njezine smrti je p53 protein. U stanici se sintetizira konstitutivno, ali u malim količinama. Prisutnost negativnog signala, poput oštećenja DNA, dovest će do brze indukcije gena p53 proteina djelovanjem senzorskih protein kinaza koje prepoznaju oštećenje DNA. Kinaze fosforiliraju p53 i njegov Mdm2 inhibitor posljedica čega je oslobađanje p53 proteina koji će potaknuti autoprodukciju, transkripciju *p21*, *Bax*, ali i *Mdm2* gena. Protein p21 djeluje kao CKI i time uzrokuje stanične

zastoje, a u slučaju teških oštećenja DNA, doći će do nakupljanja Bax i drugih proteina uključenih u apoptotičko signaliziranje (Vermeulen i sur., 2003).

2.2.3.3. Kontrolne točke

Dijeljenjem stanice trebale bi se dobiti stanice kćeri koje su precizne kopije svoje stanice majke. Kako bi se spriječila podijela oštećene stanice, prisutni su unutarnji kontrolni sustavi koji se dijele u tri osnovne kontrolne točke: G₁/S, G₂/M i metafazna točka (Khan Academy, 2020). Tijekom različitih kontrolnih točki stanica provjerava različite uvjete kao što je npr. odnos veličine citoplazme i jezgre, prisutnost proteina potrebnih za stanični rast i dijeljenje, broj kromosoma i njihov raspored, oštećenja DNA itd.

Na kraju G₁ faze i prije ulaza u S fazu, stanica nailazi na prvu kontrolnu točku (G₁/S), tzv. restriksijsku točku gdje objedinjuje mitogene signale i inhibitore rasta te prema tome odlučuje nastaviti sa staničnim ciklusom ili ga završiti, odnosno ući u fazu smanjenje metaboličke aktivnosti, G₀ fazu, sve dok se ne pojave povoljni uvjeti za staničnu diobu čime će stanica prijeći iz G₀ u S fazu. Provjerava se jesu li prisutni svi potrebni proteini i enzimi za replikaciju DNA. Restriksijska točka je ujedno tzv. nepovratna točka u kojoj se stanica obvezuje na izvršenje staničnog ciklusa jednom kada uđe u S fazu ili na smrt stanice ukoliko nije bila u mogućnosti dovršiti stanični ciklus (Johnson i Walker, 1999).

G₂/M kontrolna točka primarno provjerava je li replikacija DNA ispravno provedena, jesu li prisutne mutacije i druga oštećenja DNA. Osim toga, provjerava veličinu stanice i prisutnost zaliha proteina, energije i drugih staničnih molekula potrebnih za podjelu stanice (Khan Academy, 2020).

U metafazi mitoze odvija se tzv. kontrolna točka diobenog vretena gdje se prije podijele stanice provjerava ispravnost položaja kromosoma u ekvatorijalnoj ravnini, raspored mikrotubula i eventualni defekti u vezanju mikrotubula s kromosomima. Kada navedeni događaji ne bi bili u redu, jedna stanica bi dobila više, a druga stanica manje kromosoma (Vermeulen i sur., 2003).

2.3. STANIČNA SMRT

Stanična smrt jedan je od neželjenih procesa s kojima se susreću procesni biotehnolozi prilikom primjene staničnih linija u proizvodnji biofarmaceutika. Stanična smrt utječe na dugovječnost i vijabilnost stanične kulture i potencijalno na kvalitetu proizvoda. U biotehnološkom proizvodnom procesu stanična smrt može biti potaknuta okolišnim stresom u bioreктору poput nedostatka hranjivih tvari, akumulacije nusproizvoda, prisutnosti toksičnih kemijskih tvari, promjenom temperature i pH i dr. Navedeni okolišni stresovi signalnim kaskadama aktiviraju niz molekula čija aktivnost u konačnici dovodi do smrti stanice (Krampe i Al-Rubeai, 2010). Razumijevanje tih stresnih čimbenika i razvoj strategija kako ih izbjeći bitno je kod biotehnološke proizvodnje biofarmaceutika. Tri su glavne vrste stanične smrti uglavnom prisutne i opisane kod proizvodnih staničnih linija: apoptoza, autofagija i nekroza. Apoptoza se smatra najznačajnijom vrstom stanične smrti staničnih linija te čini preko 80 % smrti CHO stanica (Grilo i Mantalaris, 2019). Glavna razlika među navedenim oblicima stanične smrti je to što su apoptoza i autofagija tipovi programirane stanične smrti, odnosno aktivni, vrlo koordinirani i genetički kontrolirani procesi stanične smrti, dok se nekroza opisuje kao nekontrolirana, iznenadna i pasivna vrsta stanične smrti (Mohan i sur., 2009). Kod apoptoze i autofagije proces se odvija uz minimalnu štetu za okolne stanice ili tkivo, dok kod nekroze dolazi do curenja staničnog sadržaja u izvanstanični prostor pri čemu ono može izazvati upalne procese (D'Arcy, 2019).

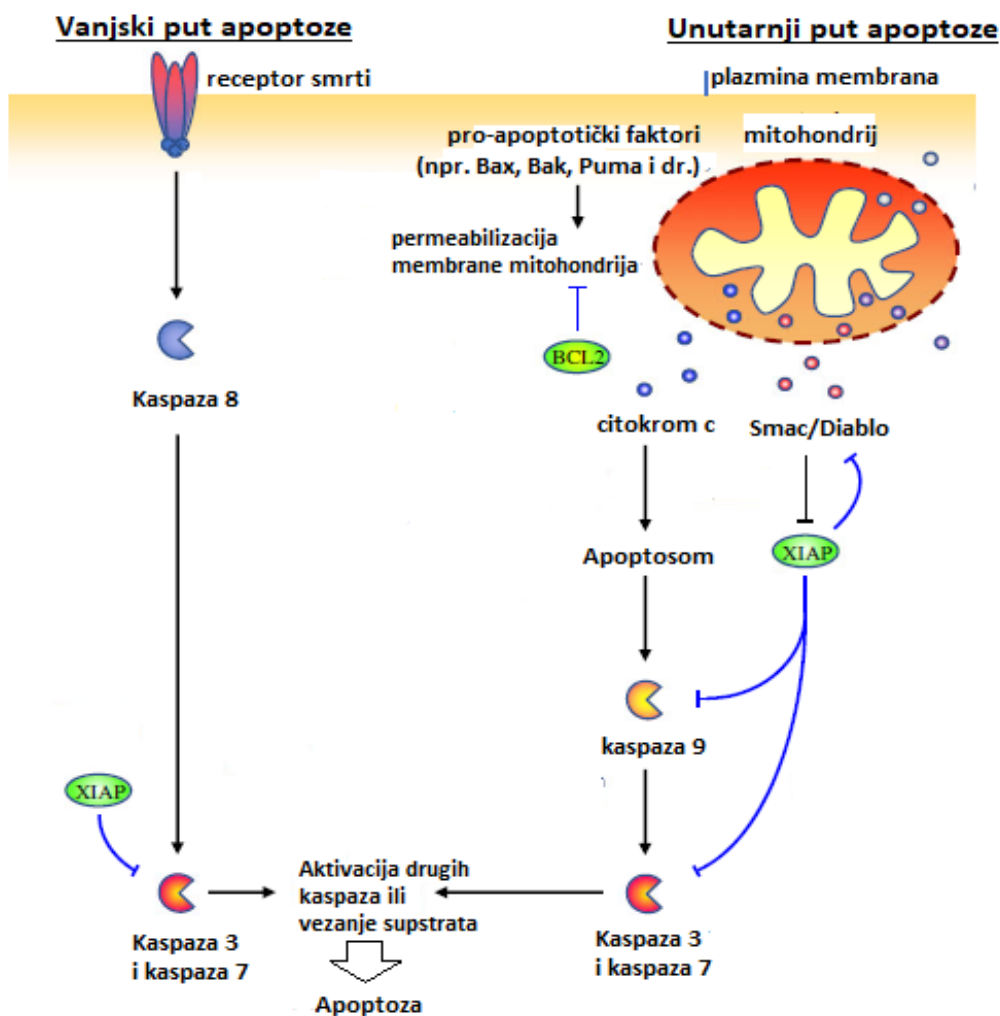
2.3.1. Apoptoza

Apoptotičku smrt su identificirali i imenovali John Kerr i njegovi suradnici 1972. godine (Krampe i Al-Rubeai, 2010) i visoko je konzervirani proces među višestaničnim organizmima (D'Arcy, 2019). Tijekom apoptoze stanica prestaje rasti i dijeliti se te umjesto toga ulazi u proces programirane stanične smrti što znači da odumiranje stanice nije slučajne prirode, nego prati niz kontroliranih koraka koji vode prema samouništanju stanice (Mohan i sur., 2009). Taj energetska zahtjevan proces može biti pokrenut unutarnjim i/ili vanjskim čimbenicima koji aktiviraju različite kaskade staničnog signaliziranja (Krampe i Al-Rubeai, 2010).

