

Entwicklung einer Strep-tag<sup>®</sup> basierten  
Zellselektionsmethode (STACS)  
zur fraktionierten Anreicherung von  
eukaryotischen Zellen mit einer stabilen und  
erhöhten rekombinanten Proteinexpression

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Dennis Karthaus, geb. Niermeier, M.Sc.

2022

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 09.02.2022

## Kurzfassung

Die Herstellung von rekombinanten Proteinen in stabil exprimierenden eukaryotischen Zellen ist heute ein elementarer Bestandteil vieler biotechnologischer Prozesse. Es existieren zahlreiche Methoden, um Zellen mit einer stabilen und hohen Expression eines Proteins zu selektieren. Eine Bead-basierte Selektion ist leicht zu skalieren und verhindert unnötigen Selektionsstress. Allerdings existieren keine Bead-basierten Protokolle zur Selektion von hochproduzierenden Zellen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die einfach zu skalieren ist, die Viabilität der selektierten Kultur nicht beeinträchtigt und es erlaubt, stabile hochproduzierende Zellen mittels magnetischer Beads zu selektieren.

Die sogenannte *Strep-Tactin<sup>®</sup> assisted cell selection* (STACS)-Methode basiert auf der Expression eines Membranproteins, welches mit einem Twin-Strep-tag<sup>®</sup> (TST) fusioniert ist und zusammen mit dem gewünschten Protein (POI) exprimiert wird. Ein weiterer Bestandteil ist eine feste Matrix, wie magnetische Beads, an die das Strep-Tactin<sup>®</sup> gekoppelt wird. Positive Zellen können bei einer Inkubation mit der Matrix mittels des präsentierten TST an das Strep-Tactin<sup>®</sup> und somit an die Matrix gebunden werden. Zellen, die dieses Konstrukt nicht exprimieren, werden durch Waschschriffe entfernt. Anschließend werden die Zielzellen durch Zugabe von Biotin von der Matrix eluiert. Dabei eluieren Zellen mit einer hohen Expression des POI und einer hohen TST-Konzentration auf der Oberfläche später. Konsekutive Selektionen führen am Ende zu hochproduzierenden stabilen Zellen.

CHO-Zellen, die ausschließlich mit STACS selektiert werden, weisen eine 3,2-fach höhere Volumenausbeute eines sekretierten rekombinanten Proteins auf als puromycinselektierte Kulturen. Durch eine der Antibiotikaselektion nachfolgende STACS-Selektion wird der Proteintiter ebenfalls um den Faktor 3,3 gesteigert. Damit wird in der vorgelegten Arbeit zum ersten Mal eine Bead-basierte Selektion für CHO- und HEK293-Zellen beschrieben, die während der Elution eine Fraktionierung der Zellen in Abhängigkeit der Konzentration eines Oberflächenmarkers erlaubt.

**Stichwörter:** Zellselektion, stabile Zellen, Oberflächenmarker, Strep-Tactin<sup>®</sup>, Twin-Strep-tag<sup>®</sup>, magnetische Beads, STACS, CHO, HEK293



## Abstract

The production of recombinant proteins in stable high expressing cells is a fundamental process in the biotechnology industry and academia. Several methods are available to select cells that exhibit a high and stable expression of a recombinant protein. Bead based methods can be scaled up easily avoiding selection induced cell stress. Indeed, no methods are described using bead-based selection that generate stable high producing cells based on the concentration of a surface marker. Therefore, a bead-based method has been developed to select stable high producing cells. The method can be scaled up easily and does not affect cell viability.

The method is based on the co-expression of the protein of interest and a membrane marker protein that is fused to a Twin-Strep-tag® (TST). Strep-Tactin® coated magnetic microbeads are immobilized on positive cells via the bond between coated Strep-Tactin® and the TST fusion protein on the cells' surface. Cells not exhibiting expression of the construct are removed by a consecutive wash procedure. Finally, cells are released from the beads by addition of biotin that binds to Strep-Tactin®. Low producing cells elute predominantly in early fractions due to the low concentration of TST surface marker. In contrast, high producing cells with a higher concentration of TST surface marker and more bonds to the microbeads elute in later fractions. Stable cells can be isolated by consecutive selections using the described method.

Using the new Strep-Tactin® assisted cell selection (STACS) method only, CHO cells are selected that exhibit a 3.2-fold higher volumetric POI expression compared to a stable puromycin selected culture. Additionally, it is possible to increase the titer of a puromycin selected culture by 3.3-fold by selecting the cells with STACS after the puromycin selection phase. Thus, this work is the first description of a bead-based cell selection method that allows a fractionation of cells during the elution based on the concentration of a co-expressed surface marker.

