



SPODOPTERA FRUGIPERDA BÖCEK HÜCRELERİNİN TRANSFEKSİYONU VE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

TRANSFECTION OF *SPODOPTERA FRUGIPERDA* INSECT CELL AND PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN

Özlem ÜSTÜN AYTEKİN^{1*}

¹Gıda Mühendisliği, Mühendislik Fakültesi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye.
drozlemaytekin@gmail.com

Geliş Tarihi/Received: 10.04.2014, Kabul Tarihi/Accepted: 13.08.2014

* Yazışılan yazar/Corresponding author

doi: 10.5505/pajes.2014.32559

Derleme Makalesi/Review Article

Öz

Rekombinant protein üretimi son yıllarda sıklıkla çalışılan bir konudur. Rekombinant protein üretimi için çalışılan konakçılar arasında kısa ikilenme süresi, protein katlanmasındaki avantajları, süspans kültürde çalışılabilmesi nedeni ile *Spodoptera frugiperda* böcek hücre hatları; yüksek verimliliği, büyük gen bölgelerini ekspres etme kapasitesi ve hızlı cevap vermesi nedeni ile de transfeksiyon vektörü olarak baculovirus (BV) tercih edilmektedir. Bu derlemede rekombinant protein üretimini etkileyen bu hücre hatları, üretim ortamları, uygun üretim koşulları, baculovirusler, transfeksiyon metotları, rekombinant protein üretiminde kullanılan biyoreaktör sistemleri, çalışma modları ve biyoreaktör ekipmanları açıklanmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Spodoptera frugiperda*, Rekombinant protein üretimi, Baculovirus, Biyoreaktörler

Abstract

Production of recombinant protein is widely studied in recent years. *Spodoptera frugiperda* insect cell lines preferred as a host for baculovirus (BV) because of the short doubling time, high protein folding, and adaptation to suspension culture. Also, baculovirus systems have the capacity for high productivity, expression of large gene and efficient transfection method. In this review, insect cell lines that are responsible for expression of recombinant protein, growth media, production conditions, baculoviruses, transfection methods, bioreactor systems, operational modes and bioreactor equipment are addressed.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, Recombinant protein production, Baculovirus, Bioreactors

1 Giriş

Rekombinant DNA teknolojisinin endüstriyel uygulamaları biyoteknolojik aşular, antibiyotikler, hormonlar, monoklonal antikolar, tedavi, koruma ve teşhiste kullanılan diagnostik maddeler üzerine yoğunlaşmaktadır. Endüstriyel alanda kısa zamanda bol ürün elde etmek gibi oldukça büyük bir avantaj sağlayan rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen rekombinant proteinler de bu ürünlerden biridir. Rekombinant proteinlerin üretiminde ekspresyonu gerçekleştirilecek olan protein geni, prokaryotik ya da ökaryotik bir konakçı organizmaya aktararak istenen proteinin ekspresyonu gerçekleştirilebilir. Prokaryotik protein ekspresyonlarını en kolay gerçekleştirebilen mikroorganizma *Escherichia coli* (E.coli)'dir. E.coli'nin rekombinant protein üretimi için öncelikli olarak tercih edilmesinin nedenleri içerisinde; tanımlanmış bir organizma *Spodoptera frugiperda* olması, ikilenme süresinin çok kısa olması, üretim ortamının ucuz olması ve elde edilecek proteinin saflaştırma adımlarının kolay olması gösterilebilir [1]. Ancak, E.coli prokaryotik bir organizma olması nedeni ile post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmek için gerekli olan intrasellüler organellerin yeterli olmaması gibi bir dezavantaja sahiptir. Bu nedenle E.coli'de üretilmesi mümkün olan pek çok ökaryotik protein nonfonksiyonel veya tamamlanmamış formlarda olabilmektedir. E.coli'nin ökaryotik proteinlerin ekspresyonunda görülen yetersizlik rekombinant protein üretimi için ökaryotik konakçıların kullanılması sonucunu doğurmuştur.

Ökaryotik konakçılara mayalar, funguslar, transgenik bitkiler ve hayvanlar, memeli hücreleri ve böcek hücreleri örnek gösterilebilmektedir [2]. Bu konakçılar arasında memeli ve böcek hücre kültürü kullanarak rekombinant protein üretme prosesleri son yıllarda oldukça sık çalışılmaktadır. Ancak hücre hatlarının istekleri, hücrelerin bazı hidrodinamik etkenlere hassasiyeti ve büyüme kinetikleri karşılaştırıldığında böcek hücrelerinin avantajları göz önünde bulundurulmaktadır [3]. Bu proseslerde yabancı geni taşıyan bir vektör, böcek hücrelerini konakçı olarak kullanır. Bu vektör ile enfekte edilen hücre arzu edilen yabancı geni yüksek miktarda eksprese etmektedir. Rekombinant proteine örnek olarak insülin, DNA polimeraz, östrojen reseptörü, keratin, prostat spesifik antijen gibi pek çok ürün gösterilebilir. Rekombinant proteinler, genellikle terapötik proteinler olarak bilinirler. Terapötik proteinler son 20-25 yıldır kullanımda olup katma değeri oldukça yüksek ürünlerdir [4]. Tablo 1'de bazı ticari firmalar tarafından böcek hücre hattı kullanılarak üretilen terapötik proteinlere örnekler verilmiştir.

1.1 Böcek Hücreleri

Böcek hücreleri ile ilgili çalışmalar yirminci yüzyılın başlarında farklı çalışma alanlarındaki entomolojistlerin böcek hücrelerinin in vitro bir araç olarak kullanılması ile ilgili teorilerine dayanmaktadır. Glaser ve Chapman kültüre alınmış hemasitlerde Baculoviridae ailesinden şimdiki adı ile nükleovirus olarak bilinen virüs nedeniyle oluşan hastalıkların patogenezi çalışırken, Goldschmidt spermatazoanın

gelişimini incelemek için geniş bir güve varyetesinin spermatositlerini gözlemek amacı ile kültüre almıştır [5]. Grace böcek hücrelerini ilk kez uzun süreli kültürlemeyi başardıktan sonra 500'den fazla hücre hattı tespit edilmiştir [6],[7]. Bitki patoloğları ve omurgalı patolojistleri böcekler tarafından aktarılan virüsleri replike edebilen hücrelere yönelik çalışmalarını artırırken (omurgalılarda, omurgasızlarda bir varyete ve böcek hücre kültürlerinde bitki virüsleri) böcek patolojistleri böceğe spesifik virüsleri replike edebilen hücrelere yönelik çalışmalara yoğunlaşmıştır [8],[9]. Halen 32 farklı hücre ile çalışılmaktadır. En yaygın kullanılan lepidopteran hücreleri; güz tırtıllarının (*Spodoptera frugiperda*) yumurtalık dokularından izole edilmiş olan Sf9 ve Sf21 hücre hatları ve *Trichoplusiani*'nin embriyonik dokularından kurulan BTITn-5B1-4 olarak numaralandırılmış "High Five" hücre hattıdır. Sonbahar tırtılı olarak bilinen *Spodoptera frugiperda*, yeşil ve sağlıklı bir görüntüsü olan Bermuda çimenine zarar veren kronik bir haşeredir. Buğday, arpa, yulaf, çavdar gibi tahılların yanı sıra yonca, soya fasulyesi ve pamuğu içeren 60'dan fazla bitki sonbahar tırtılına ev sahipliği yapmaktadır [10]. *Spodoptera frugiperda*'nın larva ve yetişkin görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Böcek hücre hattı kullanılarak üretilen ticari ürünler.

Terapötik Protein	Kullanım Alanı	Üretici Firma	Konakçı
Domuz ateşi aşısı	Veterinerlik	Merck®	T.ni hücresi
Prostat kanseri aşısı	İnsan	Provenge®	Sf9 böcek hücresi
Grip aşısı	İnsan	FluBlok®	Sf9 ve memeli hücresi
DPPIV standart protein	İnsan	Sigma®	Sf9 böcek hücresi



Şekil 1: *Spodoptera frugiperda*'nın larva. (a): Yetişkin, (b): Görüntüleri (Texas A and M University, Department of Entomology, 2011).

1.2 Spodoptera Frugiperda Hücre Hattının Özellikleri

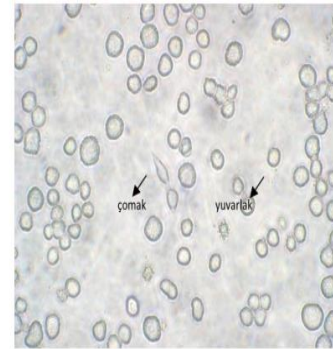
Böcek hücre hatları hazırlanırken kullanılacakları amaca göre yumurtalık, embriyo, yağ dokusu, sinir sistemi, orta mide dokusu gibi dokular seçilmektedir. Haşere kontrolü ya da patoloji çalışmalarında sinir sistemi ve orta mide gibi dokular kullanılırken, rekombinant protein üretim çalışmalarında *Spodoptera frugiperda*'nın yumurtalık hücrelerinden (Sf9 ve Sf21) yararlanılmaktadır.

Sf9 hücrelerinin morfolojisi incelendiğinde yüzeye sıkıca bağlanan, küçük, düzenli boyuta sahip polimorfik, monolayer kültüre uygun hücreler olduğu görülmüştür. Bu hücrelerin %90'ı yuvarlak, %10'u çomak şeklinde bulunmaktadır (Şekil 2).

Şekil 2'de 'Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ne ait 'Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği' laboratuvarında ürettiğimiz Sf9 hücreleri görülmektedir. Bu hücreler

çoğunlukla yüzeye bağımlıdır ancak süspansiyon olarak da çoğaltılabilirler. Bu nedenle *T flask* ya da giriftli *çalkalamalı kültür erleni* içinde kolaylıkla üretilebilmektedirler.

Sf9 hücre hattı *Spodoptera frugiperda* orijinli IPLB-Sf21-AE (Sf21) hücre hattından izole klon hattıdır. İki hücre hattı da transfeksiyon, saflaştırma, yüksek titreye sahip stoklama ve rekombinant protein üretimi için uygundur. Bununla birlikte Sf21 hücre hattı monolayer kültür ile üretimde Sf9 hücresine oranla daha hassas olması nedeniyle pasajlamada canlı hücre kayıpları meydana gelmektedir [11]. *Spodoptera frugiperda*'nın pupal evredeki yumurtalık dokularının *Autographa californica* çekirdek polihedrosis virüsü (AcMNP) ile enfeksiyona duyarlılığının yüksek olması nedeni ile tüm baculoviral ekspresyon vektörleri ile kullanılabilir. Sf9 ve Sf21 hücrelerinden genellikle rekombinant proteinlerin üretimi, rekombinant baculoviral stokların çoğaltılması ve izolasyonunda yararlanılmaktadır.



Şekil 2: Sf9 hücrelerinin ters faz mikroskopta görünümü (20X, Olympus, Japonya).