Dvije najvažnije grupe proteina uključenih u apoptozu su: kaspaze i Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) obitelj. Kaspaze su cistein endoproteaze koje kataliziraju hidrolizu peptidne veze. Većina kaspaza se sintetizira kao monomer sa malo ili bez aktivnosti, tzv. pro-kaspaza koja najčešće podliježe proteolizi i homodimerizaciji s drugom pro-kaspazom nakon kaskadne

aktivacije djelovanjem drugih aktivnih kaspaza (Donepudi i Grütter, 2002). Otkriveno je četrnaest kaspaza u ljudskim i mišjim stanicama te još četiri u drugim tipovima životinjskih stanica. Funkcionalno su klasificirane u tri razreda: kaspaze inicijatori (kaspaze 8 i 9), kaspaze izvršitelji (kaspaze 3, 6 i 7) i kaspaze uključene u upalni odgovor (kaspaze 1, 4, 5, 11 i 12L). Kaspaza 2, 10, 12S i 14 nisu klasificirane (Grilo i Mantalaris, 2019). Jednom kada je prisutno oštećenje stanice, kaspaze inicijatori se aktiviraju iz inaktivnih pro-kaspaza i aktiviraju druge kaspaze izvršitelje (D'Arcy, 2019). Proteini Bcl-2 obitelji su uključeni u regulaciju apoptoze sa pro- i anti-apoptotičkom aktivnosti i prema tome se dijele u tri grupe. Anti-apoptotička grupa sastoji se od Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl2A1 i Bcl-B proteina. Navedeni proteini imaju četiri konzervirane Bcl-2 homologne domene (BH1, BH2, BH3 i BH4). Svima, osim Bcl2A1, je zajedničko da sadrže transmembransku domenu i u skladu s time vezane su uz staničnu, jezgrinu ili mitohondrijsku membranu. Drugu grupu obitelji Bcl-2 proteina čine pro-apoptotički proteini Bax, Bak i Bok koje karakterizira nedostatak BH4 domene. Treća pro-apoptotička grupa sadrži samo BH3 domenu i čine ju Bik, Hrk, Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa i Bmf (Grilo i Mantalaris, 2019).

Ovisno o tome pokreću li apoptozu vanjski ili unutarnji čimbenici, razlikuju se dva glavna puta apoptoze: unutarnji put ili mitohondrijski put i vanjski put ili put receptora smrti (slika 8). Istraživanja na CHO stanicama pokazuju da je kod te proizvode stanične linije dominantan unutarnji put apoptoze u kulturi stanica što može biti direktno povezano s uvjetima u bioreaktoru kao što su nedostatak hranjivih tvari, prekomjerna proizvodnja proteina, oscilacije pH i temperature, visok osmotski tlak i dr (Grilo i Mantalaris, 2019).



Slika 8. Mehanizam vanjskog i unutarnjeg puta apoptoze (Tang i Tang, 2018)

Unutarnji put potaknut je od same stanice kada detektira oštećenje pomoću brojnih unutarstaničnih signala. Ovaj put poznat je i kao mitohondrijski put apoptoze (D'Arcy, 2019). Unutarstanični stresovi koji ga pokreću mogu biti oštećenje DNA, zaustavljeni stanični ciklus, nedostatak hranjivih tvari, hormona, faktora rasta, hipoksija i dr. (Baek i sur., 2015). Početak i razvoj tog signalnog put apoptoze ovisan je o ravnoteži između pro- i anti-apoptotičkih članova Bcl-2 obitelji proteina. U normalnim uvjetima dolazi do stvaranja heterodimera anti-apoptotičkih proteina (Bcl-2, Bcl-xL i Mcl-1) s proteinima pro-apoptotičke skupine (Bax i Bak) smještenih na mitohondrijskoj membrani i time se blokira permeabilizacija membrane mitohondrija i sprječava apoptoza. No, u stresnim uvjetima, doći će do ekspresije proteina Bcl-2 obitelji koji sadrže samo BH3 domenu (Bid, Bim, Bad, Noxa i Puma). Ti pro-apoptotički proteini se vežu na anti-apoptotične faktore i oslobađaju Bax i Bak proteine (Xiong i sur., 2014). Slobodni Bax i Bak oligomeriziraju na vanjskoj membrani mitohondrija i stvaraju velike transmembranske pore koje permeabiliziraju membranu i otpuštaju pro-

apoptotičke signalne molekule u citosol (citokrom c, Smac/Diablo i HrtA2/Omi). Smac/Diablo i HrtA2/Omi indirektno pomažu u pokretanju apoptoze inhibicijom inhibitora apoptotičkih proteina (IAP). Iako, bez oslobađanja citokroma c, inhibicija IAP ne bi bila dovoljna za pokretanje procesa apoptoze (D'Arcy, 2019). Citokrom c u citoplazmi potiče apoptozu vezanjem na Apaf1 protein (eng. *Apoptotic protease activating factor 1*). Inaktivni Apaf1 vezan je s ADP i dADP. Vezanje s citokromom c dovodi do zamjene ADP/dADP s ATP/dATP i aktivacije Apaf1 (Xiong i sur., 2014). Ovo vezanje uzrokuje konformacijsku promjenu na Apaf1 čime dolazi do izlaganja određenih domena koje omogućuju vezanje nekoliko Apaf1 molekula u kompleks zvan apoptosom. Apoptosom u svojem centru sadrži nekoliko slobodnih domena za vezanje i cijepanje inicijatorske pro-kaspaze 9. Tako aktivirana kaspaza 9 aktivira kaspazu 3 i kaspazu 7 (D'Arcy, 2019). Kaspaza 3 zatim aktivira DNAaze koje će pocijepati kromosomsku DNA, uzrokuje degradaciju citoskeleta i dovodi do stvaranja apoptotičkih tijela (Grilo i Mantalaris, 2019). Započinju se uočavati karakteristične morfološke promjene apoptotičkih stanica.

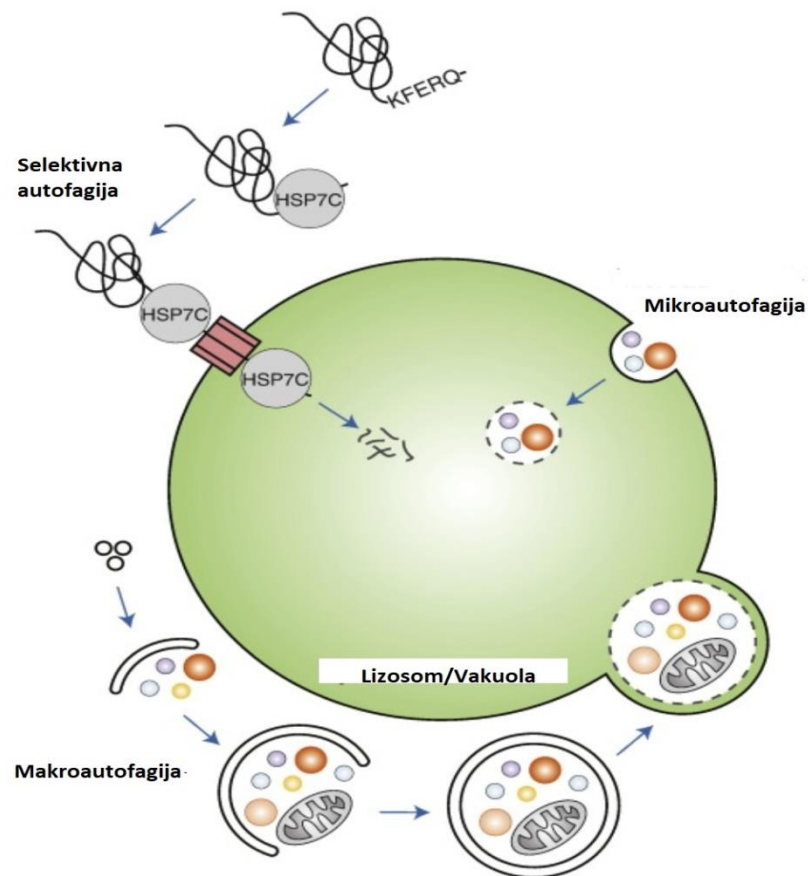
Vanjski put apoptoze poznat je i kao put receptora smrti i započinje izvan stanice aktivacijom pro-apoptotičkih receptora (receptora smrti) na površini stanice vezanjem specifičnih pro-apoptotičkih liganada (Mohan i sur., 2009) tzv. "signalnih proteina smrti" koje proizvode makrofagi ili prirodne stanice ubojice (D'Arcy, 2019). Receptori smrti pripadaju skupini tumor – nekrotizirajućih faktora (TNF) koji sa unutarstanične strane sadrže domenu smrti koja u stanici pokreće apoptozu aktivacijom kaspaza. Postoji nekoliko tipova receptora smrti pri čemu svaki ima svoj odgovarajući ligand čijim vezanjem nastaje receptor – ligand kompleks kao npr. FasL/FasR, TNF/TNF R1, Apo2L/DR4, Apo2L/TRAIL itd. Vezanje Fas liganda na odgovarajući receptor uzrokuje vezanje domene smrti receptora na adaptor protein FADD (eng. *Fad associated death domain*), a vezanje TNF- α na TNF receptor uzrokuje vezanje na adaptor protein TRADD (eng. *TNFR associated death domain*). Adaptor protein se zatim povezuje sa monomernom pro-kaspazom 8 čime nastaje kompleks zvan DISC (eng. *Death-inducing signaling complex*). Pomoću DISC kompleksa dolazi do aktivacije pro-kaspaze 8. Nastala kaspaza 8 može inducirati Bid protein čime se, s vanjskim signalom, aktivira unutarnji put apoptoze ili može aktivirati izvršne kaspaze 3 i 7 čime vanjski put apoptoze završava jednako kao i unutarnji put (Kiraz i sur., 2016). Koji signalni put će se odvijati ovisi prije svega o tipu stanice. Kod tzv. stanica tipa I, kaspaza 8 se veže na izvršne kaspaze i direktno pokreće apoptozu. Kod stanica tipa II, inhibitor apoptotičkih proteina (IAP) inhibira direktnu aktivaciju izvršne kaspaze s kaspazom 8 sve dok IAP ne bude inhibiran

proteinima oslobođenima iz mitohondrija (D'Arcy, 2019), odnosno dok se ne pokrenu oba signalna puta apoptoze.