**Keywords:** cell selection, stable cells, surface marker, Strep-Tactin®, Twin-Strep-tag®, magnetic beads, STACS, CHO, HEK293



# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Stand der Forschung.....</b>	<b>5</b>
2.1    Statistische Versuchsplanung.....	5
2.2    Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels Polyethylenimin .....	7
2.3    Transiente Proteinexpression in eukaryotischen Zellen .....	10
2.4    Stabile Proteinexpression in eukaryotischen Zellen.....	11
2.4.1    Prinzip der Herstellung von stabilen Zelllinien .....	11
2.4.2    Strategien zur Regulation der Markergenexpression.....	14
2.4.3    Selektion von stabilen Zellen .....	16
2.4.3.1    Selektion von Zellen mittels Antibiotika .....	17
2.4.3.2    Das DHFR und GS-System .....	19
2.4.3.3    Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) .....	20
2.4.3.4    Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS®) .....	22
2.5    Streptamer® bzw. TACS® basierte Zellselektion .....	26
<b>3. Funktionsprinzip der neu entwickelten Strep-Tactin® assistierten Zellselektion (STACS).....</b>	<b>29</b>
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
4.1    Verwendete Materialien und Reagenzien .....	34
4.2    Herstellung von Plasmiden.....	38
4.2.1    Herstellung der Vektoren pZSG4-IBA102-SEAP und pZSG5-IBA102-SEAP .....	38
4.2.2    Weitere in dieser Arbeit verwendeter Vektoren.....	40
4.3    Kultivierung von CHO-S und MEXi-293E Zellen.....	41
4.4    Transfektion von CHO-S und MEXi-293E-Zellen.....	41
4.5    Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie .....	42
4.6    Berechnung der Zelldichte, Viabilität und spezifischen Produktivität von Zellen.....	43

4.7	Chromatografische Reinigung von Twin-Strep-tag®-Fusionsproteinen.....	44
4.8	Reinigung von Twin-Strep-tag®-Fusionsproteinen mittels MagStrep "type3" XT Beads.....	44
4.9	Analyse der Proteinkonzentration in Kulturüberständen mittels Bio-Layer-Interferometrie und Strep-Tactin®XT-Biosensoren .....	45
4.10	Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	45
4.11	Analyse von Proteinen im Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gel .....	45
4.12	Planung und Auswertung von statistischen Versuchsplänen (DoE) .....	46
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>48</b>
5.1	Optimierung der Transfektion von CHO-S-Zellen mittels statistischer Versuchsplanung.....	48
5.1.1	Entwicklung eines CHO Transfektionsprotokolls für Zelldichten bis zu $5 \times 10^6$ Zellen/ml.....	49
5.1.2	Entwicklung eines Hochzelldichte-Transfektionsprotokolls für CHO-S-Zellen.....	54
5.1.3	Optimierung des Hochzelldichte-Transfektionsprotokolls.....	58
5.1.4	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse zur Entwicklung von Transfektionsprotokollen.....	62
5.2	Auswahl von Vektorelementen und Test verschiedener Matrices für die Selektion von Zellen mittels STACS.....	64
5.2.1	Test verschiedener Oberflächenmarker-Varianten für die Selektion von MEXi-293E-Zellen mit Strep-Tactin® Magnetic Microbeads .....	65
5.2.2	Test verschiedener Oberflächenmarker-Varianten für die Selektion von MEXi-293E-Zellen mittels Strep-Tactin® beschichteter Nitrozellulose.....	68
5.2.3	Selektion von MEXi-293E-Zellen mittels Strep-Tactin®-Multimer-Agarose.....	69
5.2.4	Zusammenfassung und Diskussion des Vergleichs verschiedener CD4-Varianten und Matrices .....	73
5.3	Nutzung der STACS-Methode zur Selektion stabiler hochexprimierender CHO- und MEXi-293E-Zellen und Vergleich mit antibiotikabasierter Selektion .....	76
5.3.1	Analyse der Selektion und des Kulturverlaufs selektierter CHO-Zellen anhand der Expression des TST-flex-CD4tm-GFP-Markerproteins .....	77
5.3.2	Bestimmung der B18R-Expression in den selektierten CHO-Kulturen .....	84