1.3 Böcek Hücre Kültürü için Kullanılan Üretim Ortamları

Böcek hücre hatları için pek çok ticari hücre kültürü besi ortamı geliştirilmiştir. Böcek hücre kültürü üretiminde kullanılan yaklaşık 100 farklı üretim ortamı bulunmasına rağmen (Tablo 1) Grace'in ortamı en çok tercih edilendir. Grace'in ortamı güve (kelebek) hücrelerinin büyümesini desteklemek için formüle edilmiştir. Lepidopteran ve dipterans dahil çeşitli hücre hatları için kullanılabilen bu ortam ilk olarak Dr. WF Hink tarafından lahana zararlısı olan *Trichoplusiani*'den elde edilen hücreler için modifiye edilmiş ve 'Medium-Formulation Hink (TNM-FH)' adını almıştır [12],[13]. Tablo 2'de verilen ortamlar içinde Grace'in ortamı L-glutamin içermektedir. Bu ortama diğer katkı maddeleri maya izolatu ve laktalbumin hidrolizat eklenebilir.

Tablo 2: En çok kullanılan böcek hücre kültürü ortamları.

Serumlu Ortam	Serumsuz Ortam
Grace'in desteklenmiş ortamı (TNM-FH)	Sf-900 II SFM
IPL-41	Express-Five SFM
TC-100	
Schneider's Drosophila	

Bu ortam "fetal sığır serum (FBS)" ile desteklenmektedir. Serum, besi ortamına ek nutrientler sağlayarak büyümeyi teşvik etmekte ve hücreleri süspansiyon kültürünün hidrodinamik etkilerinden (kayma geriliminden) korumaktadır. Hücreleri çevresel toksinlerden ve proteolitik degradasyondan korumanın yanında hücresel tutunma faktörlerine de katkıda bulunmaktadır. Serum kalitesi optimal hücre büyümesi için

önemlidir ancak farklı kaynaklardan elde edilen serumlar ya da aynı kaynaktan elde edilmiş farklı bir seri numarasına sahip serumlar optimal hücre büyümesinde farklılıklara yol açabilmektedir [14]. Serum içeren ortamların dezavantajları; serum maliyetinin yüksek olması, tam olarak tanımlanmamış bir ortam olması ve bu nedenle üretim ortamına beklenmedik faktörlerin girişine neden olabilmesi, yüksek protein içerikli olması ve bunun sonucu olarak alt akım işlemlerinde karmaşık süreçler gerektirmesi, bu durumun doğurduğu maliyetlerin yüksek olması, farklı zamanlarda alınan serumlar arasındaki homojenite farkı nedeni ile fiyat-kalite ve standardizasyonda heterojenlik, yetersiz hücre büyümesi, düşük üretim verimliliği görülme riski, toksisite ya da virüs kontaminasyon riski taşıması ayrıca püskürtmeli havalandırma kullanılan biyoreaktörlerde aşırı köpüklenmeye neden olabilmesi olarak bildirilmiştir [15]-[17]. Serum içeren üretim ortamlarında tespit edilen bu problemlerin ortadan kaldırılabilmesi için serumsuz ortamlar üretilmiştir.

Çoğu ticari olarak bulunabilen serumsuz böcek ortamları, IPL-41 bazal ortamının protein hidrolizatları ve lipit/sürfaktan emülsiyon ilaveli basit varyasyonlarıdır. Optimize edilmiş bu formülasyonlar ile hücreler ve üretim verimleri artmış, dışarıdan gelen istenmeyen ajanlar ortadan kaldırılmış, seriler arası tutarlılık sağlanmıştır. Özellikle büyük ölçek üretimler ve rekombinant proteinler için Sf-900™ II SFM ve EXPRESS- FIVE SFM™ gibi serum içermeyen formülasyonlar tasarlanmıştır. Bu formülasyonlar, besin kısıtlamaları ve eksikliklerin sınırlayıcı etkisini ortadan kaldırmak için amino asitleri, karbonhidratları, vitaminleri ve lipitleri optimum miktarda içermektedirler. Böylece hücre hattının sıgır serumuna veya başka hayvansal serum desteğine olan ihtiyacı ortadan kalkmıştır. Sf-900™ II SFM ve EXPRESS-FIVE SFM™ ortamları Grace ortamına göre popülasyonun ikilenme zamanını azaltmakta ve daha yüksek hücre yoğunluğunu sağlamaktadır. Böylelikle, yüksek miktarlarda ve verimde protein ekspresyonu sağlanabilmektedir [13].

1.4 Böcek Hücre Kültürü için Uygun Üretim Koşulları

Omurgasız hücre kültürleri çevresel faktörlere ve koşullara karşı duyarlıdır. Kimyasal, besinsel kültür faktörlerine ek olarak fiziksel faktörler de böcek hücre hattını etkileyebilmekte ve maksimum hücre gelişimi için optimizasyon gerekmektedir. Hücre yoğunluğunun ve canlılığın kontrol altına alınabilmesi için sıcaklık, pH, ozmolarite ve kayma gerilimi gibi çevresel faktörler optimum seviyede tutulmalıdır. Tablo 3'te böcek hücre üretimi için uygun bir üretim ortamının optimum koşulları ve özellikleri verilmektedir.

Tablo 3'te verildiği gibi bir çok böcek hücrelerinin büyümesi ve enfekte kültür oluşturması için gerekli olan optimum sıcaklık aralığı 24 °C ile 28 °C arasındadır. Bu sıcaklıklar arasında salınım yapılarak üretilen Sf9 hücrelerinin süspansiyon kültür ve durağan kültürde sıcaklığın 28 °C'de sabit tutulması ile üretilen Sf9 hücrelerine kıyasla canlılığının arttığı görülmüştür [18]. Hücreler 25 °C'de nemsiz bir ortamda üretilmelidir. Bu hücrelerin 25 °C'nin altında çok daha yavaş büyüdükleri, sıcaklık 25 °C'ye getirildiğinde normal ikilenme zamanlarını sürdürdükleri, 30 °C'nin üstünde ise hücrelerin düşük canlılık gösterdikleri tespit edilmiştir [13].

Diğer bir parametre pH'dır. Karbondioksitin hücre sitoplazmasında akümüasyonu ve HCO_3^- ve H^+ iyonlarına ayrışması oksidatif stresi tetikleyebilmekte ve bunun

sonucunda hücre içi pH düşmekte ve ortam ozmolaritesi değişmektedir [19]-[21].

Tablo 3: Böcek hücre kültürü üretim ortamının uygun operasyon koşulları.

Koşullar	Değerler	Özellikler
Sıcaklık	24 °C-28 °C	Sıcaklık salınımları canlılığı arttırabilir.
pH	6.0-6.4	Büyüme ortamının pH'ı hem hücre sel proliferasyonu hem de viral veya rekombinant protein üretimini etkilemektedir.
Ozmolarite	250-400 mOsm/kg	Osmolarite değişimlerinden az etkilenirler.
Çözünmüş oksijen Seviyesi	%5-100	Hücre hattına göre değişkenlik göstermektedir.
Spesifik oksijen tüketim hızı	2-11x10 ⁻¹⁷ molO ₂ /hücre.s	Baculovirus ile enfekte olduktan sonra bu değer artmaktadır.
Havalandırma hızı	0.005-0.07 vvm	Yüksek havalandırma hızları kayma gerilimini arttırmaktadır.
Karıştırma hızı	50-80 rpm	Yüksek karıştırma hızları kayma gerilimini arttırmaktadır.
Kayma gerilimi	<1N/m ²	Hidrodinamik etkiler ve havalandırmanın oluşturduğu 1N/m ² 'den yüksek kayma gerilimleri canlılığı azaltabilir.

Hücre içi hidrojen iyonlarının artışı hücre sel metabolizmaya zarar vererek enzim aktivitesini etkilemektedir. Büyüme ortamının pH'ı hem hücre sel proliferasyonu hem de viral veya rekombinant protein üretimini etkilemektedir. Omurgasız hücreler için birçok değer rapor edilmesine rağmen çoğu uygulamada Sf9 ve Sf21 hücre hatlarının çoğunun en iyi çalıştığı pH aralığı 6.0 ile 6.4 arasındadır. Kullanılan üretim ortamları genel olarak CO₂ olmayan denge koşullarında ortamın pH değerini istenilen aralıkta tutmak üzere hazırlanmıştır [22],[23]. Hücre kültürünün pH'nı kontrol edebilmek ve ortam ozmolaritesini arttırmaya katkıda bulunmak için KOH gibi bazlar ortama ilave edilir.

pH kontrolü için eklenen bazlar ortam ozmolaritesini artırır, artan hücre içi solüt konsantrasyonları (Na^+ ya da Cl^-) hücre içi enzim aktivitesini etkileyebilmekte ve bu durum hücre fonksiyonlarının bozulması ile sonuçlanabilmektedir [24]. Böcek hücreleri 250-400 mOsm/kg arasındaki ozmolarite değişimlerine karşı dayanıklıdır. Lepidopteran hücre hatlarında kullanılacak ortamların optimum ozmolaritesi ise 345-380 mOsm/kg'dır. Bu nedenle karbondioksit akümüasyonu ile ortaya çıkan ozmolarite değişimlerinin minimal ya da etkisiz olduğu düşünülmektedir [24].

Omurgasız hücreleri, optimal hücre proliferasyonu ve rekombinant proteinlerin ekspresyonu için çözülmüş oksijen transferine ihtiyaç duyarlar. Hücrelerin çözülmüş oksijen miktarı hücre hattına göre %5-%100 arasında değişmektedir [15],[25]. Spesifik oksijen tüketim hızı ise $2-11 \times 10^{-17} \text{ mol O}_2/\text{hücre.s}$ aralığındadır [25]-[27].

Rekombinant protein ekspresyonu için konakçı olan böcek hücre hatlarının büyük ölçek üretimlerinde başvurulan süspans kültür teknikleri, karıştırılmalı biyoreaktörlerde kullanılan karıştırıcının boyutu ve tipi, hava kaldırma veya püskürtücü (hava dağıtıcı) biyoreaktörlerde gaz kabarcıklarının boyutu, hızı ve kültür yüzeyinde sonuçlanan türbülasyon nedeni ile mekanik kayma gerilimi oluşturur. Kayma geriliminin böcek hücre hatlarında hücre ölümlerine sebep olmaması için tavsiye edilen havalandırma hızı 0.005-0.07 vvm karıştırma hızı ise 50-80 rpm olarak verilmiştir [15],[28]-[31].

Süspans hücre kültürü prosesi sırasında çoğu böcek hücre hattı kayma gerilimine karşı korunmaya ihtiyaç duyar. Kayma gerilimine karşı %5-%20 arasında serum konsantrasyonlarına sahip ortamlar biraz koruma sağlarlar da, tüm süspans kültürlerde Pluronic F 68 gibi kayma gerilimine karşı koruyucu surfaktanlar önerilmektedir [32].