Apoptoza se uobičajeno smatrala ireverzibilnim procesom. No, nova istraživanja pokazuju da pod određenim uvjetima i uklanjanjem apoptotičkih čimbenika, stanice mogu napustiti proces stanične smrti i oporaviti se pa čak i u kasnijim fazama apoptoze. Predloženo ime oporavka stanice je "Anastasis" što u prijevodu s grčkog znači "uzdizanje u život" (Tang i Tang, 2018).

2.3.2. Autofagija

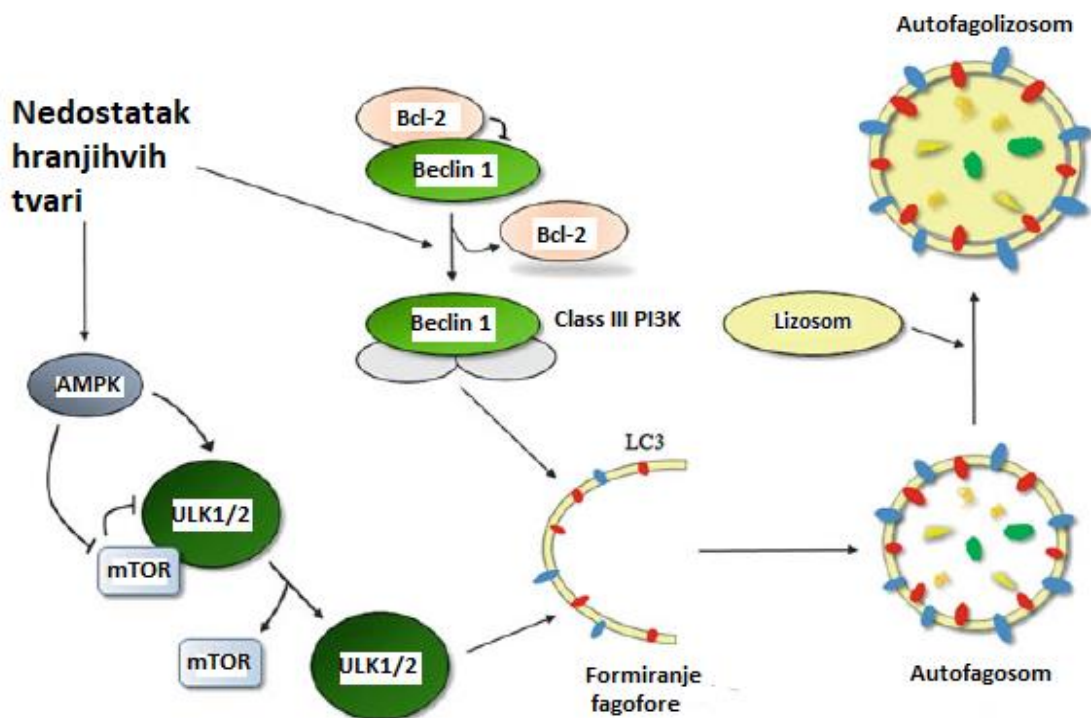
Autofagija je prvenstveno metabolički proces pomoću kojeg stanice razgrađuju i recikliraju stanične komponente. Sama riječ potječe od grčke riječi auto (samo) i phagein (jedenje) što u prijevodu znači "jesti samoga sebe". Autofagija se također smatra programiranom staničnom smrću tip II. Nekad se smatrala isključivo mehanizmom za preživljavanje, budući se njome uklanjaju dugoživući citoplazmatski organeli čijom bi se reciklacijom dobili supstrati za biosintezu novih makromolekula i organela ili bi se dalje procesirali i koristili kao izvor energije. No, pokazala se i kao mehanizam stanične smrti u kojem može doći do destrukcije stanice uslijed dugotrajnog stresa (Grilo i Mantalaris, 2019). Može biti inducirana različitim stresovima poput hipoksije, djelovanja kisikovih radikala, oštećenja DNA, ali najčešće uslijed potrošnje hranjivih tvari (glukoze i glutamina kao glavnih izvora energije i aminokiselina). Autofagiju karakterizira pojava citosolnih membranskih mjehurića koji okružuju makromolekule, mitohondrije, endoplazmatski retikulum, ribosome ili Golgi aparat. Ti stanični dijelovi zatim postaju dostupni lizosomima koji ih svojim enzimima digestiraju. Tri su tipa autofagije opisana i prisutna kod eukariota: makroautofagija, mikroautofagija i selektivna autofagija (D'Arcy, 2019) (slika 9).



Slika 9. Makroautofagija, mikroautofagija, selektivna autofagija (Papinski i Kraft, 2016)

Makroautofagija je najbolje opisana vrsta autofagije gdje u području oko staničnih dijelova koje treba ukloniti nastaje izolirana dvostruka membrana tzv. fagofora. Fagofora s vremenom raste i okružuje stanične dijelove čime nastaje autofagosom. Autofagosom fuzira s lizosomom stanice i nastaje autofagolizosom u čijoj unutrašnjosti dolazi do razgradnje staničnih sastojaka djelovanjem hidrolitičkih enzima, a dobiveni produkti se oslobađaju u citosol (Grilo i Mantalaris, 2019). Najznačajniji okidač makroautofagije je nedostatak hranjivih tvari i u tim uvjetima dolazi do aktivacije AMPK (eng. *AMP-activated protein kinase*) koja fosforilira ULK kompleks čime se on disocira sa mTORC1 kompleksa (eng. *Mammalian target of rapamycin 1*). mTORC1 kompleks je inhibitor autofagije u uvjetima bogatim na hranjivim tvarima. Disocijacijom sa mTORC1 kompleksa, ULK kompleks sudjeluje u stvaranju fagofore. Za stvaranje fagofore ključan je još jedan kompleks, tzv. fosfatidilinozitol 3-kinaza klase III (eng. *Class III PI3K*), a ključni protein PI3K kompleksa, Beclin-1, zaslužan je za dozrijevanje fagofore. Beclin-1 je usko povezan sa anti-apoptotičkim proteinom Bcl-2. U uvjetima dostatnim hranjivim tvarima, Bcl-2 se veže na Beclin-1 i inhibira indukciju autofagije. No, u uvjetima siromašnim hranjivim tvarima, Beclin-1 disocira s Bcl-2 i potiče

autofagiju. U elongaciji i dozrijevanju fagofore u autofagosom sudjeluje niz Atg (eng. *Autophagy related*) proteina. Također, važan protein koji sudjeluje u stvaranju autofagosoma je LC3 (eng. *Light chain 3*) protein. LC3 se veže na rastuću fagoforu te zaostaje na membrani nastalog autofagosoma i služi u prepoznavanju autofagosoma sa lizosomom čime dolazi do njihove fuzije i konačne hidrolize staničnih sastojaka (Baek i sur., 2015) (slika 10).



Slika 10. Mehanizam makroautofagije (Baek i sur., 2015). AMPK eng. *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*, Bcl-2 eng. *B-cell lymphoma 2*, LC3 eng. *Light chain 3*, mTOR eng. *Mammalian target of rapamycin complex*, PI3K eng. *Phosphatidylinositol 3-kinase*, ULK eng. *Unc-51-like kinase*

Za razliku od makroautofagije, kod mikroautofagije se stanični dijelovi koje treba ukloniti direktno vežu na površinu lizosoma čime dolazi do invaginacije membrane lizosoma i zatvaranja sadržaja unutar lizosoma (slika 9). Nakon hidrolize, dobiveni produkti se otpuštaju nazad u citosol (Yang i Klionsky, 2009). Mikroautofagija može biti pokrenuta signalnim molekulama prisutnim na površini oštećenih organela (mitohondrija, peroksisoma) (D'Arcy, 2019).