---

5.3.3	Analyse der Selektion und des Kulturverlaufs B18R-exprimierender, selektierter MEXi-Zellen anhand der Expression des TST-flex-CD4 <sup>tm</sup> -GFP-Markerproteins .....	85
5.3.4	Zusammenfassung und Diskussion zur Generierung stabiler hochexprimierender Zellen mittels STACS und Vergleich mit antibiotikabasierter Selektion .....	92
5.4	Herstellung von stabilen SEAP-exprimierenden Zellkulturen mittels Puromycinselektion und STACS mit IRES- bzw. promotorkontrollierter Markergen-kassette.....	97
5.4.1	Herstellung und Evaluierung stabiler SEAP-exprimierender CHO-Zellen mittels STACS und Puromycinselektion sowie Vergleich von IRES- und promotorbasierter Kontrolle der Markergen-kassette.....	97
5.4.2	Bestimmung der SEAP-Expression von selektierten CHO-Zellen.....	108
5.4.3	Herstellung einer stabilen SEAP-exprimierenden CHO-Zellkultur durch ausschließliche Verwendung von STACS .....	111
5.4.4	Vergleich der SEAP-Expression von STACS-selektierten CHO-ZSG5-Kulturen .....	117
5.4.5	Herstellung einer stabilen SEAP-exprimierenden MEXi-Zellkultur durch ausschließliche Verwendung von STACS .....	120
5.4.6	Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente in Kapitel 5.4 zur Selektion von stabilen SEAP-exprimierenden Zellen mittels STACS.....	126
5.5	Optimierung der STACS-Methode.....	132
5.5.1	Bestimmung der idealen Zellkonzentration zur Bindung von Zellen an magnetische Microbeads .....	132
5.5.2	Einfluss der Biotinkonzentration von 0,1–7 mM sowie der Inkubationszeit von 3–20 min auf das Elutionsverhalten der Zellen .....	134
5.5.3	Einfluss der Biotinkonzentration von 10–100 µM sowie der Inkubationszeit von 30–90 min auf das Elutionsverhalten der Zellen .....	138
5.5.4	Einfluss der Inkubationszeit während der Elution auf die Ausbeute in den Elutionsfraktionen.....	142
5.5.5	Einfluss von Scherkräften und Biotinkonzentrationen von 1–10 µM auf die Elution .....	144
5.5.6	Einfluss der Biotinkonzentration von 1,5 µM–1 mM auf die Selektion von transient exprimierenden MEXi-293E- und CHO-Kulturen .....	148

5.5.7	Einfluss der Inkubation auf einem Magneten auf das Elutionsprofil der Microbead-Zell-Ansätze.....	153
5.5.8	Selektion von Zellen mit unterschiedlichem Expressionslevel durch Verwendung eines Biotingradienten und mehrfachen Inkubationen auf einem Magneten.....	159
5.5.9	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse zur Optimierung der STACS-Methode des Kapitels 5.5 .....	165
5.6	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Arbeit .....	168
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>175</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>187</b>
7.1	Standard-Protokoll für die Selektion von MEXi-293E und CHO-Zellen mittels der in dieser Arbeit entwickelten STACS-Technologie .....	187
7.2	Übersicht der Selektionsbedingungen für die Experimente in Kapitel 5.3 und 5.4.....	189
7.3	Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide .....	194
7.4	Übersicht der DNA- und Aminosäuresequenzen der Plasmid-elemente .....	201
7.5	Übersicht der Einstellung der verschiedenen statistischen Versuchspläne .....	210
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>213</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>216</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>218</b>
10.1	Journal Publikationen.....	218
10.2	Poster Präsentationen.....	218

**Abkürzungen**

BSA	Bovines Serumalbumin
CAR-T	<i>Chimeric antigen receptor T cells</i>
CCD	zentral zusammengesetzter Versuchsplan, <i>Central Composite Design</i>
CHO	chinesische Hamster Ovarzellen, <i>chinese hamster ovary cell</i>
CMV	<i>Cytomegalie-Virus</i>
CV	Säulenvolumen, <i>column volume</i>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DoE	<i>Design of Experiment</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EF1 $\alpha$	eukaryotischer Elongationsfaktor eEF-1
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
eIF-3	eukaryotischer Initiationsfaktor-3
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMCV	<i>Encephalomyocarditis-Virus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F2A	2A-Peptid des Maul- und Klauensuche Virus
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht, <i>Forward Scatter</i>
FSC-A	Vorwärtsstreulicht-Fläche, <i>Forward Scatter Area</i>
FSC-H	Vorwärtsstreulicht-Höhe, <i>Forward Scatter High</i>
FSC-width	Vorwärtsstreulicht-Breite, <i>Forward Scatter width</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein

GOI	Gen von Interesse, <i>gene of interest</i>
GS	Glutamin-Synthetase
HCl	Salzsäure
HEK239	humane embryonale Nierenzelle, <i>human embryonic kidney cell</i>
IBA	IBA Lifesciences GmbH
IgG	Immunglobulin G
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KMU	kleine und mittlere Unternehmen
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Komplexmedium
LNGFR	trunkiertes humanes CD271, <i>low-affinity nerve growth factor receptor</i>
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung, <i>magnetic-activated cell sorting</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	messenger-RNA
MSX	Methionin Sulfoximin
MTX	Methotrexat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
ORF	Offener Leserahmen, <i>open reading frame</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphate-buffered saline</i>
PEI	Polyethylenimin
PGK	Phosphoglyceratkinase
POI	Protein von Interesse, <i>protein of interest</i>
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
$\bar{R}^2$	adjustiertes Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonukleinsäure