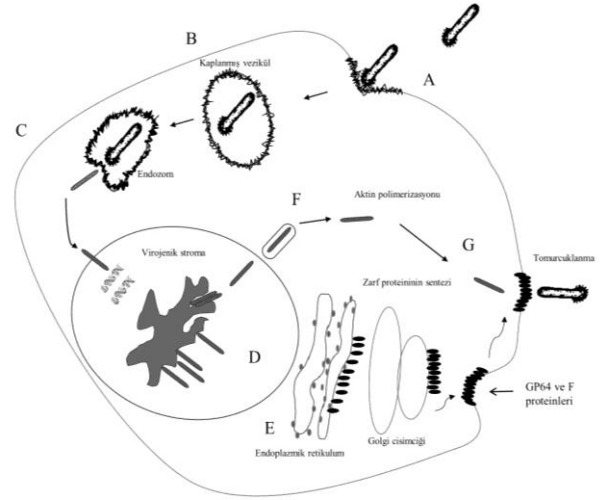
2 Baculovirüsler

Rekombinant proteinler, böcek hücre hatlarının farklı transfeksiyon metotları kullanılarak baculovirüsler (BV) ile transfeksiyonu sonucunda eksprese edilmektedir. BV'ler konakçıları sadece omurgasızlarla sınırlı olduğundan ve böcek kaynaklı oldukları için insan bağışıklık sistemine cevap oluşturmama ve insanlarda patojen olmama gibi özellikleriyle diğer virüs vektörlerine göre gen tedavisinde kullanılmaları açısından avantajlara sahiptirler [33]-[35]. Eklembacaklılardan 800'den fazla BV izole edilmiştir [36],[37]. Bunlardan *Autographa californica* nükleopolihedrovirüs (AcMNPV) ve *Anagrapha falcifera* nükleopolihedrovirüs (AfMNPV) başta olmak üzere birçok BV ayrıntılı bir şekilde çalışılmış ve farklı hücre suşlarında farklı replikasyon özellikleri sergiledikleri, hücrelerin bu virüslere karşı farklı duyarlılık derecelerine sahip oldukları rapor edilmiştir [38],[39].

Genomları prokaryotik ve ökaryotik organizmalardan daha küçük olmasına rağmen, baculovirüsler, gen yapısı ve düzeyleri bakımından bu organizmaların ve memelilerde enfeksiyon yapan virüslerin genomlarına kısmen benzerlik gösterdiklerinden, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmaları için iyi bir model oluşturmaktadırlar [40],[41]. Böceklerde hücreden hücreye enfeksiyonun yayılmasında rol oynayan ve hücre kültürü uygulamalarında kullanılan BV'lerin hücreye girişi ya direkt hücre yüzeyine membran füzyonu ya da zarf füzyon proteini (GP64 ve F) ile gerçekleştirilir [42]. Öncelikle BV virionu, uç kısmında bulunan GP64 proteini vasıtası ile hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanır ve endositoz ile hücreye alınır (Şekil 3).

Asidik olan endositik vezikül protein yapısındaki GP64'ün yapısını değiştirerek virion zarfını bozar böylece nükleokapsid sitoplazmaya salıverilir. Nükleokapsit-nüklear por kompleksinden nükleusa girer. Nükleusta DNA replike olur ve nükleokapsitler virojenik stromada toplanır. Füzyon proteinleri, GP64 ve F sentezlenir endoplazmik retikulumda glikozillenir, taşınır ve golgi aparatları yolu ile sitoplazmik membrana katılır. Nükleokapsitler BV oluşturmak için

nükleustan çıkar GP64 ve F proteinlerinin lokalize olduğu sitoplazmik membrana doğru hareket ederler, buradan tomurcuklanarak zarflarını oluştururlar [43].



Şekil 3: Baculovirusun Sf9 hücresinde replikasyonu. (A): Tomurcuklanan baculovirusun (BV) hücreye girişi, (B): Nükleosit salımı, (C): Nükleokapsitin nükleusa girişi, (D): DNA replikasyonu, (E): zarf proteinlerinin sentezi, (F): BV'un hücreden çıkışı.

3 Böcek Hücrelerinin Baculovirus ile Transfeksiyonu

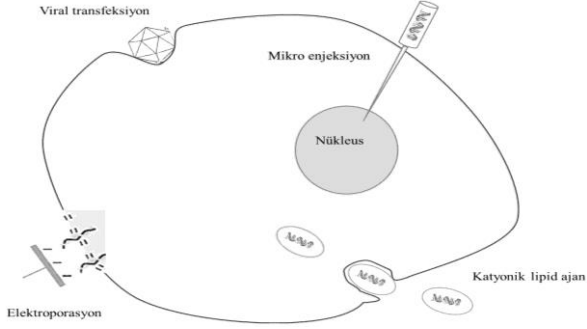
Biyokimyasal veya fiziksel işlemler ile hücelere yabancı nükleik asitlerin aktarılmasına 'transfeksiyon' adı verilmektedir [44]. Transfeksiyon terimi, 'transformasyon' ve 'enfeksiyon' sözcüklerinin birleşmesinden oluşmuştur ve tüm virüsü oluşturmak için hücrelerin virus nükleik asiti ile enfekte olmasına verilen isimdir [45],[46],[47]. Transfeksiyon, rekombinant DNA teknolojisinde, özellikle genden rekombinant protein üretimi, hücre hattı geliştirilmesi, genetik markörlerin hücre hatlarına eklenmesi çalışmalarında ve bir hücrenin protein ekspresyon seviyesini değiştirerek genin fazla ekspresyonunun hücre metabolizmasına etkilerinin araştırılması gibi pek çok kullanım alanına sahiptir [48]. Bu işlemde transfeksiyon verimi açısından dikkat edilmesi gereken üç önemli nokta bulunmaktadır. Bunlar; transfer edilecek DNA'nın yüksek saflıkta olması (kapalı, dairesel ve süper coil yapıdaki DNA templete'i transfeksiyon için istenilen bir yapıdır), transfekte edilecek hücrenin durumu (hücre hattının ihtiyaç duyduğu özelleşmiş besi ortamlarının kullanımı, mikoplazmal kontaminasyon riski açısından hücrelerin test edilmesi, canlılık oranının önerilen oranda olması, hücrelerin logaritmik fazda bulunması ve diğer özel öneriler) ve transfeksiyon metodunun (biyokimyasal, fiziksel veya virüs enfeksiyonuna dayalı) seçimidir [48].

3.1 Transfeksiyon Metotları

Transfeksiyon metotları biyokimyasal ve fiziksel yöntemler olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır.

Biyokimyasal yöntemler; kalsiyum fosfat ko-presipitasyonu, DEAE-dekstran ve polibren, katyonik lipid ajanlar olarak ayrılırken fiziksel yöntemler; elektroporasyon, biyolistik (gen tabancası), mikroenjeksiyon, miknatis yardımıyla transfeksiyon (magnetofeksiyon), optik transfeksiyon olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 4). Bu yöntemler içinde en yaygın

kullanılan yöntem katyonik lipid ajanlar ile yapılan transfeksiyondur [48].



Şekil 4: En çok tercih edilen transfeksiyon metodları.

Hücre kültürlerinde katyonik lipid ajanlar ile DNA transfeksiyonu için orjinal metot, 1993 yılında polikationik bir lipid ajanı ile (lipofektamin, DNA'nın ve RNA'nın hücre içine girmesini sağlayan, özel olarak tasarlanmış katyonik lipidlerden biri olan transfeksiyon ajanı) monokationik bir lipid ajanının yer değiştirmesi ile geliştirilmiştir. Bu metot kompleks yapıdaki lipozomlar ve DNA'nın iyonik etkileşimine dayanmaktadır. Katyonik lipid ajanlar, sulu çözeltilerde küçük tek katmanlı lipozomlar oluştururlar. Lipozomların pozitif yükü nükleik asit ve hücre membranında etkileşmesini sağlar böylece lipozom/nükleik asit/ hücre membran kompleksi (transfeksiyon kompleksi) oluşur (Şekil 4). DNA lipozomların içine enkapsüle olmaz fakat negatif yüklü olduğu için lipozomlara bağlanarak kompleksler oluşturur. Bu kompleks endozomlardan ve lipozomlardan salınır [49].

Katyonik lipozom aracılı transfeksiyon, yüksek verimlilik, çok çeşitli ökaryotik hücre hattını başarılı bir şekilde transfekte edebilme yeteneğine sahip olması ve nispeten düşük toksisite gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca, temel DNA transfeksiyon prosedürünün RNA, sentetik oligonükleotitler, proteinler ve virüsler ile transfeksiyon için adapte edilebilir olması bu yöntemin diğer bir avantajıdır. Ancak kullanılan ajanların fiyatlarının yüksek olması bu yöntemin büyük ölçekli üretimlerde kullanımını kısıtlamaktadır [50].

Piyasada katyonik lipozom transfeksiyonu amacıyla kullanılan birçok ajan mevcuttur. Bunlar pek çok böcek ve memeli hücrelerini DNA ya da RNA ile transfekte etmekte kullanılırlar. Sf9 hücrelerinin transfeksiyonunda çok iyi sonuçlar veren katyonik lipid ajanlardan en çok tercih edilen Cellfectin®'dir. Transfeksiyon süresince antibiyotikli ortam kullanılması hücre ölümüne neden olduğu için antibiyotiksiz üretim ortamı tercih edilmelidir. Bunun yanı sıra serum içeriğinde bulunan proteinlerin Cellfectin® ajanı ile etkileşime girmesi ve transfeksiyonun gerçekleşmesini zorlaştırması gibi riskleri olması nedeni ile serumsuz ortam tercih edilmelidir. Ayrıca bacmid DNA, hücre ölümüne neden olabilecek fenol ve lipid kompleks ajanlarla etkileşime girerek transfeksiyon verimini düşürebilecek NaCl'den arındırılmış ve saf olmalıdır.

Transfeksiyonun optimizasyonunda hücre sayısı, transfeksiyon yöntemi, kullanılan ajan çeşidi, katyonik lipid ajan kullanılan transfeksiyonda lipid/DNA etkileşiminin süresi, transfeksiyon süresi gibi etkenler kontrol edilmelidir [50].

Diğer metodlar içinde kalsiyum klorür, DNA ve fosfat tamponu karıştırıldığında içerisinde DNA'yı hapsetmiş küçük çözünmeyen kalsiyum fosfat partikülleri oluşmaktadır. Bu partiküller hücre membranına tutunmakta ve fagositozla hücre içerisine alınmaktadır [48]. Pozitif yüklü dekstran

polimerleri ve polibren ile negatif yüklü DNA'nın oluşturduğu kompleksler, gliserol ve DMSO varlığında ozmotik şoka giren ve membranları açılan hücelere bağlanmaktadır. Bu yöntem kalsiyum fosfat tabanlı metoda göre daha ucuz, hızlı ve basit olmasının yanında çok sayıda hücre hattında uygulanabilmektedir. Ancak, bu polimerler pek çok hücre hattı için toksik olduğundan stabil hücre hatlarının seçimi için uygun bulunmamaktadır.