Treći tip autofagije je selektivna autofagija ili autofagija posredovana šaperonima. Selektivna autofagija je put proteolize lizosomima koji je odgovoran za degradaciju više od 30 % citosolnih proteina u uvjetima produljenog gladovanja stanica, no može biti aktivirana i

oksidativnim stresom ili uklanjanjem seruma. Šaperoni prisutni u citosolu i lumenu lizosoma pokreću ovaj proteolitički put. Šaperoni u citosolu razmotavaju strukturu proteina kako bi se on mogao translocirati kroz membranu lizosoma (slika 9), a za šaperone iz lumena lizosoma se smatra kako pomažu taj prijelaz proteina u lumen lizosoma. Konstitutivno eksprimirani oblik proteina toplinskog šoka (*HSP*) veličine 70 kDa tzv. hsc70 je citosolni šaperon koji zajedno sa svojim košaperonima (hip, hop, hsp40, hsp90 i bag-1) prepoznaje regiju za vezanje na supstratni protein i veže se na njega. Nastali kompleks se veže na receptor na citosolnoj strani membrane lizosoma tzv. LAMP-2A (eng. *Lysosome-associated membrane protein type 2A*) koji uz pomoć hsc70 šaperona lumena prebacuje razmotani protein u unutrašnjost lizosoma gdje ga hidrolitički enzimi lizosoma razgrade (Dice, 2007).

2.3.3. Nekroza

Nekroza je oblik nekontrolirane stanične smrti koja je potaknuta iznenadnim i jakim stresom poput izlaganja visokoj koncentraciji toksina, velikim promjenama pH ili temperature, radijaciji, hipoksiji i drugim ekstremnim uvjetima. Takvi uvjeti uzrokuju jaka oštećenja stanica i one nemaju vremena prilagoditi se na njih i "suočiti se" s tim problemom (Mohan i sur., 2009). Obično dolazi do bubrenja stanice, pucanja stanične membrane i curenja staničnog sadržaja u okolinu. Oslobođeni stanični enzimi i druge molekule narušavaju homeostazu i integritet okolnih stanica što uzrokuje upalu i oštećenje okolnih stanica i/ili tkiva. Za razliku od programiranog tipa stanične smrti, nekroza je energetski neovisna (pasivna) vrsta smrti.

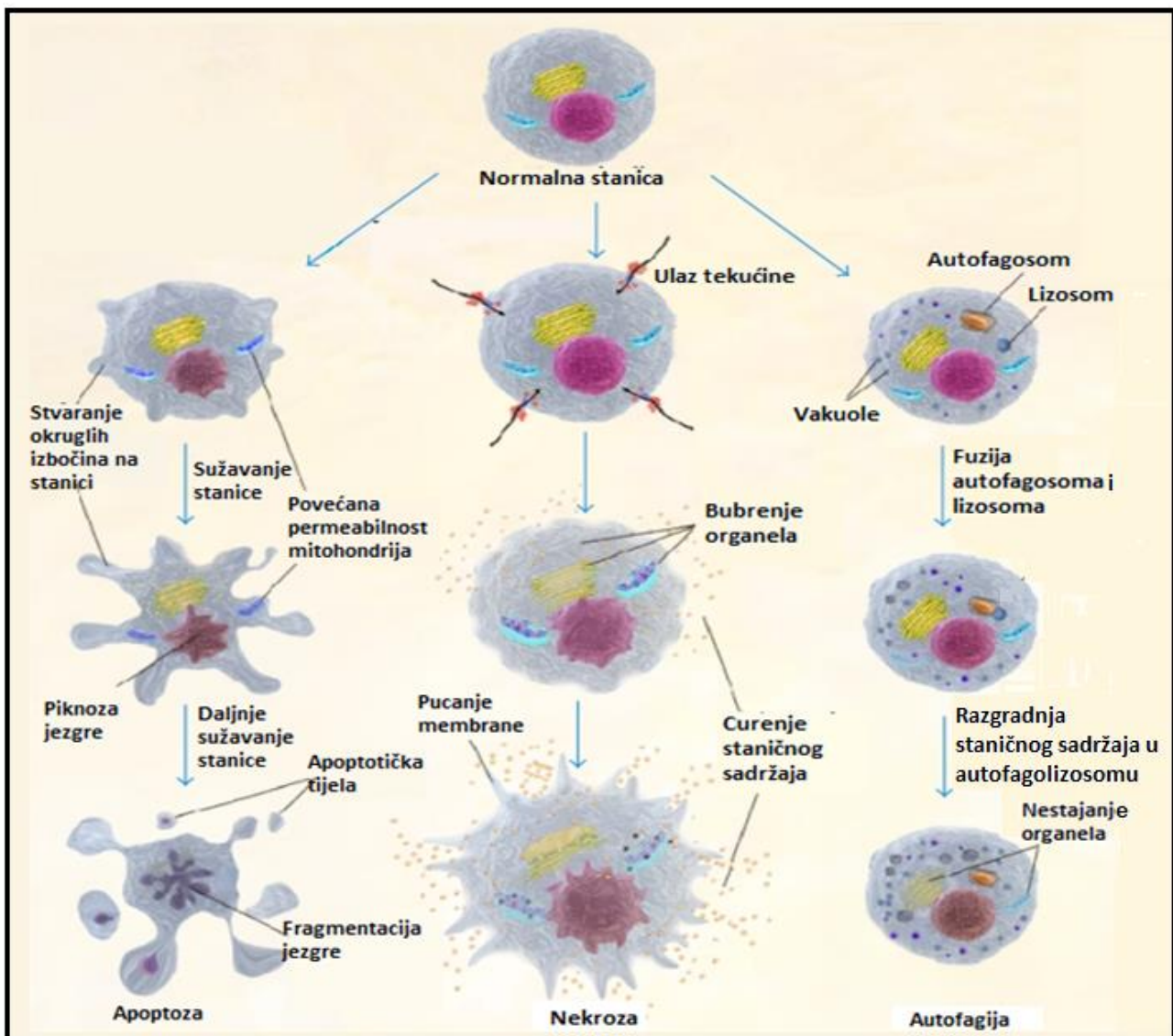
2.3.4. Morfološke promjene pri različitim oblicima stanične smrti

Tijekom apoptotičkog procesa stanične smrti obično je potrebno nekoliko sati od početka tog tipa smrti stanice do njene konačne fragmentacije. No, vrijeme ovisi o vrsti same stanice, vrsti stresa koji je izazvao apoptozu i apoptotičkom putu smrti. Ubrzo nakon početka apoptoze, stanice gube kontakt sa susjednim stanicama. U jezgri apoptotičkih stanica dolazi do karakteristične kondenzacije kromatina periferno uokolo jezgrine membrane formirajući polumjesečasti oblik ili oblik prstena (slika 11). To stvaranje zbijene mase kromatina poznato je kao piknoza jezgre (Ziegler i Groscurth, 2004). Piknoza je praćena intenzivnom fragmentacijom DNA u oligomere veličine oko 180 pb (Mohan i sur., 2009). Tijekom sljedećih faza apoptoze, dolazi do pucanja jezgre unutar stanice sa cjelovitom staničnom membranom (karioreksija). Citoplazma počinje kondenzirati i stanica se smežura. Stanične organele ostaju cjelovite. Mitohondrij se tijekom apoptoze permeabilizira, no to se uočava tek

u kasnim fazama apoptoze kada bubri i proširuje se kao i sve druge organele. Na plazminoj membrani koja je na početku apoptoze bila vrlo očuvana, dolazi do nestajanja mikrovila i do stvaranja brojnih okruglih izbočina na njezinoj površini. Te izbočine se odvajaju s površine stanice tvoreći apoptotička tjelešca, odnosno membranom okružene, citoplazmatske strukture koje u svojoj unutrašnjosti sadrže gusto pakirane stanične organele i jezgrine fragmente. U *in vivo* uvjetima ta apoptotička tjelešca s vremenom budu razgrađena od strane makrofaga. Zato apoptoza *in vivo* ne uzrokuje upalu okolnog tkiva upravo zbog zadržavanja staničnih sastojaka unutar apoptotičkih tijela (Ziegler i Groscurth, 2004). No, u *in vitro* uvjetima, kakvi su u bioreaktoru, nisu prisutni makrofazi i dolazi do raspadanja apoptotičkog tjelešca i oslobađanja njegovog sadržaja. Stoga u završnoj fazi uzgoja stanične kulture obično dolazi do nakupljanja staničnih fragmenata, ostataka kasnih apoptotičkih stanica i apoptotičkih tjelešaca koja su izgubila integritet te se može krivo zaključiti da su te stanice umrle procesom nekroze, a ne apoptoze (D'Arcy, 2019).

Autofagija je karakterizirana pojavom povećanog broja dvostrukih ili multimembranskih, citosolnih mjehurića koji okružuju citoplazmatske organele kao što su mitohondriji, endoplazmatski retikulum i ribosomi čime nastaju autofagosomi veličine promjera oko 300-900 nm (Yang i Klionsky, 2009). Autofagosomi fuziraju sa lizosomom i s vremenom budu, zajedno sa svojim staničnim sadržajem, razgrađeni u lumenu lizosoma. Tijekom autofagije nema značajnih promjena u jezgri stanice (slika 11). Može doći do parcijalne kondenzacije kromatina i ponekad piknoze jezgre. Jezgra ostaje čitava do kasnih faza tog tipa stanične smrti. Fragmentacija stanice se ne uočava (Mohan i sur., 2009).