---

RSM	Reaktionsoberflächenmethode, <i>response surface method</i>
S/MARS	Kerngerüst-/Kernmatrixanheftungsregionen
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SBP	Streptavidin-bindendes Peptid
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEAP	sekretierte alkalische Phosphatase
SSC	Seitwärtsstreulicht, <i>Sideward Scatter</i>
SSC-A	Seitwärtsstreulicht-Fläche, <i>Sideward Scatter Area</i>
STACS	<i>Strep-Tactin<sup>®</sup> assisted cell selection</i>
SV40	<i>Simian-Virus 40</i>
TACS	<i>Traceless Affinity Cell Selection</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TST	Twin-Strep-tag <sup>®</sup>
UCOE	<i>ubiquitous chromatin opening elements</i>



# 1. Einleitung und Zielsetzung

Die Produktion von Biopharmazeutika in eukaryotischen Zellen ist heute ein elementarer Bestandteil für die Herstellung zahlreicher Stoffe in der pharmazeutischen Industrie.<sup>1-6</sup> Seit dem Jahr 2006 stammen mehr als 50 % der zugelassenen rekombinanten Proteine aus Säugerzelllinien.<sup>5,7</sup> Im Jahr 2014 wurden bereits sieben der zehn und 21 der 50 umsatzstärksten Therapeutika in eukaryotischen Zellen produziert.<sup>2</sup> Dabei befanden sich 2014 unter den zehn pharmazeutischen Produkten mit dem höchsten weltweiten Umsatz allein fünf Antikörper.<sup>2</sup> Antikörper werden nahezu ausschließlich in eukaryotischen Zellen, vor allem CHO-Zellen, produziert.<sup>6</sup> Von 2018 bis 2019 wurden 18 neue Antikörper von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen und alleine der Umsatz mit therapeutischen Antikörpern wird im Jahr 2018 auf 115,2 Milliarden US-Dollar geschätzt.<sup>8</sup> Neben der Entwicklung von Therapeutika ist die Herstellung rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen auch für die Grundlagenforschung, z.B. die Strukturanalyse von großer Bedeutung.<sup>9-12</sup> Gerade in der derzeitigen SARS-CoV-2-Pandemie werden Virusproteine und verschiedene Varianten des Spikeproteins exprimiert, um beispielsweise die Auswirkung von Mutationen zu untersuchen.<sup>12-14</sup> Auch viele nicht pharmazeutische Unternehmen müssen für Produkte wie Diagnostika Virusproteine in Eukaryoten herstellen. So werden rekombinant hergestellte SARS-CoV-2-Proteine in ELISA-Tests, Durchflusszytometer-Analysen oder Antigentests verwendet.<sup>15</sup> Letzten Endes müssen auch in der bereits erwähnten Antikörperindustrie zahlreiche Antigene für die Immunisierung und Analysen rekombinant in tierischen Zellen hergestellt werden.

Um die benötigten Proteine zu produzieren, sind je nach Proteinmenge, Einsatzgebiet und Entwicklungs- bzw. Produktionsphase, unterschiedliche Expressionsstrategien nötig. Bis zum Beispiel ein potenzieller rekombinanter Wirkstoff in klinischen Studien eingesetzt werden kann, werden unterschiedliche Anforderungen an den Produktionsprozess gestellt. In der frühen Forschungsphase, also der

Lead-Identifizierung, werden in der Regel geringe Proteinmengen in sehr kurzer Zeit benötigt. Hierfür hat sich die transiente Proteinexpression im Hochdurchsatzverfahren bewährt.<sup>6,16,17</sup> Sind vielversprechende Kandidaten für die weiteren präklinischen Untersuchungen gefunden, steigt die für die weitere Evaluierung benötigte Proteinmenge. Darüber hinaus muss das entsprechende Protein oft mehrmals produziert werden. In diesem Stadium können Zellen von Vorteil sein, die das Protein stabil exprimieren und somit die Produktion im größeren Maßstab erleichtern.<sup>6,11,16,18</sup> Eine Einzelklonselektion ist allerdings häufig noch nicht nötig und wäre mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Stattdessen können stabile, heterogene Zellpools verwendet werden. Doch auch vor einer Einzelklonselektion findet eine Isolierung hochproduzierender Zellen (stabiler Pool) statt, um die Chance auf einen hochproduzierenden Klon zu erhöhen und den Arbeitsaufwand zu minimieren.<sup>16,19-21</sup>