Fiziksel bir transfeksiyon metodu olan mikroenjeksiyon embriyo çalışmalarında çok başvurulan yöntemlerden biridir, epifloresanlı mikroskop altında görüntülenen nükleusa mikroenjeksiyon iğneleri yardımıyla DNA transferi yapılmaktadır [51]. Elektroporasyon yönteminde ise yüksek voltajlı elektrik şokları ile hücre membranında makromoleküllerin geçişine izin verebilecek büyüklükte porlar oluşturulmakta ve DNA'nın pek çok doku ve hücreye etkili bir şekilde transferi sağlanmaktadır, memeli dokularında başarılı sonuçlar elde edilmiştir [52]. Viral transfeksiyon metodu için retrovirusler ve DNA virüslerine (adenovirus gibi) ait RNA genomları, çift sarmallı DNA kopyalarını oluşturmada ve bu kopyaları konakçı hücreye aktararak konakçının kromozomlarına entegre olabilmektedir.

Transfeksiyon işlemi kalıcı (stabil) ya da geçici (transient) olabilmektedir. Geçici transfeksiyon kısa sürelidir ve transfeksiyondan sonra kısa süreli kullanılabilir. Bu tip transfeksiyonlarda hücre içine transfer edilen cDNA, 1-3 gün ekspresyonunu sürdürmektedir. Daha sonra transfekte hücreler lizise uğratarak proteinler analiz edilmekte böylece genden protein ekspresyonuna günler içinde ulaşılabilme ve ilgilenilen genin ekspresyonu test edilebilmektedir [46]. Kalıcı transfeksiyonda ise aktarılan gen hücre genomuna katılmakta ve diğer hücelere de bu gen aktarılmaktadır. Bunun için hedef hücelere genellikle eksprese olması istenen genin yanı sıra, hücreye belirli bir seçim özelliği kazandıracak başka bir gen ile birlikte transfeksiyonu sağlanmaktadır. Bu seçim vektördeki antibiyotiğe dirençliliği sağlayan antibiyotik direnç geni ile gerçekleştirilebilmektedir [50].

4 Büyük Ölçekte Sf9 Hücresi Üretimi ve Rekombinant Protein Ekspresyonu

Baculovirus-böcek hücre kültürü sistemleri kullanılarak rekombinant protein üretimi iki basamaktan oluşmaktadır. Bunlar böcek hücrelerinin büyüme özelliklerinin belirlenmesi ve rekombinant baculovirus ile enfekte hücrelerin protein eksprese etmesidir [53],[54].

Bu sistemin yaygın olarak kullanılmasındaki temel faktör, böcek hücrelerinin post-translayonel olarak modifiye edilmiş ökaryotik proteinleri büyük miktarlarda ve kısa periyotlarda üretebiliyor olmasıdır. Böcek hücre kültürlerinin diğer bir avantajı da serumlu ya da serumsuz ortamlarda süspanse halde üretilebilmesidir [15]-[17].

4.1 Sf9 Hücresinin Büyük Ölçekte Üretimi

Sf9 hücrelerinin büyük ölçekte üretimi için öncelikle küçük ölçekte hücre canlılığı, hücre yoğunluğu, spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi gibi Sf9 hücresinin üreme kinetiğini belirlemek için tasarlanan denemeler yapılmakta ve bu ön denemelerden sonra öncelikle çalkalamalı kültür ile başlayan ölçek büyütme işlemi uygun hücresel yoğunluğa ($3-55 \times 10^6$ hücre/ml) ulaşıldığında biyoreaktöre transfer edilmektedir.

4.2 Sf9 Hücresi ile Protein Üretimi İçin Kullanılan Operasyon Modları

Rekombinant baculovirus ve proteinler kesikli, kesikli beslemeli ve sürekli üretim modlarında üretilmektedir. Ancak basit, esnek ve litik enfeksiyon döngüsü içeren bir proses için uygun olması sebebi ile kesikli ve kesikli beslemeli operasyon modları daha yoğun olarak tercih edilmektedir. Böcek hücrelerinin tipik üretim süreci küçük hacimde kesikli üretimin tedrici olarak daha büyük ölçeğe adaptasyonunu içermektedir. Hücreler maksimum hücre yoğunluğuna kadar geliştirilmekte ve ardından taze üretim ortamı içeren daha büyük bir ölçeğe steril şartlar altında transfer edilmektedir.

Kesikli üretim modunda elde edilebilecek hücre yoğunluğu limitlidir çünkü üretim ortamındaki besinlerin hızla tüketimi söz konusudur. Yüksek bir hücre yoğunluğu elde etmek istendiğinde biyoreaktörün üretim kapasitesini olabildiğince büyütmek. Çalışmalar göstermiştir ki Sf9 hücre konsantrasyonu tipik bir ortam için kesikli kültürde 3-5 x10⁶ hücre/ml'ye ulaşabilmektedir. Glukoz, glutamin ve/veya yeastolat rekombinant ürün verimini zenginleştirebilir ve hücre yoğunluğunu en az %50 oranında arttırmak için kullanılabilir.

Kesikli beslemeli üretim ile taze üretim ortamı belirli aralıklarla ortama ilave edilmekte ve hücre yoğunluğunu arttırmaktadır. Böylece besinlerin hücre tarafından hızlı tüketimi sonucu oluşabilecek olumsuzluk ortadan kaldırılabilir. Ulaşılabilen maksimum hücre yoğunluğu literatürde 10x10⁶ hücre/ml olarak belirtilmiştir [55].

Perfüzyon kültür modunda ise biyoreaktör sürekli olarak taze ortam ile beslenmekte ve aynı akış hızı ile üretilen protein biyoreaktörden uzaklaştırılmaktadır. Bu sırada hücreler biyoreaktör içinde membran filtreler ile alıkonmaktadır. Bu üretim modunun uygulanması kesikli beslemeye ve kesikli üretime göre daha zor olmasına rağmen ulaşılan en yüksek hücre yoğunluğunun 55x10⁶ hücre/ml olması nedeniyle ticari rekombinant protein üretiminde tercih edilmektedir [56].

Hücre yoğunluğunun artırılması için gelişim aşamasının sonlarına doğru ortamın %80'inin her gün değiştirilmesi ile yapılan kesikli operasyon modu ile elde edilen en yüksek hücre yoğunluğu 12-16 x10⁶ hücre/ml olarak belirlenmiştir. Bu yöntem ile kılcal boru teknolojisi kullanılarak (gözenek çapı 0.2 µm) harcanan ortamın çoğunun uzaklaştırılması ve taze ortamın biyoreaktöre eklenmesi gerçekleştirilmektedir [57].

İstenilen hücre yoğunluğu elde edildikten sonraki temel gereklilik; uygun metot ve virus titresi ile enfeksiyonun başarılmasıdır. Bu nedenle baculovirus ile enfekte edilen böcek hücrelerinden protein ekspresyonu için çok basamaklı biyoreaktör sistemleri kullanılmaktadır. Çok basamaklı biyoreaktör sistemlerinde genellikle kesikli beslemeli, yarı sürekli ve sürekli operasyon modları ile çalışılmaktadır. İlk biyoreaktör, hücreleri üretmek ve sıradaki biyoreaktörler enfeksiyon için kullanılmaktadır. Kesikli beslemeli operasyon modunda hücreler üretim biyoreaktöründe üretildikten sonra bir enfeksiyon tankına pompalanmakta ve bu tank içinde virus ile inoküle edilmektedir. Hücre üretim biyoreaktörüne taze ortam eklenebilmekte ve yeni bir kısım hücre bırakılabilmektedir. Benzer şekilde ilk enfeksiyon biyoreaktörünün bir kısım içeriği yeni hücreleri inoküle etmek için kullanılabilir [58],[59]. Ancak modelleme çalışmaları göstermiştir ki kesikli beslemeli sistemin

verimliliği pasaj etkisi sonucu mutant virüslerin oluşması nedeni ile azalmaktadır [60],[61].

Yarı sürekli üretim hücre üretim biyoreaktörünün sürekli üretim modunda çalışması ve ikinci biyoreaktörün tedrici olarak doldurulması ile yapılmaktadır [62]. İkinci biyoreaktörün dolmasını takiben biyoreaktöre virus eklenir. Enfeksiyon prosesinin sonunda ikinci biyoreaktör kısmen ya da tamamen boşaltılır, yeniden doldurulur ve enfeksiyon döngüsü tekrarlanır. Enfeksiyon biyoreaktöründeki üretim ortamı, hücrelerin ultrasantrifugasyonu, membran filtrasyon ya da çöktürme yöntemleri ile ortamdaki ayrılması sonrası biyoreaktöre beslenebilmektedir. Besin elementleri enfeksiyon basamaklarında tamamen tüketilmediği için tüm ortamın değişmesi gerekli olmayabilir.

Sürekli sistemlerde hücre, üretim biyoreaktöründen enfeksiyonun gerçekleştiği ve baculovirus ya da rekombinant ürün içeren biyoreaktöre beslenir. Sürekli sistem kullanılarak yapılan bir çalışmada her basamakta 60 saat alıkonma süresi uygulanmış ve rekombinant protein üretimi yaklaşık 4 hafta devam ettirilmiştir. Her hücrede 200 civarında baculovirus üretildiği ve enfeksiyonun gerçekleştiği biyoreaktörde virüsün tedrici akümüasyonu rapor edilmiştir. 4 hafta sonunda oluşan mutasyon rekombinant protein verimliliğinde önemli azalmalara ve enfeksiyöz virus, hatalı virus (defektif virus), verimsiz virus (abortif virüs) gibi mutasyonlara yol açtığı bildirilmiştir [60],[63]. Bu nedenle sürekli bir biyoreaktör sistemi rekombinant protein ve baculovirusun üretimi için uygulanabilir görülmemektedir. Mutasyonların engellenebilmesi için 30 günden daha az periyotlarda üretim yapılmalıdır. Bu biyoreaktör sürekli katalitik bir biyoreaktör analogudur ve kataliz operasyon süresince tedrici olarak deaktive edilmek ve yeni katalist ile periyodik olarak yeniden yüklenmek zorundadır. Bu deaktivasyon işlemi için biyoreaktör kapatılmakta ve taze virus ile tekrar başlatılmakta ya da enfeksiyon biyoreaktörüne taze virüsün ikinci beslemesi sağlanmaktadır [64].