Morfologija stanica koje odumiru procesom nekroze znatno je drugačija u odnosu na druge oblike stanične smrti. Rano tijekom tog procesa stanične smrti dolazi do bubrenja stanice uslijed nemogućnosti održavanja ravnoteže tekućine i iona (slika 11). Nakon nekog vremena dolazi do permeabilizacije plazmine membrane, a time i do postepenog curenja staničnog sadržaja u okolinu što izaziva upalu okolnog tkiva djelovanjem oslobođenih enzima i drugih molekula. U jezgri i citoplazmi dolazi do nepovratnih promjena. U jezgri se odvija intenzivna hidroliza DNA. Može doći do kondenzacije kromatina (Rello i sur., 2005), no piknotična i fragmentirana jezgra nije uobičajena pojava kod nekrotičnih stanica (Ziegler i Groscurth, 2004). Stanične organele u citoplazmi bubre i oštećuju se. U konačnici stanica bude lizirana te dolazi do istovremene smrti većeg broja stanica, za razliku od broja stanica koje umru procesom apoptoze.



Slika 11. Morfološke promjene stanice pri različitim oblicima stanične smrti (Nunes i sur., 2014)

2.4. OPTIMIRANJE BIOPROCESA PROIZVODNJE BIOFARMACEUTIKA

Industrijska proizvodnja biofarmaceutika primjenom životinjskih stanica započela je u drugoj polovici 20. stoljeća i od tada pa do danas su ostvareni značajni napredci u bioprocima sa ciljem postizanja veće produktivnosti procesa i dobivanja većih količina konačnog proizvoda. Višedesetljetni napori za zadovoljavanjem stalno rastućih potreba za biofarmaceuticima i ostvarenjem veće ekonomske dobiti rezultirali su preko 100 puta većim koncentracijama proizvoda u bioprocima koji primjenjuju CHO stanice (Baek i sur., 2015). Takvo povećanje koncentracije proizvoda primarno je ostvareno razvojem kontinuiranih staničnih linija i kemijski definiranih medija za uzgoj stanica, uzgojem stanica u suspenziji te optimizacijom pritoka supstrata. Alternativni načini povećanja prinosa proizvoda postignuti

su genetičkim inženjerstvom stanica domaćina, odnosno prekomjernom ekspresijom i/ili supresijom određenih gena kako bi se postigli željeni fenotipovi. Neki od staničnih procesa na koje se nastojalo djelovati genetičkim inženjerstvom jesu metabolizam izvora ugljika, stanični ciklus i smrt stanice s ciljem postizanja učinkovitijeg iskorištavanja izvora ugljika, dvofaznog procesa proizvodnje ili odgode stanične smrti što bi trebalo rezultirati većom dugovječnosti stanica, većom staničnom gustoćom u bioreaktoru te u konačnici većim prinosom proizvoda (Lim i sur., 2010). No, osim manipulacije genima, koriste se i druge metode kontrole staničnog metabolizma, staničnog ciklusa i smrti stanice kao što su npr. primjena temperaturnih promjena i kemijskih reagensa, odabir odgovarajućih izvora ugljika i dušika u mediju za uzgoj i dr.

2.4.1. Kontrola staničnog ciklusa

U namjeri za što uspješnijim industrijskim procesima proizvodnje biofarmaceutika sa životinjskim stanicama, znanstvenici su pokušali utvrditi vezu između faze staničnog ciklusa i ekspresije rekombinantnog gena kako bi u skladu s dobivenim rezultatima mogli bolje razumjeti dinamiku sinteze rekombinantnog proteina te optimirati medij za uzgoj i okolišne uvjete u bioreaktoru. No, literatura u tom području je nedosljedna. Pokazalo se da je prema različitim znanstvenicima sinteza rekombinantnog proteina vezana uz različite faze staničnog ciklusa ili da uopće nije vezana za određenu fazu staničnog ciklusa. Pretpostavlja se da je takva različitost rezultata posljedica razlika u uvjetima provođenja eksperimenta kao npr. o vrsti korištene stanične linije, rekombinantnog proteina, ekspresijskog konstrukta, upotrebljenog promotora, stanju inokuluma, sastavu medija za uzgoj i dr (Lloyd i sur., 1999). Također, prema jednom istraživanju Al-Rubeaia i suradnika (2000. g.) na četiri različite komercijalno bitne rekombinantne stanične linije u kojem su ispitivali ovisnost između veličine stanice, faze staničnog ciklusa i specifične produktivnosti rekombinantnog proteina pokazalo se da sinteza proizvoda nije striktno vezana niti za jednu fazu staničnog ciklusa te da veličina stanice ima primarni utjecaj na produktivnost ispitivanih staničnih linija, a faza staničnog ciklusa ima tek sekundarni utjecaj kojeg objašnjavaju činjenicom da veličina stanice raste napredovanjem kroz stanični ciklus pa su u skladu s time najproduktivnije stanice u G₂/M fazi (Lloyd i sur., 2000). Ipak, najčešće se, u biotehnološkim procesima proizvodnje biofarmaceutika primjenom kulture životinjskih stanica, provodi dvofazni proces sa zastojem staničnog ciklusa CHO stanica u G₁ fazi jer se smatra da je zastoj u toj fazi pogodan zbog veće metaboličke aktivnosti stanica, aktivne ekspresije mnogih gena vezanih za biogenezu ribosoma, translaciju proteina i dr (Baek i sur., 2015).

Dvofaznim šaržnim procesom se želi spriječiti nekontrolirana proliferacija stanica iznad određene stanične gustoće jer bi to vodilo prema prekomjernom trošenju hranjivih tvari i nakupljanju toksičnih metabolita, a moguće i prema staničnoj smrti i degradaciji proizvoda. S kontrolom proliferacije se obično započinje sredinom ili u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta stanica. Regulacija proliferacije se može postići zaustavljanjem staničnog ciklusa u onoj fazi u kojoj su stanice najaktivnije i daju najveće prinose proizvoda. Neke od metoda kojima se postiže zastoj staničnog ciklusa jesu temperaturnom promjenom (blagom hipotermijom), genetičkim inženjerstvom i kemijskim reagensima (Kumar i sur., 2007).

2.4.1.1. *Zaustavljanje staničnog ciklusa blagom hipotermijom*

Istraživanja na CHO stanicama pokazala su da promjena na malo nižu temperaturu uzgoja može dovesti do smanjenja specifične brzine rasta i proteazne aktivnosti te povećanja dugovječnosti i specifične produktivnosti stanica uz zadržanu kvalitetu proizvoda (Kumar i sur., 2007). Zbog pozitivnog učinka na vijabilnost i produktivnost procesa, primjena metode blage hipotermije je uobičajena u industrijskim procesima proizvodnje biofarmaceutika (Sou i sur., 2015), no mehanizam njezina djelovanja i dalje je nedovoljno poznat (Torres i sur., 2018). Industrijski proces primjene CHO stanica i uvjeta blage hipotermije sastoji se od dvije faze: početne faze pri oko 37 °C u kojoj se biomasa umnaža do željene gustoće stanica te proizvodne faze sinteze rekombinantnog proteina koja se odvija na 28-33 °C (Kumar i sur., 2007). Blaga hipotermija u šaržnim procesima dovodi do niza promjena metabolizma stanica što se očituje ukupnim smanjenjem trošenja izvora ugljika i energije, smanjenjem količine nusproizvoda (npr. laktata i amonijaka), zastojem staničnog ciklusa u G₁ fazi, povećanjem transkripcije i stabilnosti gena za rekombinantni protein, povećanjem kapaciteta procesiranja proteina u endoplazmatskom retikulumu i smanjenjem osjetljivosti na sile smicanja (Torres i sur., 2018).

2.4.1.2. *Zaustavljanje staničnog ciklusa kemijskim reagensima*

Otkriveno je više različitih kemijskih reagensa koji uzrokuju povećanje sinteze heterolognih proteina uz istovremeno smanjenje ili zaustavljanje staničnog rasta. Neki od takvih kemijskih reagensa su natrijev butirat, pentanoična kiselina, dimetil sulfoksid (DMSO), kinidin i timidin. Među navedenima, natrijeva sol butanske kiseline tzv. natrijev butirat (NaBu) najčešće je korišten. NaBu odobren je od strane FDA za upotrebu u proizvodnji terapijskih proteina, a uzrokuje različite morfološke i fiziološke promjene na kulturi životinjskih stanica kao što su zastoj staničnog ciklusa u G₁ fazi, inhibicija histonske

deacetilaze, diferencijacija, ali i apoptoza. Pretpostavlja se da je njegova funkcija inhibitora histonske deacetilaze razlog zbog kojeg pomaže u ekspresiji rekombinantnog gena. Inhibicijom histonske deacetilaze dolazi do hiperacetilacije histona što uzrokuje otvaranje nukleosomskih struktura. Takva modifikacija omogućava veću dostupnost genu i povećava brzinu njegove transkripcije (Sunley i Butler, 2010). No, obzirom da je primijećeno da može uzrokovati i apoptozu stanica, njegova primjena se izbjegava ili se primjenjuje zajedno u kombinaciji s prekomjernom ekspresijom gena za određeni anti-apoptotički faktor poput Bcl-2 (Kumar i sur., 2007).