Häufig resultieren aus dem Screening nach potenziellen therapeutischen Proteinen mehrere Kandidaten, die in weiteren Experimenten evaluiert werden müssen. Auch Lohnhersteller müssen mehrere Projekte gleichzeitig bearbeiten. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, eine Methode zu nutzen, die ein paralleles Selektieren von stabilen, hochproduzierenden Zellen ermöglicht. Auf diese Weise lässt sich der erhöhte Proteinbedarf für weitere Experimente decken. Bisherige Methoden zur Zellselektion von stabilen hochproduzierenden Zellen sind jedoch häufig mit einem großen instrumentellen und somit einem hohen Kostenaufwand verbunden (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS), ClonePix<sup>®</sup>, Beacon<sup>®</sup>).<sup>6,16,22,23</sup> Darüber hinaus geht die Isolierung einer größeren Zellzahl mit einem FACS mit einer Verlängerung des Sortiervorgangs einher und erschwert folglich die Hochskalierung.<sup>24,25</sup> Alternativ können Zellen durch Antibiotika selektiert werden.<sup>22</sup> Dabei werden die Zellen jedoch hohem Stress ausgesetzt.<sup>22,26</sup> Zwei der am häufigsten verwendeten Methoden zur Zellselektion sind das sogenannte Dihydrofolatreduktase- (DHFR) und das Glutamin-Synthetase (GS)-System. Bei diesen Systemen werden DHFR- oder GS-defizitäre Zellen verwendet oder die zelleigene DHFR- bzw. GS-Aktivität wird durch Methotrexat (MTX) bzw. Methionin Sulfoximin (MSX) blockiert.<sup>11,20,22,27,28</sup> Beide Methoden können verwendet werden, um die integrierte DNA zu amplifizieren. Dafür müssen die Zellen jedoch über einen längeren Zeitraum selektiert werden.<sup>11,16,22</sup>



Zusätzlich wird bei diesen Methoden häufig ein weiterer Schritt zur Isolierung von hochproduzierenden Zellen angeschlossen. Für diesen Schritt wird oft eine FACS-Sortierung durchgeführt.<sup>16,22</sup>

Für die Aufgabe der Zellselektion ist eine Technologie ideal, die eine parallele, skalierbare Selektion hochproduzierender Zellen erlaubt sowie gleichzeitig zeit- und kosteneffizient ist. Eine derartige Technologie ist somit für die Entwicklung von Biopharmazeutika in der präklinischen Phase vorteilhaft. Etablierte stabile Pools können darüber hinaus direkt für eine spätere Einzelklonselektion genutzt werden. Idealerweise ist für die Selektion kein kostenintensiver und umfangreicher instrumenteller Aufwand nötig. Somit wäre der Zugang zu der Technologie auch Forschungsinstituten und kleineren Unternehmen, mit einem im Vergleich zur Pharmaindustrie oftmals geringerem Budget, möglich. Einige kleine und mittlere Unternehmen (KMU) in der Biotechindustrie und Institutionen in der Grundlagenforschung müssen regelmäßig größere Mengen an rekombinanten Proteinen produzieren. Durch eine neuartige Methode zur Selektion stabiler, hochproduzierender Zellpools kann die Belegung von Gerätschaften wie FACS-Geräten in Laboren verringert werden, womit mehr Kapazität für andere Applikationen dieser Geräte geschaffen würde. Dennoch sollte eine neuartige Technologie auch auf vollautomatisierte Prozessabläufe adaptierbar sein. Auf diese Weise kann der fortschreitenden Automatisierung und Digitalisierung Rechnung getragen werden. Vorteilhaft ist eine möglichst unkomplizierte Integration der Methode in bereits bestehende Prozessabläufe.

Ziel der Arbeit ist die Entwicklung einer innovativen Methode zur Selektion von eukaryotischen Zellen, die rekombinante Proteine stabil und in einem hohen Maß produzieren. Des Weiteren soll ein effizientes Polyethylenimin (PEI)-basiertes Transfektionsprotokoll zur Transfektion von CHO-Zellen entwickelt werden. Eine effektive Transfektion ist nötig, um möglichst viel Plasmid-DNA in einen hohen Anteil von Zellen zu transferieren. So werden ideale Voraussetzungen für eine Integration der eingeschleusten DNA in die chromosomale DNA geschaffen.<sup>29</sup> Die Basis zur Entwicklung der Selektionsmethode ist die von der IBA Lifesciences GmbH (IBA) vertriebene TACS<sup>®</sup>-Methode. Dabei soll das zu entwickelnde Verfahren mehrere Kriterien erfüllen, um den Anforderungen der Kunden zu entsprechen und eine Alternative zu etablierten Verfahren zu bieten.