Sürekli sistem, kesikli ya da kesikli beslemeli ile karşılaştırıldığında üründen elde edilen rekombinant protein verimi düşük olabilmesine rağmen böcek hücre kültürünün ve rekombinant ürünün kesikli sistemden daha büyük hacimler için kurulmasını sağlamaktadır. Sürekli kültür prosesinde yapılan uygulamalardan bir diğeri hücre üretimi için kullanılan sürekli karıştırmalı tank biyoreaktörünü (CSTR) izleyen enfeksiyon için tübüler bir biyoreaktör kombinasyonudur. Tübüler biyoreaktör baculovirusun iki basamaklı CSTR'de pasaj etkisi olmaksızın yüksek enfeksiyon katsayısında sürekli beslenmesini sağlamaktadır [61].

Bu dizisel süreçler besin elementlerinin tükenmesi, hücre canlılığının azalması ve rekombinant proteinlerin akümüasyonu ile belirlenen optimum proses zamanları dikkate alınarak uygulanmaktadır.

4.3 Sf9 Hücresinin Büyük Ölçekte Üretimi için Kullanılan Biyoreaktör Sistemleri

Pek çok biyoreaktör çeşidinin kullanılmasına karşın büyük ölçekte baculovirus ve rekombinant protein üretimi için hava kaldırmalı biyoreaktörler ve karıştırmalı tank başarı ile çalışılmıştır. Bu biyoreaktörler tipik olarak cam, polikarbonat ya da paslanmaz çelik tanklardan yapılmaktadır [61].

Hava kaldırmalı biyoreaktörde, biyoreaktörün dibinden hava ya da oksijenin enjeksiyonu ile yaratılan taşıyıcı güç sıvı sirkülasyonunu sağlamaktadır. Hava kaldırmalı biyoreaktör

içinde bulunan draft tüp sıvı ortamın sirküler akışını sağlamak için hava/oksijen ve sıvı ortamı biyoreaktörün üstüne taşımaktadır [65]. Hava kaldırmalı biyoreaktörlerde ölçek büyüme için biyoreaktörün sabit yüksekliğinin çevresine oranı göz önünde bulundurulmaktadır. Bu oran hava kaldırma fonksiyonuna izin vermesi için önem taşımaktadır. Bu durum büyük biyoreaktör hacimleri için boy ve en oranlarının yüksek olmasına neden olabilmektedir.

Karıştırmalı tank biyoreaktör sistemi hava kaldırmalı biyoreaktör sistemine göre nispeten daha kolay hayata geçirilebilmekte ve pek çok farklı boyutları kullanılabilir. Ancak, karıştırmalı tank, kullanılan karıştırıcı tipine bağlı olarak değişmekle beraber yüksek kayma gerilimi oluşturabilmektedir. Böcek hücreleri özellikle enfeksiyondan sonra kayma gerilimine karşı oldukça hassastır. Kayma gerilimi yaratmadan kütle transferini sağlamak için karıştırıcının yerine çalkalayıcının kullanıldığı Wawe@ biyoreaktörler (5 litreden 100 litreye kadar) böcek hücrelerinin üretimi için kullanılabilir (Şekil 5).



Şekil 5: Sf9 hücresinin büyük ölçekte üretimi için kullanılan biyoreaktör sistemleri. (a): Dalga biyoreaktör (0.1-500 L; GE Healthcare Life Sciences), (b): Karıştırmalı tank biyoreaktör (0.5-50 L; New Brunswick), (c): Mikrotaşyıcı (GE Healthcare Life Sciences), (d): Döner şişeler (100-1000'lük flasklar için, Cellspin-Integra), (e): Hava kaldırmalı biyoreaktör (5-10 L, FerMac).

High five gibi hücre hatlarının ise süspansiyon kültüründeki kümelenmesi yaygındır. Bu nedenle hücre büyümesine ve enfeksiyonuna izin veren biyoreaktör konfigürasyonları geliştirilmiştir [66],[67]. Bu hücre hatları tipik olarak döner (roller) şişelerde ya da mikrotaşyıcılar ve cam boncuklar gibi destek materyallerinde geliştirilmektedir. Destek materyalleri hava kaldırmalı biyoreaktör ya da tutundurulmuş (immobilize) perfüzyon konfigürasyonları ile kullanılabilir (Şekil 5). Bunlara ek olarak, oksijeni membran tüp sisteminden sağlayan biyoreaktörler kullanılmış ancak bunlar biyoreaktör boyutu arttıkça etkili kütle transportu için ihtiyaç duyulan tüp sistemi miktarını arttırması nedeni ile büyük ölçek hücre kültürüne uygulanamamıştır [25].

4.4 Büyük Ölçekte Enfekte Sf9 Hücreleri Ve Rekombinant Protein Ekspresyonunu Etkileyen Faktörler

Böcek hücrelerinin baculovirüs ile enfeksiyonu kompleks bir süreçtir ve hücrelerin fizyolojik ve çevresel koşulları ile yakından ilişkilidir. Enfeksiyon sonrasında solunum, transkripsiyon ve translasyon gibi diğer hücresel aktiviteler devam ederken enfekte hücrelerin bölünmesi durur, viral çoğalma ve ekspresyon başlar. Bu nedenle, yüksek viral titreye ulaşabilmek ve rekombinant protein üretiminin optimizasyonu için hücrelerin fizyolojik durumunun sağlıklı olması ve besleyici bir çevrede bulunmaları oldukça önemlidir.

Büyük ölçekte enfekte Sf9 hücreleri ve rekombinant protein ekspresyonunu etkileyen faktörler içinde kültür yaşı (pasaj no), inokulum yaşı (ön kültürdeki inokulumun büyüme fazı), hücrelerin büyüme fazı, ortam kompozisyonu, polielektrolitler, pH, sıcaklık, oksijen transferi, virus titresi (MOI), enfeksiyon sırasındaki hücre konsantrasyonu, pasaj etkisi, kullanılan ortamın oranı ve baculoviruslerin stoklanma şekli gibi faktörler hem metabolik aktiviteyi hem de hücrelerin enfeksiyon aktivitelerinin hızını etkilemektedir (Tablo 4). Bunlar içinde en dikkat çeken baculovirus titresinin optimize edilmesi ile maksimum protein ekspresyonu sağlanabilir. Farklı baculovirus titreleri ile yapılan çalışmalarda en yüksek ürün miktarının erken eksponansiyel fazda düşük MOI ile yapılan enfeksiyon değerlerinde elde edildiği ve genel olarak düşük MOI değerlerinde elde edilen ürün verimlerinin yüksek MOI değerlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir [68],[69]. Düşük MOI değeri ile yüksek rekombinant protein elde edilmesi proses ekonomisi açısından oldukça önemli bir avantajdır. Üretim ortamına enfeksiyon sırasında eklenen Ancak üretim ortamında bulunan iyonlar, polielektrolitler, pH ve sıcaklık değişimleri virüslerin hücrelere tutunmasını etkilemektedir [54]. Glukoz, glutamin ve yeastolate gibi besin elementleri de rekombinant protein üretim hızını arttırmaktadır.

Tablo 4: Rekombinant protein ekspresyonunu etkileyen faktörler.

Koşullar	Değerler	Özellikler
Virus titresi	Düşük (<10) Yüksek (≥10)	Virus titresi hücre hattına göre değişkenlik gösterir genel olarak yüksek titreler (MOI=10) canlılığı etkilemektedir.
Kültür yaşı (pasaj no)	Düşük (30-40) Yüksek (100)	Pasaj sayısının yükselmesi büyüme kinetiğinde kaymalara neden olmaktadır. Yüksek pasaj sayıları rekombinant protein üretimini teşvik etmektedir [70].
Hücre konsantrasyonu	<50x10 ⁶ hücre/ml	Yüksek hücre yoğunluğu enfeksiyondan sonra hedef proteinin üretiminde azalmaya neden olmaktadır [71].
Spesifik oksijen tüketim hızı	Üretimden 1-4 kat daha yüksek	Enfeksiyon ile beraber spesifik oksijen tüketim hızı artmaktadır [72].

Ortama verilen oksijen miktarı protein ekspresyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Bhatia ve diğ. çözülmüş oksijen konsantrasyonunun nispi olarak artırılmasının böcek hücrelerinin protein biyosentezi esnasında hücre başına ihtiyaç duyduğu ATP miktarının artmasına bağlı olarak daha yüksek rekombinant protein verimliliği sağladığını belirtmektedir [73].

4.5 Büyük Ölçekte Sf9 Hücreleri ile Rekombinant Protein Üretimi için Kullanılan Biyoreaktör Ekipmanları

Baculovirus ile böcek hücrelerinin enfeksiyonu sırasında hücrelerin canlılığı ve yaşı kadar kullanılan ekipmanların malzeme bilgileri ve dizaynları da önem taşımaktadır. Laboratuvarlarda kullanılan pilot ölçekli karıştırmalı biyoreaktörler sıcaklığa dayanıklı silika borat camlardan yapılırken büyük ölçekli üretimlerde genellikle paslanmaz çelik tanklar kullanılmaktadır [30]. Pilot ölçekli biyoreaktörlerin tepe kısmı, bağlantıları ve karıştırıcıları genellikle ostenitli çelik ya da bazı durumlarda polietereeterketon (PEET)'den yapılmaktadır. Pilot ve üretim ölçekli reaktörlerdeki ostenitli çelik genellikle 316 ya da 316L kalitesindedir. İyi üretim uygulamaları (GMP) koşullarında üretim için 316 L, elektroparlaklık ve kaynaşma özelliği gösterdiğinden tercih edilmektedir [15].

4.5.1 Havalandırma Çeşitleri ve Hava Püskürtücüler (Hava Dağıtıcılar)

Böcek hücre hatları kullanılarak rekombinant protein üretimi oksijen transferi gerektiren bir prosestir ve bu nedenle havalandırma önem taşımaktadır. Biyoreaktörlere verilen hava tipik olarak karıştırıcının altındaki bir pozisyondan biyoreaktöre doğru, hava enjeksiyonu ya da oksijen miktarını sınırlandırmak için tepe boşluğundan verilmektedir. Oksijen transferini sağlayabilmek için hava püskürtücülerinin kullanılması durumunda hava püskürtücülerinin gözenek çapları 0.4 mm ve 0.8 mm arasında ya da daha büyük olmalıdır. Bu boyuttan daha küçük olan gözeneklerde, uygun kabarcık büyüklüklerinin oluşturulabilmesi için daha fazla hava basıncına ihtiyaç duyulmaktadır ve bu durum özellikle büyük ölçekli üretimlerde proses ekonomisini etkilemektedir. Hayvan hücre kültürü çalışmalarında üretim ortamı, yüzey havalandırma, direkt havalandırma, indirekt havalandırma, kısmi oksijen basıncının artırılması ve atmosfer basıncının artırılması gibi sistemler ya da bu sistemlerin kombinasyonları kullanılarak havalandırılabilir [15],[74].