2.4.1.3. Zaustavljanje staničnog ciklusa primjenom genetičkog inženjerstva

CDKs (eng. *Cyclin-Dependent Kinases*) molekule su ključne komponente puteva koji reguliraju prijelaz iz jedne u drugu fazu staničnog ciklusa i zbog toga su glavni faktor na koji se nastoji djelovati genetičkim inženjerstvom kako bi se postigla kontrolirana proliferacija stanica i povećala produktivnost procesa proizvodnje biofarmaceutika. Najčešće ciljani geni čijom prekomjernom ekspresijom se potiče zastoj staničnog ciklusa uključuju gene za ciklin-ovisne inhibitore (p21 i p27) i p53175P gen (p53 mutant sa smanjenom apoptotičkom funkcijom) (Baek i sur., 2015). Postoji niz istraživanja koji dokazuju da se prekomjernom ekspresijom prethodno navedenih gena postiže znatno povećanje specifične produktivnosti rekombinantnog proteina (tablica 2). Al-Rubeai i suradnici (2004. g.) istraživali su utjecaj prekomjerne ekspresije p21 gena na CHO i NS0 stanicama koje eksprimiraju kimerno IgG4 protutijelo. Pokazalo se da prekomjerno eksprimirani p21 gen uzrokuje zastoj staničnog ciklusa u G₁ fazi vezanjem p21 inhibitora na ciklin-CDK komplekse. Osim toga, takve CHO stanice bile su četiri puta veće i metabolički aktivnije od proliferirajućih CHO stanica i u skladu s time pokazale su oko četiri puta veći porast sinteze rekombinantnog proteina (Bi i sur., 2004). Slične rezultate Al-Rubaei i suradnici (2001. g.) postigli su i sa NS0 stanicama gdje je povećanje specifične produktivnosti IgG4 protutijela također bilo oko 4 puta (Wantanable i sur., 2001). Fussenegger i suradnici (1997. g.) proveli su istraživanje u kojem su napravili pojedinačnu tranzijentnu transfekciju CHO stanica, koje proizvode alkalnu fosfatazu, sa p21, p27 i p53175P genom. U sva tri slučaja došlo je do zastoja u G₁ fazi te su dobili oko četiri puta veću specifičnu produktivnosti alkalne fosfataze u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. Najbolje rezultate postigli su kombinacijom p21 gena i gena za anti-apoptotički protein, Bcl-xL, čime je dobiveno oko 30 puta veća specifična produktivnost (Baek i sur., 2015).

Tablica 2. Primjeri utjecaja prekomjerne ekspresije gena za zastoj staničnog ciklusa u G₁ fazi na specifičnu produktivnost stanica (Baek i sur., 2015)

Modificirani gen	Stanica	Terapeutski protein	Utjecaj na specifičnu produktivnost
p21 ^{Cip1}	CHO	IgG4	4 puta povećanje
p21 ^{Cip1}	NS0	IgG4	4 puta povećanje
p21 ^{Cip1}	CHO	alkalna fosfataza	4,6 puta povećanje
p27 ^{Kip1}	CHO	alkalna fosfataza	3,9 puta povećanje
p53175P	CHO	alkalna fosfataza	3,9 puta povećanje
p27 ^{Kip1} i Bcl-xL	CHO	alkalna fosfataza	30 puta povećanje
p27 ^{Kip1} i p53175P	CHO	alkalna fosfataza	15 puta povećanje
p21 ^{Cip1} i Bcl-2	CHO	monoklonsko protutijelo	2 puta povećanje
p21 ^{Cip1} i Bcl-2	NS0	IgG4	4 puta povećanje

2.4.2. Kontrola stanične smrti

Stanice imaju tendenciju brzog odumiranja nakon što dosegnu maksimalnu gustoću u bioreaktoru čime posljedično dolazi do smanjenja prinosa proizvoda i može doći do negativnog utjecaja na njegovu kvalitetu (Suzuki i sur., 1997). U proizvodnim procesima, posebice u kasnoj eksponencijalnoj fazi šaržnog procesa, stanična smrt rezultira povećanim oslobađanjem proteaza, glikozidaza i drugih enzima koji hidroliziraju proteine i mijenjaju glikansku strukturu rekombinantnog proteina. Također, produkti stanične smrti mogu stvarati probleme pri procesima izolacije i pročišćivanja proizvoda. Zbog odumiranja stanica često se ranije zaustavlja proces što smanjuje konačnu koncentraciju proizvoda (Henry i sur., 2020). Dva najčešća oblika smrti u proizvodnim procesima s kulturom životinjskih stanica su nekroza i apoptoza. No, stanična smrt u kasnoj eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi šaržnog procesa većinom se odvija procesom apoptoze te je stoga cilj uspostaviti kulturu otpornu na apoptozu (Suzuki i sur., 1997). Neke od metoda modifikacije stanica domaćina u svrhu odgađanja apoptoze su: prekomjerna ekspresija anti-apoptotičkih gena (Bcl-2, Bcl-xL) i negativna regulacija pro-apoptotičkih proteina (Bak, Bax, kaspaza 3, kaspaza 7).

2.4.2.1. Prekomjerna ekspresija anti-apoptičkih gena

Većina dosadašnjih istraživanja temelji se na proučavanju utjecaja prekomjerne ekspresije gena za anti-apoptičke članove Bcl-2 obitelji proteina: Bcl-2 i Bcl-xL. Navedeni proteini su inhibitori Bak i Bax pro-apoptičkih proteina ključnih za pokretanje mitohondrijskog puta apoptoze (Henry i sur., 2020). Utjecaj Bcl-2 i Bcl-xL ispitan je na različitim stanicama (CHO, NS0, BHK, HEK-293, hibridoma) i pri različitim stresnim uvjetima (nedostatak hranjivih tvari i seruma, hiperosmotski tlak, varijacije u pH, povećane sile smicanja, virusne infekcije, NaBu, amonijak) (Lim i sur., 2010). Prekomjerna ekspresija negativnih regulatora apoptoze (Bcl-2 i Bcl-xL) većinom je pokazala povećanje vijabilnosti stanica, a ponekad i povećanje maksimalne gustoće stanica (Henry i sur., 2020). No, učinak na samu produktivnost sinteze rekombinantnog proteina je promjenjiv. U mnogim okolišnim uvjetima, stanice s prekomjerno eksprimiranim Bcl-2 proteinom uspješno su odgodile apoptozu, no povećanje koncentracije rekombinantnog proteina često nije bio zamjetno ili je bilo minimalno (Grilo i Mantalaris, 2019). Istraživanja na stanicama s prekomjerno eksprimiranim genom za Bcl-xL protein, osim što su pokazala uspjeh u odgodi apoptoze, rezultirala su i duplo većim koncentracijama proizvoda (Henry i sur., 2020) čime se promijenio fokus u tom području istraživanja genetičkog inženjerstva prema Bcl-xL u odnosu na prvotno istraživani Bcl-2 (Grilo i Mantalaris, 2019). No, istraživanja su pokazala da u odgodi apoptoze primjenom prekomjerne ekspresije Bcl-2 i Bcl-xL proteina ključnu ulogu ipak ima vrsta stanične linije te snaga samog stresnog čimbenika (Krampe i Al-Rubeai, 2010).

2.4.2.2. Negativna regulacija pro-apoptičkih proteina

Jedan od pristupa za odgodu apoptoze i povećanje produktivnosti u procesima sa životinjskim stanicama je "utišavanje" (eng. *Knockdown*) genske poruke za Bax, Bak, kaspazu 3, 7, 8 i 9 ili njihova inhibicija (Xiong i sur, 2014). Negativna regulacija navedenih gena postignuta je različitim tehnikama poput upotrebe siRNA (eng. *Small interfering RNA*), ZFN-a (eng. *Zinc finger nucleases*), TALEN-a (eng. *Transcription activator-like effector nucleases*) i nedavno razvijenim CRISPR (eng. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) sistemom (Baek i sur., 2017).

Bak i Bax su pro-apoptički članovi Bcl-2 obitelji i ključni regulatori unutarnjeg puta apoptoze. Aktiviraju se djelovanjem apoptičkih stimulansa čime dolazi do njihove oligomerizacije na membrani mitohondrija što uzrokuje permeabilizaciju membrane i oslobađanje pro-apoptičkih faktora u citoplazmu stanice te se taj događaj smatra ključnim

korakom unutarnjeg puta apoptoze (Blanco i Garcia-Saez, 2017). U većini istraživanja negativne regulacije Bax i Bak uspješno je dobivena stanična kultura s većom otpornošću na apoptozu i sa gotovo duplo većom konačnom koncentracijom proizvoda u odnosu na nemodificirane, kontrolne stanice što potvrđuje da ovakva modifikacija proizvodne stanične linije ima veliki potencijal u industrijskoj primjeni (Henry i sur., 2020).

Prijenos apoptotičkog signala u stanicama posredovan je kaspaza-kaskadnim sustavom, odnosno nizom proteolitičkih reakcija u kojima se kaspaze međusobno aktiviraju što za posljedicu ima poticanje, prijenos i pojačavanje apoptotičkog signala (Kim i sur., 2012). Prema tome, inhibicija kaskadne aktivnosti je logičan cilj apoptotičkog inženjerstva. U dosadašnjim istraživanjima na CHO stanicama provedena je negativna regulacija kaspaza 3, 7, 8 i 9. "Utišavanje" genske poruke za kaspaze većinom je rezultiralo malim napretkom u vijabilnosti i gustoći stanica. Osim toga, u nekim istraživanjima primijećen je porast konačne koncentracije proizvoda od 1,5 do 3 puta (Henry i sur., 2020). Drugi pristup inhibiranja kaspazne aktivnosti je prekomjernom ekspresijom unutarstaničnih, kaspaznih inhibitora kao npr. XIAP (eng. *X-linked mammalian inhibitor of apoptosis*) i CrmA (eng. *Cytokine response modifier A*). XIAP je inhibitor kaspaza 3, 7 i 9, a CrmA je jaki inhibitor kaspaze 1 i 8 te slabi inhibitor kaspaze 3 i 6 (Kim i sur., 2012). Dosadašnja istraživanja nisu ukazala na značajniji porast vijabilnosti niti produktivnosti primjenom prekomjerne ekspresije gena za XIAP i CrmA inhibitor (Henry i sur., 2020).