Das wichtigste Kriterium ist eine Anreicherung von hochproduzierenden Zellen, wobei das Expressionslevel des selektierten Zellpools über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen stabil sein soll. Aufgrund der Anreicherung von hochproduzierenden Zellen wird eine signifikant erhöhte Proteinexpression der selektierten Population gegenüber der Ausgangspopulation erwartet. Ein wichtiger Aspekt ist, dass die Methode leicht zu skalieren sein soll, ohne die Zeit zur Selektion der Zellen dabei maßgeblich zu erhöhen. Darüber hinaus wird eine möglichst geringe negative Beeinflussung der Zellviabilität sowie des Zellwachstums durch die Selektion angestrebt. Idealerweise lässt sich die Methode sowohl zur Selektion von humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*, HEK239) als auch von chinesischen Hamster Ovarzellen (*chinese hamster ovary cells*, CHO) verwenden. Beide Zelllinien stellen die in eukaryotischen, biotechnologischen Produktionsprozessen am meisten verwendeten Zelllinien dar,<sup>6,11,16,19,22</sup> wobei zur stabilen Proteinproduktion überwiegend CHO-Zelllinien verwendet werden.<sup>19,30</sup> Abschließend muss die Methode einem einfachen und robusten Selektionsprozess folgen, der in Bezug auf die Selektionskosten sowie die nötige Durchführungsdauer kompetitiv zu etablierten Methoden ist.

## 2. Stand der Forschung

In diesem Kapitel wird zunächst die statistische Versuchsplanung erläutert. Anschließend wird die Polyethyleniminbasierte Transfektion beschrieben sowie eine Einführung in die transiente und stabile Proteinexpression gegeben. Letztere wird detaillierter bzgl. der Themenkomplexe der Herstellung stabiler Zellen, der Strategien zur Regulation von Markergenen sowie verschiedener Methoden zur Selektion von stabilen Zellen beschrieben. Ein besonderer Fokus wird auf die Selektion von Zellen mittels der sogenannten *Traceless Affinity Cell Selection* (TACS®) -Technologie gelegt.

### 2.1 Statistische Versuchsplanung

In dieser Arbeit werden verschiedene Prozesse wie z.B. die Transfektion von Zellen oder die Selektionsbedingungen der neu entwickelten Methode optimiert. Bei all diesen Experimenten sollen sowohl optimale Bedingungen identifiziert als auch der Einfluss der untersuchten Parameter auf die definierten Zielgrößen ermittelt werden. Eine sehr effiziente Methode, die dazu nötigen Experimente zu planen, stellt die statistische Versuchsplanung bzw. das *Design of Experiments* (DoE) dar. Eine gute und umfangreiche Publikation findet sich in „Statistische Versuchsplanung“ von Siebertz et al.<sup>31</sup>

Bei der klassischen Versuchsplanung gilt das Dogma, dass immer nur einer der untersuchten Einflussgrößen, der sogenannten Faktoren, geändert wird. Dies soll sicherstellen, dass die beobachteten Effekte auf dem betrachteten Faktor basieren. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die untersuchten Faktoren nicht gegenseitig beeinflussen. Werden mehrere Faktoren untersucht, so führt dieser Ansatz schnell zu einem hohen experimentellen Aufwand.

Wenn z.B. drei Faktoren ( $k$ ) mit jeweils fünf verschiedenen Ausprägungen, den sogenannten Stufen ( $p$ ), analysiert werden sollen, ergibt sich daraus folgende Gleichung:<sup>31</sup>

$$\text{Anzahl der Versuche} = k^p = 5^3 = 125$$

In der statistischen Versuchsplanung werden dagegen Versuchspläne erstellt, bei denen mehrere Faktoren gleichzeitig verändert werden. Die Auswahl des jeweiligen Versuchsplans legt dabei auch fest, wie die jeweiligen Stufen der untersuchten Faktoren gewählt werden müssen. In jedem Fall ermöglicht die Festlegung der Stufen eine Auswertung nach dem Prinzip des DoE. Je nach Fragestellung können verschiedene Versuchspläne verwendet werden. Vollfaktorielle Versuchspläne entsprechen bzgl. der Versuchsanzahl im Grunde dem klassischen Versuchsdesign. Allerdings können bei einer Zunahme der Anzahl der Faktoren Experimente aus dem Versuchsplan entfernt werden, ohne die Qualität der Ergebnisse zu reduzieren. Diese sogenannten teilfaktoriellen oder Screening-Versuchspläne sowie kleine vollfaktorielle Pläne mit zwei Stufen werden häufig eingesetzt, um Faktoren zu identifizieren, die einen großen Einfluss auf die Zielgröße haben und um die ungefähre Lage eines Optimums zu ermitteln. Anschließend können die Faktoren mit dem größten Einfluss ausgewählt und genauer untersucht werden.<sup>31</sup>

Ein häufig verwendeter Versuchsplan für die Identifizierung von idealen Prozessbedingungen ist der sogenannte zentral zusammengesetzte Versuchsplan (*Central Composite Design, CCD*). Im Gegensatz zu einem klassischen oder vollfaktoriellen Versuchsplan wären bei einem CCD mit drei Faktoren und fünf Stufen nicht 125, sondern lediglich 15 Experimente nötig. In der Regel wird das Experiment, bei dem alle Faktoren auf die mittlere Stufe eingestellt sind (der sogenannte *center point*), mehrfach durchgeführt. Dadurch lässt sich der Fehler ermitteln, der durch Störfaktoren im Experiment entsteht.<sup>31,32</sup> Werden z.B. drei *center points* eingeschlossen, so sind im obigen Beispiel 18 Experimente nötig.