Yüzey havalandırmada, kütle transferi sıvı yüzeyinden gerçekleşir. Kütle transfer hızı etkili bir ara yüzey alanı oluşturulmalı ve ara yüzeye ya da sıvı yüzeyine yakın bir konuma ikinci bir karıştırıcı yerleştirilmelidir. Ancak yüzey havalandırma sadece düşük yoğunluktaki hücre kültürleri ve küçük reaktörler için yeterli oksijen sağlayabilir [15]. Direkt havalandırma ise, biyoreaktörlerde oksijen sağlayabilmek için kullanılan en yaygın ve en basit yol olarak bilinmektedir. Tipik olarak oksijenin ya da havanın hava kaldırmalı ya da karıştırmalı bir biyoreaktörün dibine püskürtülmesi ile yapılan havalandırmadır. Etkili bir kütle transfer alanı sağlamak için hava küçük deliklere itilir ve kabarcıklar yaratılır, oksijen gazdan sıvıya kabarcıklar olarak transfer edilir ve biyoreaktörde yükselir. Karıştırıcının dönüşü kütle transferine elverişli yüzey alanını arttırmak için kabarcık dağılımını zenginleştirir [75]. Direkt havalandırma hücre hasarına ve kültürde köpük oluşumuna neden olmakta buna

rağmen pek çok hücre tipi kabarcık kolon, hava kaldırmalı veya havalandırmalı-karıştırmalı biyoreaktörlerde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Oksijen ya da havanın püskürtülmesi böcek hücrelerinde süspansiyon hayvan hücrelerindeki kadar zarara neden olabilmektedir [76],[77]. Bu hücre zararları temel olarak hücrelerin tutunduğu gaz kabarcıklarının gaz-sıvı ara yüzeyinde patlamasından kaynaklanmaktadır.

Ara yüzey alanı (a), oksijen kütle transfer katsayısına (k_{La}) etkilediği için kabarcık boyutu küçüldükçe oksijen transfer hızı artmaktadır. Aynı zamanda, kabarcık birleşmesi de göz önünde tutulması gereken bir başka durumdur. Püskürtücü delikleri ya da gözeneklerinin etkisi düşük havalandırma hızlarında hücrelerin oksijen alabilmesi için oldukça önemlidir. Havalandırma hızını arttırmak kabarcık birleşimine neden olduğu için havalandırma etkinliğinin (k_{La}/v) azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle gaz kabarcıklarından oluşan kayma geriliminin etkisini azaltmak için oksijen ile zenginleştirilmiş hava beslenmesi gerekmektedir. Özel seramik mikro hava dağıtıcıların kullanımı ile homojen kabarcık boyutu (100-800 μm) ve ortam içerisinde kabarcıkların homojen dağılımı sağlanmaktadır [78]. Bu sırada, lokal gaz tutumu azaldığı için kabarcık birleşmesi de azalmaktadır. Protein içeren ortamlarda ara yüzeylerde bulunan protein, özellikle küçük kabarcıklarda, kütle transferini engellenmektedir. Çünkü aynı zamanda köpük oluşumunda artış meydana gelmekte ve bu da kabarcık birleşimlerinin artmasına neden olmaktadır.

Kütle transferi karıştırma ile artırılabilir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde hava kaldırmalıya nazaran daha düşük hızlarda havalandırma yapılmalıdır. Büyük ölçekli hayvan hücre biyoreaktörlerinde, kabarcık kolon biyoreaktörleri için gaz akış hızı 1 vvh ve havalandırmalı-karıştırmalı biyoreaktörler için ise 0.1-0 vvh arasındadır. Bu düşük havalandırma hızları, köpük kırıcı ve kayma gerilimi koruyucu ajanlarının kullanımını azaltmaktadır [15],[79]-[82].

Böcek hücre kültürü ortamında kabarcığın biyoreaktör içinde yükselmesi süresince hücre-kabarcık etkileşimlerini incelemek için yüksek hızlı video mikroskopisi çalışmaları yapılmıştır [77],[83]. Hücrelerin tek başına ya da kümeleşerek yükselen kabarcığa tutunduğu ve sıvının üst kısmına taşındığı gözlenmiştir. Bu hücreler besi ortamının yüzeyindeki köpük tabakasında yüksek konsantrasyonda akümüle olmaktadır. Kabarcıkların gaz-sıvı ara yüzeyinde patlaması, fıskıran sıvının yukarı ve aşağı doğru ilerlemesine ve kabarcığa tutunan böcek hücrelerini öldürmek ve zarar vermek için yeterli büyüklükte kayma gerilimi oluşumuna ($\geq 5 \text{ N/m}^2$) sebep olmaktadır. Aşağı ve yukarı doğru ilerleyen sıvılarda kabarcıkların patlaması nedeniyle her patlamada Sf9 hücrelerinin %75'inden fazlasının, yaklaşık 1200 tane, öldüğü tespit edilmiştir [75].

Hücre zararlarının çoğu Pluronic F 68 gibi polimer surfaktanların ortama ilave edilmesi ile önlenebilmektedir. Bu ajanın ortama ilavesi %0.1-0.2 civarında olmalıdır [83],[84]. Pluronic F 68'in ortama eklenmesi hücrenin kabarcıklara tutunmasını ve sıvı yüzeyinde kabarcık patlamasının hücre ölümüne sebep olmasını engellemektedir. Polimerik surfaktanlar hücrelerin kabarcıklara tutunmasını gaz-sıvı ara yüzeydeki yüzeyler arası gerilimi azaltması ile önleyebilmektedir. Ancak, bu surfaktanların kullanımı hücre ile etkileşimleri membran geçirgenliğini ve hücre parçalanmasını etkileyebileceği için sınırlandırılmıştır. Metilselüloz, serum, karboksimetilselüloz, sığır serum albumini ve desktran gibi surfaktanlar bulunmasına rağmen

böcek ve memeli hücreleri için hazırlanan pek çok ticari serumsuz hücre kültürü ortamı Pluronic F-68 içermektedir [75],[85].

Hücre kültür ortamlarının kabarcık içermeyecek şekilde havalandırılması işlemi membran havalandırma olarak isimlendirilmektedir. Burada açık-porlu membranlar veya difüzyon membranları kullanılmaktadır. Membran havalandırmanın avantajları, hücreleri mikrohava dağıtıcı etkisiyle oluşan kayma gerilimine karşı koruması ve köpük oluşumunu engellemesidir. Ancak, prosesin karmaşıklığı, limitli tasarım verilerinin olması, büyük membran alanına ihtiyaç duyulması ve bakımı-temizlenmesinin zor olması gibi birtakım dezavantajları bulunmaktadır [80],[86],[87]. Şekil 6'da seramik mikropüskürtücü ve membran püskürtücüler verilmiştir. Bazı literatürler havalandırma için kullanılan püskürtücü çeşitlerinin böcek hücrelerinin gelişimi ve canlılığı üzerine etkileri konusunda birbiri ile çelişmektedir. Jain ve diğ. [88] ve Caron ve diğ. [89] havalandırma için kabarcıksız silikon tüp, mikropüskürtücü ve orifis püskürtücünün kullanılmasının Pluronic F 68 ilaveli ortamda Sf9 hücrelerinin gelişim karakteristiklerini etkilemediğini rapor etmesine karşın Blanchard and Ferguson [90] çalışmasında SF II 900 SFM serumsuz %0.1 (w/v) Pluronic F-68 içeren ortamda hava püskürtmenin silikon tüp kullanılarak gaz verme işlemine kıyasla enfekte olmamış Sf9 hücrelerinin canlılığına negatif etkisi olduğunu bildirmiştir.



(a)

(b)

Şekil 6: (a): Seramik mikropüskürtücü ve (b): Silikon membran havalandırma sistemi (Springer images, 2011).

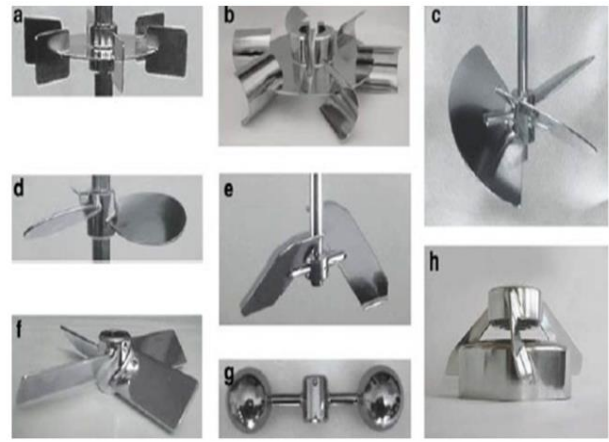
Bu etkiye neden olan faktörlerin mikropüskürtücünün tipi, por büyüklüğü, havalandırma hızı ve ortaya çıkan kayma gerilimi olduğu açıklanmıştır. Pek çok çalışma grubu büyük ölçek üretim için rutin olarak karıştırma tank ya da hava kaldırma biyoreaktör ve bunların ekipmanlarını kullanmaktadır [91]. Karıştırma tank biyoreaktörlerde yapılan büyük ölçekli böcek hücreleri üretimlerinde halka püskürtücü sıklıkla karşılaşılan püskürtücü çeşidi olmuştur. Bu püskürtücü hava ve/veya oksijen hızı ve karıştırıcı hızı birlikte biyoreaktör ortamında oluşan kayma geriliminden sorumludur [92].

4.5.2 Karıştırıcı Seçimi

Kültür ortamının uygun şekilde karıştırılması, hücrelerin, besinlerin, sıcaklığın ve pH gibi etkenlerin homojen dağılımı için oldukça önemlidir. Silindirik tank bir ya da daha fazla karıştırıcı içerebilir. Süspanse kültürlerde genellikle marin, pedal veya segmentli tipte ve aksiyel karıştırma sağlayan karıştırıcı tipleri mevcuttur. Ayrıca büyük karıştırıcı ($D_{\text{karıştırıcı}}/D_{\text{tank}} \geq 0.5$), daha iyi homojenizasyon sağlarken hücre hasarını da azaltmaktadır. Karıştırma hızı genellikle

çalışma hacmine bağlı olarak 50-80 rpm arasında değişmektedir [15],[30],[31]. Ayrıca hücrelerdeki mekanik hasarı azaltmak ve daha homojen karıştırma sağlayabilmek için bıçaklar arası çap ve bıçak tipi değiştirilebilmektedir.

Böcek hücreleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde karıştırıcı tiplerinden kullanım sıklığına göre sırasıyla eğimli çark (*pitched blade*), marin ve Rushton tiplerinin tercih edildiği görülmektedir. Şekil 7'de farklı karıştırıcı tipleri görülmektedir. Seçilecek olan karıştırıcının, yüksek karıştırma kapasitesi ile birlikte düşük kayma gerilimi oluşturması ve güç aktarımının 1 kw/1.000 L'den az olması gerekmektedir. 3 bıçaklı segment karıştırıcılar, düşük karıştırma hızlarında bile homojen karıştırma ve ayrıca bıçaklar arası yaklaşık 45° açı bulunduğu eş zamanlı aksiyel ve radyal akım oluşturmaları. Bununla birlikte marin karıştırıcıya göre daha iyi bir karıştırma ve yüksek kıla sağlamaktadırlar [31].