2.4.3. Kontrola metabolizma stanica

Osim potrebe za zadovoljavanjem zahtjeva stanice, formulacija medija za uzgoj i način njegove primjene koristi se kao jedna od strategija za regulaciju stanične proliferacije i proizvodnje rekombinantnog proteina (Kumar i sur., 2007). Također, trošenje nutrijenata koji ograničavaju rast dovodi do staničnog zastoja i s vremenom do apoptoze, koju također može potaknuti i nakupljanje toksičnih metabolita u mediju za uzgoj stanica (Grilo i Mantalaris, 2019). Dva ključna toksična metabolita koje proizvode stanice su laktat i amonijak. Genetičko inženjerstvo se koristi kao jedna od metoda za modifikaciju energetskeg metabolizma tako da se izvori energije preusmjere na puteve koji efikasnije proizvode staničnu energiju uz smanjenu količinu toksičnih nusproizvoda (Baek i sur., 2015). Osim toga, proizvodnja heteroloških proteina je energetski zahtjevan proces zbog čega je također važno pojačati energetski metabolizam stanica (Lim i sur., 2010).

2.4.3.1. *Formulacija medija za uzgoj stanica*

Komponente koje se uobičajeno koriste kao izvor ugljika i energije su glukoza i glutamin. Neefikasna potrošnja (veće trošenje nego li je potrebno za normalni stanični rast) glukoze i glutamina dovodi do brzog rasta biomase, trošenja hranjivih tvari i nakupljanja metabolita (laktat, amonijak i dr.) koji mogu imati inhibitorni utjecaj na dugovječnost i produktivnost stanica. Zamjena glukoze i glutamina alternativama koje mogu biti efikasnije iskorištene kao izvor ugljika i energije s manjom brzinom potrošnje važno je jer sporije trošenje nutrijenata može voditi prema smanjenom ili zaustavljenom staničnom rastu, a takve promjene su povezane sa poboljšanjem stanične dugovječnosti i sveukupne produktivnosti (Kumar i sur., 2007). Istraživanja Altamirana i suradnika (2000. g.) na CHO stanicama pokazala su da je zamjena glukoze sa galaktozom (sporije metabolizirajući šećer) i glutamina sa glutamatom (manja brzina transporta u stanicu i ima samo jedan atom dušika) smanjila brzinu rasta stanica i poboljšala njihovu dugovječnost i produktivnost tijekom šaržnog procesa. Tomu je također pridonijelo smanjenje količine nastalih toksičnih metabolita i osmotskog tlaka (Altamirano i sur., 2000). Veću vijabilnost i proizvodnju t-PA primjenom CHO stanica ostvarili su i dvofaznim procesom u kojem su tijekom faze rasta koristili glukoza kao izvor ugljika i energije, a galaktozu tijekom proizvodne faze (Altamirano i sur., 2001). Osim toga, postoje primjeri uspješne zamjene glukoze sa fruktozom i laktozom te glutamina sa asparaginom (Kumar i sur., 2007).

2.4.3.2. *Kontrola metabolizma genetičkim inženjerstvom*

Modifikacijom staničnog metabolizma primjenom genetičkog inženjerstva nastoji se ublažiti negativan učinak nakupljanja toksičnih metabolita, prije svega amonijaka i laktata. Amonijak nastaje staničnim metaboliziranjem glutamina. Visoke koncentracije nakupljenog amonijaka uzrokuju inhibiciju staničnog rasta, smanjenje vijabilnosti, a u konačnici i apoptozu stanica. Imortalizirane CHO stanice umjesto da u aerobnim uvjetima u potpunosti oksidiraju glukoza do CO_2 i H_2O , one većinom prevode piruvat u laktat reakcijom kataliziranom laktat dehidrogenazom (LDH) i taj fenomen poznat je kao Warburgov efekt (Zagari i sur., 2013). Studije su pokazale da nastali laktat inhibira stanični rast, pokreće apoptozu i smanjuje produktivnost proizvodnje rekombinantnog proteina što je povezano sa smanjenjem pH i povećanjem osmotskog tlaka kojeg nakupljeni laktat uzrokuje (Pereira i sur., 2018).

Dosadašnja istraživanja pokazala su potencijal negativne regulacije gena za LDH. LDH je enzim koji provodi konverziju piruvata u laktat i njegovom negativnom regulacijom primjenom siRNA smanjeno je nastajanje laktata bez negativnog utjecaja na staničnu proliferaciju i proizvodnju terapijskog proteina (Pereira i sur., 2018). Slični rezultati postignuti su kombinacijom negativne regulacije LDH i kinaze piruvat dehidrogenaze (PDHK) primjenom siRNA. PDHK je enzim koji provodi reakciju fosforilacije enzima piruvat dehidrogenaze i naj taj način ga inaktivira i onemogućava ulaz piruvata u ciklus limunske kiseline. Negativna regulacija LDH i PDHK smanjila je nastajanje laktata te povećala specifičnu brzinu nastajanja monoklonskog protutijela (Baek i sur., 2015). Učinak stabilne ekspresije gena za transportni protein fruktoze (GLUT5) također je istraživao. Kada stanice koriste fruktozu kao izvor ugljika, brzina njegova trošenja je puno sporija u odnosu na glukozu čime je izbjegnuto usmjeravanje viška izvora ugljika u proizvodnju laktata. Druga istraživanja opisuju učinak ekspresije ljudskog gena za piruvat karboksilazu u CHO stanicama. Piruvat karboksilaza katalizira ireverzibilnu karboksilaciju piruvata u oksaloacetat čime se zaobilazi nastajanje laktata. Uspoređujući sa nemodificiranim, kontrolnim stanicama, CHO stanice koje ekspimiraju piruvat karboksilazu pokazale su smanjenu proizvodnju laktata za 21-39 % te veću vijabilnost (Baek i sur., 2015).

Osim toga, razvoj glutamin sintetaznog selekcijskog markera važan je napredak u proizvodnji rekombinantnih proteina primjenom CHO stanica predstavljajući alternativu za dihidrofolat reduktazni ekspresijski sustav. GS sustav se temelji na deleciji gena za GS, te njegovim ponovnim vraćanjem transfekcijom plazmidnim konstruktom koji kodira za rekombinantni protein od interesa i za GS selekcijski marker. Stanice rastu u mediju bez glutamina i uz metionin-sulfoksimin kao sredstvo za amplifikaciju gena. Prednost takvog selekcijskog sustava je u tome što smanjuje količinu stvaranja amonijaka jednom kada je ugrađen u stanicu domaćina. Amonijak zajedno s glutamatom stvara glutamin u enzimskoj reakciji s GS, a glutamin sudjeluje u reakciji nadopunjavanja ciklusa limunske kiseline uključujući se kao α -ketoglutarat nakon reakcije transaminacije (Pereira i sur., 2018).

Primjena biofarmaceutika u terapiji različitih oboljenja kod ljudi zadnjih nekoliko desetaka godina pokazala se revolucionarnom metodom liječenja zbog čega broj novih biofarmaceutika konstantno i brzo raste. Rastuće potrebe za biofarmaceuticima zahtijevaju daljnji razvoj proizvodnih staničnih linija koje će dati visoke koncentracije biofarmaceutika

odgovarajuće kvalitete, a kako bi se to ostvarilo primjenjuju se različite biotehnološke metode. Neke od metoda razvoja proizvodnih staničnih linija usmjerene su prema sprječavanju stanične smrti, što se često povezuje s povećanjem prinosa proizvodnje. Osim toga, istraživanja su pokazala povezanost kontrole staničnog ciklusa s povećanjem produktivnosti procesa. No, budući da svaka stanična linija ima karakteristična svojstva te svaki proizvodni proces svoje specifičnosti, i nadalje su potrebna istraživanja koja će omogućiti bolje razumijevanje mehanizama navedenih staničnih procesa te omogućiti daljnju identifikaciju gena čijom primjenom je moguće dobiti produktivnije proizvodne stanične linije.