Trotz der signifikanten Reduktion der Versuchsanzahl wird die Aussagekraft der Ergebnisse im DoE gegenüber der klassischen Versuchsplanung nicht verringert. Tatsächlich können nicht nur optimale Bedingungen adäquat bestimmt, sondern

auch Interaktionseffekte zwischen den untersuchten Faktoren identifiziert werden.<sup>31</sup> So könnte z.B. die ideale DNA-Konzentration von der jeweiligen Zelldichte beeinflusst werden.

Die Auswertung eines DoE erfolgt mit einer entsprechenden Statistiksoftware. Mittels der Varianzanalyse kann der Einfluss der untersuchten Faktoren auf die Zielvariablen bestimmt werden. Außerdem wird oft die sogenannte Reaktionsoberflächenmethode (*response surface method*, RSM) verwendet, um die Ergebnisse im Versuchsraum in einer Reaktionsoberflächen-Grafik darzustellen und Optima zu berechnen.<sup>32</sup> Des Weiteren geben statistische Größen wie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ , das adjustierte Bestimmtheitsmaß  $\bar{R}^2$ , der *lack of fit* sowie das Signifikanzniveau Aufschluss über die Qualität des errechneten Modells.<sup>31</sup>

Um die Einflüsse der untersuchten Faktoren auf die Zielgröße zu bestimmen, wird ein Regressionsmodell errechnet. Die Funktion eines Regressionsmodells mit beispielsweise zwei Faktoren lautet<sup>31,32</sup>:

$$Y = b_0 + b_1P_1 + b_2P_2 + b_3P_1^2 + b_4P_2^2 + b_5P_1 \times P_2$$

Mit  $Y$  = abhängige Variable,  $b_0 - b_5$  = Regressionskoeffizienten,  $P_1$  = erste Prädiktor(unabhängige)-variable,  $P_2$  = zweite Prädiktor(unabhängige)-variable.

Anhand der Regressionskoeffizienten kann der Einfluss der jeweiligen Prädiktorvariable auf die abhängige Variable beziffert werden. Außerdem enthält das Regressionsmodell die linearen und quadratischen Einflüsse der Prädiktorvariablen sowie den Einfluss der Wechselwirkung ( $P_1 \times P_2$ ) beider Variablen.<sup>32</sup> Diese Einflüsse werden Effekte genannt. Durch die Bildung eines Regressionsmodells, das die Messwerte präzise beschreibt, kann überprüft werden, welche Effekte einen signifikanten Einfluss auf die Zielvariable haben. Nicht signifikante Einflüsse werden aus dem Modell entfernt und ein neues Modell ohne diese Effekte berechnet.<sup>31</sup>

## 2.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels Polyethylenimin

In Kapitel 1 wurde die Bedeutung von Säugerzellen für die Produktion von rekombinanten Proteinen beleuchtet. Damit eine Zelle ein rekombinantes Protein exprimieren kann, muss sie transfiziert werden. Transfektion bezeichnet das Einbringen von Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) in eine

eukaryotische Zelle. Durch die Transfektion wird die proteinkodierende DNA in die Zelle eingeschleust, zusammen mit weiteren genetischen Elementen, die unter anderem die Expression des Gens regulieren. Wird die DNA mittels eines Virus in die Zelle übertragen, so spricht man von einer Transduktion. Plasmide oder Viren dienen jeweils als Transportvehikel und werden als Vektor bezeichnet. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Methoden entwickelt, um DNA in Zellen einzubringen.<sup>17,30,33,34</sup> Eine der häufigsten verwendeten Methoden ist die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI).<sup>17,35</sup>

Es existieren zahlreiche PEI-Varianten wie verzweigtes oder lineares PEI, sowie PEI-Varianten unterschiedlicher molekularer Größe. Diverse Hersteller bieten PEI-basierte Transfektionsreagenzien an (z.B. Polyplus-transfection SA, France, Polysciences Inc., USA, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Eine der am häufigsten eingesetzten PEI-Varianten ist 25 kDa lineares PEI.<sup>17,34</sup> Neben vielen anderen Zellen lassen sich vor allem HEK293- und CHO-Zellen effektiv mit PEI transfizieren. Außerdem ist die PEI-basierte Transfektion kostengünstig und ermöglicht so eine ökonomische Transfektion im größeren Maßstab.<sup>17</sup> PEI ist ein kationisches Polymer, welches DNA bindet. Bei einer ausreichenden PEI-Menge wird die DNA kondensiert.<sup>35-37</sup> Faktoren wie das Verhältnis der PEI- und DNA-Konzentration, der Puffer bzw. das Medium, in dem die Komplexbildung erfolgt, sowie die Inkubationszeit bei der Komplexbildung beeinflussen die physikalischen und chemischen Eigenschaften der entstehenden DNA-PEI-Komplexe. Diese Eigenschaften wie Größe, Ladung, Grad der Kondensation oder Stabilität der Komplexe haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Transfektionseffizienz.<sup>37-40</sup>