Şekil 7: Biyoreaktörlerde kullanılan çeşitli karıştırıcı tipleri (Doyle and Griffith, 1998). (a): 6 bıçaklı turbin, Rushton turbin karıştırıcı, (b): Hollow bıçaklı karıştırıcı, (c): 3 bıçaklı segment karıştırıcı, (d) Marine karıştırıcı, (e): 2 bıçaklı segment karıştırıcı, (f): Yamuk bıçaklı karıştırıcı, (g) Küre, (h): İki m karıştırıcı.

Karıştırma havalandırmaya ek olarak pek çok püskürtmeli biyoreaktörde hücre zararlarına sebep olan bir diğer faktördür. Süspanse hücreler gaz-sıvı ara yüzey ortadan kaldırıldığı zaman sıklıkla yüksek karıştırma hızlarını tolere edebilmektedir. Karıştırma kaynaklı hücre zararı Kolmogorov girdaplarının oluşumu nedeniyle meydana gelebilmektedir [93],[94]. Hücre zararını önlemek için biyoreaktör havalandırma ve karıştırma hızlarının kullanılan karıştırıcı dikkate alınarak optimize edilmesi ve oluşan kayma geriliminin hücre zararına yol açmayacak bir aralıkta tutulması gerekmektedir. Büyük ölçekte, endüstriyel üretimler için, yapılan çalışmalarda karıştırma tank ile birlikte hücre gelişimi ve enfeksiyonu için genellikle Rushton tip karıştırıcılar uygulanmıştır.

Metin içinde temel hatları ile ele alınan konulara ek olarak özellikle viral vektörlerin, böcek hücre hatlarının ve biyoreaktörlerin tasarımındaki gelişmeler, protein katlanmalarını, ekspresyonlarını daha yüksek verim ve daha güvenli laboratuvar ekipmanları ile gerçekleştirmeye imkân verebilmektedir. Bu nedenle rekombinant protein üretimi için böcek hücrelerinin baculovirus ile transfeksiyonuna önümüzdeki yıllarda ilginin çok fazla olacağı öngörülmüştür.

5 Kaynaklar

- [1] Cino J. "High Yield Protein Production from *Pichia pastoris* Yeast: A Protocol or Benchtop Fermentation". *American Biotechnology Laboratory*, 17, 10-13, 1999.
- [2] Bağış H. "Transgenik Biyoreaktörlerde Rekombinant Proteinlerin Üretimi". *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(1), 113-123, 2002.
- [3] Üstün-Aytekin Ö, Gürhan İD, Ohura K, Imai T, Öngen G. "Monitoring of the Effects of Transfection with Baculovirus on Sf9 Cell Line and Expression of Human Dipeptidyl Peptidase IV". *Cytotechnology*, 66(1), 159-168, 2014.
- [4] TÜBİTAK. "Vizyon 2023 Projesi Biyoteknoloji ve Gen Stratejileri Grubu, Biyoteknoloji ve Gen Teknolojileri Stratejisi". <http://vizyon2023.tubitak.gov.tr> (10.03.2014).
- [5] Goldschmidt R. "Some Experiments on Spermatogenesis in Vitro". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1(4), 220-222, 1915.
- [6] Grace TDC. "Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissue Grown in Vitro". *Nature*, 195, 788-789, 1962.
- [7] Lynn DE. "Development of Insect Cell Lines: Virus Susceptibility and Applicability to Prawn Cell Culture". *Methods in Cell Science*, 21, 173-81, 1999.
- [8] Granados RR, McKenna KA. "Insect Cell Culture Methods and Their Use in Virus Research". *Baculovirus Expression Systems and Biopesticides*, Wiley-Liss, New York, USA, 1995.
- [9] Mitsuhashi J. *Invertebrate Cell System Applications*, FL: CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1989.
- [10] Flanders KL. "ACES Publications: Management of Fall Armyworm in Pastures and Hayfields: ANR-1019". <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1019/index2.tmpl> (12.05.2007).
- [11] Wickham TJ, Davis T, Granados RR, Shuler ML, Wood H. A. "Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and Infectious Virus in the Baculovirus Expression System". *Biotechnology Progress*, 8(5), 391-396, 1992.
- [12] Hink WF, Bezanson DR, Kurstak E. (Ed.). *Invertebrate Cell Culture Media and Cell Lines, Techniques in the Life Science*, Elsevier County Clare, Ireland, 1985.
- [13] Manual, Instruction, Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (bevs) and Insect Cell Culture Techniques, Invitrogen Life Technologies, 2011.
- [14] Mitsuhashi J. "Media for Insect Cell Cultures". *Advances in Cell Culture*, 2nd ed. New York, USA, Academic Pres, 1982.
- [15] Eibl R, Eibl D, Pörtner R, Catapano G, Czermak P. *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 1st ed. New Delhi, India, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.
- [16] Richardson CD. *Baculovirus Expression Protocols*. 1st ed. Totowa, NJ, Humana Press, 1995.
- [17] Elias CB, Jardin B, Kamen A. "Recombinant Protein Production in Large-Scale Agitated Bioreactors Using the Baculovirus Expression Vector System". *Methods in Molecular Biology*, 388, 225-246, 2007.
- [18] Shao-Hua C, Hong-Liang S, Zuo-Hu L. "Effect of Temperature Oscillation on Insect Cell Growth and Baculovirus Replication". *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2237-2239, 1998.
- [19] Adler S, Roy A, Relman S. "Intracellular Acid-Base Regulation. The Interaction Between CO₂ Tension and Extracellular Bicarbonate in the Determination of Muscle Cell pH". *The Journal of Clinical Investigation*, 44(1), 21-30, 1965.
- [20] Taticek R, Petersen S, Konstantinov K, Naveh D. "In Effect of Dissolved Carbon Dioxide and Bicarbonate on Mammalian Cell Metabolism and Recombinant Protein Productivity in High Density Perfusion Culture". *Presented at Cell Culture Engineering VI*, San Diego, USA, 1998.
- [21] deZengotita VM, Schmeizer AE, Miller WM. "Characterization of Hybridoma Cell Response to Elevated pCO₂ and Osmolality: Intracellular pH, Cell Size, Apoptosis and Metabolism". *Biotechnology and Bioengineering*, 77(4), 369-380, 2002.
- [22] Goss SPA, Singh RJ, Kalyanaraman B. "Bicarbonate Enhances the Peroxidase Activity of Cu, Zn-Superoxide Dismutase". *The Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28233-28239, 1999.
- [23] Vesela A, Wilhelm J. "The Role of Carbon Dioxide in Free Radical Reaction of the Organism". *Physiological Research*, 51, 335-339, 2002.
- [24] Vajrala SG. Mechanism of CO₂ Inhibition in Insect Cell Culture, University of Iowa Iowa Research Online. Master Thesis. Iowa University, IA, USA, 2010.
- [25] Agathos SN. "Insect Cell Bioreactors". *Cytotechnology*, 20, 173-189, 1996.
- [26] Palomares LA, López S, Ramirez OT. "Utilization of Oxygen Uptake Rate to Assess the Role of Glucose and Glutamine in the Metabolism of Infected Insect Cell Cultures". *Biochemical Engineering Journal*, 19(1), 87-93, 2004.
- [27] Pamboukian MM, Jorge SAC, Santos MG, Yokomizo AY, Pereira CA, Tonso A. "Insect Cells Respiratory Activity in Bioreactor". *Cytotechnology*, 57(1), 37-44, 2008.
- [28] Jöbges I, Martens D, Tramper J. "Lethal Events during Gas Sparging in Animal Cell Culture". *Biotechnology and Bioengineering*, 37(5), 484-490, 1991.
- [29] Doran MP. *Bioprocess Engineering Principles*. 1st ed. UK. Academic Press, 1995.
- [30] Jain E, Kumar A. "Upstream Processes in Antibody Production: Evaluation of Critical Parameters". *Biotechnology Advances*, 26(1), 46-72, 2008.
- [31] Mirro R, Voll K. "Which Impeller is Right for Your Cell Line? A guide to Impeller Selection for Stirred-Tank Bioreactors". *Bioprocess International*, 7, 51-57, 2009.
- [32] Tramper J, Vlask JM, Gooijer CD. "Scale up Aspects of Sparged Insect-Cell Bioreactors". *Cytotechnology*, 20, 221-229, 1996.
- [33] Kost TA, Condreay JP. "Recombinant Baculoviruses as Mammalian Cell Gene-Delivery Vectors". *Trends in Biotechnology*, 20, 173-180, 2002.
- [34] Oers VMM. "Vaccines for Viral and Parasitic Diseases Produced with Baculovirus Vectors". *Advance in Virus Research*, 68, 193-253, 2006.
- [35] Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. "Select What you Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression System for Foreign Genes". *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335-347, 2007.