3. ZAKLJUČCI

1. Životinjske stanice su najčešće korišteni ekspresijski sustavi za proizvodnju biofarmaceutika jer provode posttranslacijske modifikacije proteina sličnim onima kod ljudi te mogu proizvoditi velike i komplekse rekombinantne proteine.
2. Koncentracije rekombinantnih proteina dobivenih primjenom životinjskih stanica, unatrag nekoliko desetaka godina povećale su se za više od 100 puta. To je ostvareno razvojem kontinuiranih staničnih linija, kemijski definiranih medija za uzgoj, uzgojem stanica u suspenziji te primjenom inovativnih strategija kao što su modificiranje staničnog ciklusa, stanične smrti i metabolizma stanica primjenom genetičkog inženjerstva, formulacijom medija za uzgoj stanica, kemijskim reagensima i dr.
3. Stanična smrt, metabolizam i stanični ciklus su stanični procesi koji utječu na povećanje vijabilnosti, dugovječnosti i produktivnosti stanica. Razumijevanje navedenih staničnih procesa vrlo je bitno kako bi se racionalno pristupilo njihovoj kontroli sa ciljem povećanja produktivnosti procesa proizvodnje biofarmaceutika.
4. Prema dosadašnjim istraživanjima, mnoge metode kontrole stanične smrti, metabolizma i staničnog ciklusa imaju mogućnost primjene u proizvodnji biofarmaceutika.

4. LITERATURA

Altamirano, C., Cairo, J. J., Godia, F. (2001) Decoupling cell growth and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control. *Biotechnol. Bioeng.* **76**, 351-360.

Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J. J., Godia, F. (2000) Improvement of CHO Cell Culture Medium Formulation: Simultaneous Substitution of Glucose and Glutamine. *Biotechnol. Progr.* **16**, 69-75.

ATCC (2020) ATCC – American Type Culture Collection <https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=hr>. Pristupljeno 14. rujna 2020.

Baek, E., Kim, C. L., Park, J. H., Lee, G. M. (2015) Cell Engineering for Therapeutic Protein Production. U: *Animal Cell Culture*, (Al-Rubeai, M., ured.), Springer, str. 565-585.

Baek, E., Noh, S. M., Lee, G. M. (2017) Anti-apoptosis Engineering for Improved Protein Production from CHO Cells. U: *Heterologous Protein Production in CHO cells*, (Meleady, P., ured.), Humana Press, New York, str. 71-85.

Berlec, A., Štrukelj, B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **40**, 257-274.

Bi, J. X., Shuttleworth, J., Al-Rubeai, M. (2004) Uncoupling of Cell Growth and Proliferation Results in Enhancement of Productivity in p21^{CIP1}-Arrested CHO Cells. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 741-749.

Blanco, A.P., Garcia-Saez, A.J. (2017) Bak, Bax and beyond: mitochondrial performance in apoptosis. *Febs. J.* **285**, 416-431.

Butler, M., Spearman, M. (2014) The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Cur. Opin. Biotech.* **30**, 107-112.

D'Arcy, M. S. (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **43**, 582-590.

Dice, J. F. (2007) Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy* **3**, 295-299.

- Donepudi, M., Grütter, M. G. (2002) Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys. Chem.* **101**, 145-153.
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R. (2015) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Rev. Biotechnol.* **36**, 1110-1122.
- Elledge, S. J. (1996) Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. *Science*, 274, 1664-1671.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977) Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 582-590.
- Grilo, A. L., Mantalaris, A. (2019) Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnol. Adv.* **37**, 459-475.
- Henry, M. N., MacDonald, M. A., Orellana, C. A., Gray, P. P., Gillard, M., Baker, K., Nielsen, C. A., Marcellin, E., Mahler, S., Martinez, V. S. (2020) Attenuating apoptosis in Chinese hamster ovary cells for improved biopharmaceutical production. *Biotechnol. Bioeng.* **117**, 1187-1203.
- Johnson, D. G., Walker, C. L. (1999) Cyclins and Cell Cycle Checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 295-312.
- Jordan, I., Sandig, V. (2015) Cell Lines for Vaccine Production. U: Animal Cell Biotechnology, (Hauser, H., Vagner, R., ured.), De Gruyter, Laupheim, str. 60-87.
- Khan Academy (2020) Phases of the cell cycle, < <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/cell-cycle/a/cell-cycle-phases>> Pristupljeno 14. rujna 2020.
- Kim, J. Y., Kim, Y.G., Lee, G.M. (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 917-930.
- Kiraz, Y., Adan, A., Yandim, M. K., Baran, Y. (2016) Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor biol.* **37**, 8471-8486.

Krampe, B., Al-Rubeai, M. (2010) Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology* **62**, 175-188.

Kretzmer, G. (2002) Industrial processes with animal cells. U: *Applied Microbiology and Biotechnology*, (Steinbüchel, A.), Springer Science + Business Media, str.135-142.

Kumar, N., Gammell, P., Clynes, M. (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology* **53**, 33-46.

Kuystermans, D., Al-Rubeai, M. (2015) Biopharmaceutical Products from Animal Cell Culture. U: *Animal Cell Culture*, (Al-Rubeai, M., ured.), Springer International Publishing, str. 717-720.

Lim, Y., Wong, N. S. C., Lee, Y. Y., Ku, S. C. Y., Wong, D. C. F., Yap, M. G. S. (2010) Engineering mammalian cells in bioprocessing – current achievements and future perspectives. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **55**, 175-189.

Lloyd, D. R., Holmes, P., Jackson, L. P., Emerty, A. N., Al-Rubeai, M. (2000) Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology* **34**, 59-70.

Lloyd, D. R., Leelavatcharamas, V., Emerty, A. N., Al-Rubeai, M. (1999) The role of the cell cycle in determining gene expression and productivity in CHO cells. *Cytotechnology* **30**, 49-57.

Merten, O. -W. (2006) Introduction to animal cell culture technology—past, present and future. *Cytotechnology* **50**, 1-4.

Mohan, C., Kim, Y., Lee, G. M. (2009) Apoptosis and Autophagy Cell Engineering. U: *Cell Line Development*, (Al-Rubeai, M., ured.), Springer Science + Bussines Media, Dordrecht, str. 195-216.

Morgan, D. (2007) Cell Cycle: Principles of Control, New Science Press Ltd., London, str. 1-9.

- Nunes, T., Bernardazzi, C., Souza, H. S. (2014) Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 1-12.
- Papinski, D., Kraft, C. (2016) Regulation of Autophagy By Signaling Through the Atg1/ULK1 Complex. *J. Mol. Biol.* **428**, 1725-1741.
- Pereira, S., Fastrup Kildegaard, H., Rordam Andersen, M. (2018) Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnol. J.* **13**, 1-13.
- Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A. (2000) Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia* **2**, 191-198.
- Radošević, K. (2020) Kulture životinjskih stanica. *Kem. Ind.* **69** (9-10), 561-562.
- Rello, S., Stockert, J. C., Moreno, V., Gamez, A., Pacheco, M., Juarranz, A., Canete, M., Villanueva, A. (2005) Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* **10**, 201-208.
- Slivac, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, str. 26-35.
- Sou, S. N., Sellick, C., Lee, K., Mason, A., Kyriakopoulos, S., Polizzi, K. M., Kontoravdi, C. (2015) How does mild hypothermia affect monoclonal antibody glycosylation?. *Biotechnol Bioeng.* **112**, 1165-1176.
- Sunley, K., Butler, M. (2010) Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnol. Adv.* **28**, 385-394.
- Suzuki, E., Terada, S., Ueda, H., Fujita, T., Komatsu, T., Takayama, S., Reed, J. C. (1997) Establishing apoptosis resistant cell lines for improving protein productivity of cell culture. *Cytotechnology* **23**, 55-59.
- Tang, H. M., Tang, H. L. (2018) Anastasis: recovery from the brink of cell death. *R. Soc. Open. Sci.* **5**, 180442

Torres, M., Zuniga, R., Gutierrez, M., Vergara, M., Collazo, N., Reyes, J., Berrios, J., Aguilon, J. C., Molina, M. C., Altamirano, C. (2018) Mild hypothermia upregulates *myc* and *xbp1s* expression and improves anti-TNF- α production in CHO cells. *Plos one* **13**, 1-23.

Urlich, A. B., Pour, P. M., (2001) Cell Lines. U: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, (Maloy, S., Hughers, K., ured.), Elsevier Inc., str. 310-311.

Vermeulen, K., Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets sin cancer. *Cell Proliferat.* **36**, 131-149.

Wantanable, S., Shuttleworth, J., Al-Rubeai, M. (2001) Regulation of Cell Cycle and Productivity in NS0 cells by the Over-Expression of p21^{CIP1}. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 1-7.

Xiong, S., Mu, T., Wang, G., Jiang, X. (2014) Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein cell* **5**, 737-749.

Yang, Z., Klionsky, D. J. (2009) An Overview off he Molecular Mechanism of Autophagy. U: *Autophagy in Infection and Immunity*, (Levine, B., Yoshimori, T., Deretic, V., ured.), Spinger, Berlin, str. 1-25.

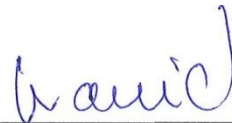
Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., Wurm, F. M. (2013) Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative acitivity. *New. Biotechnol.* **30**, 238-245.

Zhang, J. (2010) Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production. U: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 3. izd., (Baltz, R., Demain, A., Davies, J., Bull, A., Junker, B., Katz, L., Lynd, L., Masurekar, P., Reeves, C., Zhao, H., ured.), ASM Press, Washington, str. 157-171.

Ziegler, U., Groscurth, P. (2004) Morphological Features of Cell Death. *Physiology* **19**, 142-148.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'B. Anić', is written above a horizontal line.

Potpis studenta