- [36] Adams JR, McClintock JT, Adams JR. (Ed.), Bonami JR. (Ed.). *Baculoviridae, Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects, Atlas of Invertebrate Viruses*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991.
- [37] Federici BA. *Baculovirus Pathogenesis*. 1st ed. New York, USA, Springer Plenum Press, 1997.
- [38] Mikhailov VS. "Replication of the Baculoviruses Genome". *Molecular Biology*, 37(2), 250-259, 2003.
- [39] Demir İ, Demirbağ ZA. "Protective Replication of *Hyphantria Cunea* Nucleopolyhedrovirus in *Lymantria Dispar* Cell Line". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(10), 1485-1490, 2006.
- [40] Bilimoria SL, Kurstak E. *Viruses of Invertebrates*, 1st ed. New York, USA, CRC Press, 1991.
- [41] Kelly DC. "Baculovirus Replication". *Journal of General Virology*, 63, 1-13, 1982.
- [42] Demir İ, Nalçacıoğlu R, Demirbağ Z. "Böcek Virüslerinin Biyoteknolojik Önemi". *Tarım Bilimleri Dergisi*, 14(2), 193-201, 2008.
- [43] Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology*, 3rd ed. Department of Microbiology, Corvallis, USA, Oregon State University, 2011.
- [44] Madigan MT, Martingo JM. "Brock Biology of Microorganisms". *International Microbiology*, 11, 65-73, 2008.
- [45] Adams NC, Gale NW, Shirley P. (Ed.), Carlos L. (Ed.), *Principles and Practice: Mammalian and Avian Transgenesis-New Approaches*. Berlin, Germany, Springer-Verlag, 2006.
- [46] Gülçe İz S, Deliloğlu Gürhan İ. "Temel Hücre Kültürü Kursu". Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye, 2010.
- [47] Çolak A. "Gen Tedavisi". *Türk Nöroşirurji Dergisi*, 16(1), 12, 2006.
- [48] Freshney RI. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. New York, USA, Wiley-Liss, Inc., 2000.
- [49] Manuel S, Fontanay S, Clarot I, Duval RE, Diez L, Marsura A. "Synthesis and Complexation Ability of a Novel Bis- (guanidinium)-tetrakis-(β -cyclodextrin) dendrimeric Tetrapod as a Potential Gene Delivery (dna and sirna) System, Study of Cellular Sirna Transfection". *Bioconjugate Chemistry*, 19(12), 2357-2362, 2008.
- [50] Freshney RI. *Culture of Animal Cells Types: Culture of Animal Cells*. 1st ed. New York, USA, John Wiley & Sons, 2005.
- [51] Layden MJ, Röttinger E, Wolenski FS, Gilmore TD, Martindale MQ. "Microinjection of mRNA or Morpholinos for Reverse Genetic Analysis in the Starlet Sea Anemone *Nematostella Vectensis*". *Nature Protocols*, 8(5), 924-934, 2013.
- [52] Potter H, Heller R. "Transfection by Electroporation". *Current Protocols in Neuroscience*, 57. A1E1-A1E11, 2001.
- [53] Yamaji H, Tagai S, Fukuda H. "Optimal Production of Recombinant Protein by the Baculovirus-Insect Cell System in Shake-Flask Culture with Medium Replacement". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(5), 636-641, 1999.
- [54] Zhang YH, Enden G, Jos'e C. "Insect Cells-Baculovirus System: Factors Affecting Growth and Low MOI Infection". *Biochemical Engineering Journal*, 27(1), 8-16, 2005.
- [55] Carinhas N, Bernal V, Monteiro F, Carrondo MJT, Oliveira R, Alves PM. "Improving Baculovirus Production at High Cell Density Through Manipulation of Energy Metabolism". *Metabolic Engineering*, 12(1), 39-52, 2010.
- [56] Deutschmann SM, Jeager V. "Optimization of the Growth Conditions of Sf21 Insect Cells for High-Density Perfusion Culture in Stirred-Tank Bioreactors". *Enzyme and Microbial Technology*, 16(6), 506-512, 1994.
- [57] Spier RE, Griffiths JB, Berthold W. *Animal Cell Technology*. 1st ed. San Diego, CA, Academic Press, 1994.
- [58] Zhang J, Kalogerakis N, Behie LA, Iatrou K. "A Two-Stage Bioreactor System for the Production of Recombinant Proteins Using a Genetically Engineered Baculovirus/Insect Cell System". *Biotechnology Bioengineering*, 42(3), 357-366, 1993.
- [59] Zhang J, Kalogerakis N, Behie LA, Iatrou K. "Optimum Infection Conditions for Recombinant Protein Production in Insect Cell (Bm5) Suspension Culture". *Biotechnology Progress*, 10(6), 636-643, 1994.
- [60] Gooijer CD, Kokenf RHM, Van Lierm FLJ, Kool M, Vlak JM, Tramper J. "A Structured Dynamic Model for the Baculovirus Infection Process in Insect-Cell Reactor Configurations". *Biotechnology and Bioengineering*, 40(4), 537-548, 1992.
- [61] Betenbaugh MJ, Ailor E, Whiteley EM, Hopkins J. *Insect Cells and Larvae, Gene Expression Systems. Encyclopedia of Bioprocess Technology*, 1st ed. Pennsylvania, USA, Merck and Co., 2002.
- [62] Van-Lier FLJ, Van-Duijnhoven GC. F., De-Vaan, MMJACM, Vlak JM, Tramper J. "Continuous Beta-Galactosidase Production in Insect Cells with a p10 Gene Based Baculovirus Vector in a Two-Stage Bioreactor System". *Biotechnology Progress*, 10(1), 60-64, 1994.
- [63] Van-Lier FLJ, Van den Hombergh JP, de Gooijer CD, den Boer MM, Vlak JM, Tramper J. "Long-Term Semi-Continuous Production of Recombinant Baculovirus Protein in a Repeated (fed-) Batch two-Stage Reactor System". *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), 460-466, 1996.
- [64] Hu YC, Wang MY, Bentley WE. "A Tubular Bioreactor for the Infection of Insect Cells with Recombinant Baculovirus". *Cytotechnology*, 24(2), 143-152, 1997.
- [65] Rice JW, Rankl NB, Guranuss TM, Marr CM, Barna JB, Walters MM, Burns DJ. "A Comparison of Large-Scale Sf9 Insect Cell Growth and Protein Production: Stirred Vessel vs. Airlift". *BioTechniques*, 15(6), 1052-1059, 1993.
- [66] King GA, Kuzio J, Daugulis AJ, Faulkner P, Bayly D, Goosen MFA. "Growth of Baculovirus-Infected Insect Cells in Microcapsules to a High Cell and Virus Density". *Biotechnology Letter*, 10(10), 683-688, 1988.
- [67] Taticek RA, Hammer DA, Shuler ML. *Baculovirus Expression Systems and Biopesticides*. Wiley-Liss, Inc., New York, USA, 1995.
- [68] Pijlman PG, Vermeesch MGA, Vlak MJ. "Cell Line-Specific Accumulation of the Baculovirus Non-Hr Origin of DNA Replication in Infected Insect Cells". *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(4), 214-219, 2004.
- [69] Pijlman PG, Roode CD, Fan X, Roberts OL, Belsham JG, Vlak MJ, Oers van MM. "Stabilized Baculovirus Vector Expressing a Heterologous Gene and gp64 From a Single Bicistronic Transcript". *Journal of Biotechnology*, 123(1), 3-21, 2006.

- [70] Svensson I. "Physiological Effects of Conditioned Medium and Passage Number on *Spodoptera frugiperda* Sf9 Serum Free Cultures" Royal Institute of Technology School of Biotechnology Department, Stockholm, Sweden, 2005.
- [71] ContrerasGómez A, Sánchez Mirón A, García Camacho F, Molina Grima E, Chisti Y. "Protein Production Using the Baculovirus Insect Cell Expression System". *Biotechnology Progress*, 30(1), 1-18, 2013.
- [72] Drugmand JC, Schneider YJ, Agathos SN. "Insect Cells as Factories for Biomanufacturing". *Biotechnology Advances*, 30(5), 1140-1157, 2012.
- [73] Bhatia R, Jesionowski G, Ferrance J, Ataa MM. "Insect Cell Physiology". *Cytotechnology*, (20), 33-41, 1996.
- [74] Griffiths B. *Animal Cell Products*. In: Spier Re (Ed) Encyclopedia of Cell Technology, New York, USA, Wiley, 2000.
- [75] Chalmers JJ, Shuler ML, Wood HA, Granados RR, Hammer, DA. *Baculovirus Expression Systems and Biopesticides*. New York, USA, Wiley-Liss, 1995.
- [76] Tramper J, Williams JB, Joustra D. "Shear Sensitivity of Insect Cells in Suspension". *Enzyme and Microbial Technology*, 8(1), 33-36, 1986.
- [77] Bavarian F, Fan LS, Chalmers JJ. "Microscopic Visualization of Insect Cell-Bubble Interactions. Rising Bubbles, Air-Medium Interface, and the Foam Layer". *Biotechnology Progress*, 7(2), 140-150, 1991.
- [78] Czermak P, Weber C, Nehring D. "A Ceramic Microsparging Aeration System for Cell Culture Reactors". *Publication Series of IBPT-University of Applied Sciences*. (1), 1-6, 2005.
- [79] Doyle A, Griffith J. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, USA, John Wiley and Sons, 1998.
- [80] Henzler H, Kauling O. "Oxygenation of Cell Cultures". *Bioprocess Engineering*, 9(2-3), 61-75, 1993.
- [81] Varley J, Birch J. "Reactor Design for Large Scale Suspension Animal Cell Culture". *Cytotechnology*, 29(3), 177-205, 1999.
- [82] Chisti Y. "Animal-Cell Damage in Sparged Bioreactors". *Trends in Biotechnology*, 18(10), 420-432, 2000.
- [83] Handa A, Emery AN, Spier RE, "On the Evaluation of Gas-Liquid Interfacial Effects on Hybridoma Viability in Bubble Column Bioreactors". *Developments in Biological Standardization*, 66, 241-253, 1987.
- [84] Handa-Corrigan A, Emery AN, Spier RE. "Effect of Gas-Liquid Interfaces on the Growth of Suspended Mammalian Cells: Mechanisms of Cell Damage by Bubbles". *Enzyme and Microbial Technology*, 11(4), 230-235, 1989.
- [85] Murhammer DW. "The use of Insect Cell Cultures for Recombinant Protein Synthesis: Engineering Aspects". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31, 283-310, 1991.
- [86] Kretzmer G. "Industrial Processes with Animal Cells". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 135-142, 2002.
- [87] Catapano G, Czermak P, Eibl R, Eibl D, Pörtner R. *Bioreactor Design and Scale-Up, Cell and Tissue Reaction Engineering Principles and Practice*, Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 2009.
- [88] Jain D, Ramasubramanyan K, Gould S, Lenny A, Candelore M, Tola M, Strader C, Alves K, Cuca G, Tung JS, Hunt G, Junker B, Buckland BC, Silberklang M. Large-Scale Recombinant Protein Production using the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System: Antistatin and Beta-Adrenergic Receptor. Editors: Spier RE, Griffiths JB and Meignier B. Production of bioLogicals from Animal Cells in Culture, 345-351, Oxford, Butterworth-Heinemann, 1991.
- [89] Caron AW, Archambault J, Massie B. "High-Level Recombinant Protein Production in Bioreactors Using the Baculovirus Insect Cell Expression System". *Biotechnology and Bioengineering*, 36(11), 1133-1140, 1990.
- [90] Blanchard JH, Ferguson CHR. *The Effect of Different Levels of Dissolved Oxygen on Recombinant Protein Production in Sf-9 cells*. Editors: Vlak JM, Schlanger E-J, Bernard AR. Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes, 247-254, Basel: Editiones Roche, 1992.
- [91] Schmid G. "Insect Cell Cultivation: Growth and Kinetics". *Cytotechnology*, 20, 43-56, 1996.
- [92] Maranga L, Cunha A, Clemente J, Cruz P, Carrondo MJT. "Scale-Up of Virus-Like Particles Production: Effects of Sparging, Agitation and Bioreactor Scale on Cell Growth, Infection Kinetics and Productivity". *Journal of Biotechnology*, 107(1), 55-64, 2004.
- [93] Oh SKW, Nienow AW, Al-Rubeai M, Emery AN. "The Effects of Agitation Intensity with and Without Continuous Sparging on the Growth and Antibody Production of Hybridoma Cells". *Journal of Biotechnology*, 12(1), 45-62, 1989.
- [94] Kunas KT, Papoutsakis ET. "Damage Mechanisms of Suspended Animal Cells in Agitated Bioreactors with and Without Bubble Entrainment". *Biotechnology and Bioengineering*, 36(5), 476-483, 1990.