Die Aufnahme der DNA-PEI-Komplexe erfolgt in mehreren Schritten. Zuerst werden die Komplexe durch Syndecane, die in Filopodien konzentriert sind, gebunden und zur Zelloberfläche transportiert.<sup>41</sup> Anschließend werden die Komplexe mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen.<sup>42</sup> Zu einer Freisetzung der Komplexe wird davon ausgegangen, dass der sogenannte Protonenschwammeneffekt eintritt.<sup>37</sup> Aufgrund der Protonen-Pufferkapazität von PEI werden H<sup>+</sup>-Ionen, welche in die Endosomen gelangen, durch PEI gebunden, wodurch immer wieder neue H<sup>+</sup>-Ionen in die Endosomen transportiert werden und ein osmotischer Druck entsteht. Tatsächlich konnten Kichler et al. zeigen, dass durch die Inhibierung der Ansäuerung von

Endosomen mittels Bafilomycin A1, die Transfektionseffizienz stark reduziert wird.<sup>43</sup> Rehman et al. demonstrierten, dass die Endosomen nicht vollständig zerstört werden, sondern dass der osmotische und mechanische Effekt lokal begrenzt ist und zu einer lokalen Desintegration der Endosomen führt. Anschließend gelangt die DNA in den Nucleus.<sup>44</sup> Damit die Gene auf dem Plasmid exprimiert werden können, ist es notwendig, dass der PEI-DNA-Komplex wieder dissoziiert.<sup>45</sup> Eine gute Übersicht über den Mechanismus der PEI-Transfektion bieten die Publikationen von Gutiérrez-Granados et al. und Jäger et al.<sup>17,34</sup>

Ideale Transfektionsbedingungen müssen für jede Zelllinie und das verwendete Medium identifiziert werden. Dabei wird in vielen Fällen der Einfluss der Zelldichte, der DNA-Konzentration, sowie das PEI-DNA-Verhältnis untersucht.<sup>17,30,46-48</sup> Gerade der Faktor PEI ist kritisch. Höhere PEI-Konzentrationen und vor allem auch freies nicht komplexiertes PEI stabilisieren die PEI-DNA-Komplexe. So schützt PEI die DNA vor einem Verdau durch DNAsen, verhindert aber auch eine vorzeitige Destabilisierung der Komplexe durch andere Einflüsse in der Zelle. Das Medium bzw. der Puffer, in dem DNA und PEI gemischt werden, haben zudem einen Einfluss auf die Aggregation der Komplexe. Eine starke Aggregation der Komplexe verhindert die Dissoziation von PEI und DNA und somit eine erfolgreiche Transfektion.<sup>49</sup> Darüber hinaus ist eine ausreichende Menge an PEI in den Endosomen nötig, um den Protonenschwamm-Effekt zu induzieren und Endosomen zu destabilisieren.<sup>43</sup> Des Weiteren beeinflusst das PEI-DNA-Verhältnis die Größe der Komplexe,<sup>36</sup> was wiederum eine Auswirkung auf die Transfektion hat.<sup>43</sup> Andererseits wirken sich hohe PEI-Konzentrationen toxisch auf die Zellen aus,<sup>50</sup> wobei hier vor allem freies nicht gebundenes PEI für den zytotoxischen Effekt verantwortlich ist.<sup>51</sup> In der Vergangenheit wurden DNA-PEI-Komplexe zuerst in einem Puffer gebildet und anschließend zu den Zellen gegeben. Später wurden Transfektionsprotokolle entwickelt, bei denen die Zugabe von DNA und anschließend PEI direkt in die Zellkultur erfolgen und so eine Präinkubation nicht notwendig ist.<sup>52,53</sup>

Interessanterweise wird in vielen Studien im Rahmen einer klassischen Versuchsplanung das PEI-DNA-Verhältnis optimiert,<sup>52,54</sup> statt die DNA- und PEI-Konzentration getrennt voneinander zu betrachten. Gerade für die Optimierung von Transfektionsprozessen ist jedoch das Konzept der statistischen Versuchsplanung

geeignet, wie einige Studien zeigen.<sup>47,55-57</sup> Obwohl für die Transfektion von HEK293-Zellen der Erfolg von Transfektionen bei hohen Zelldichten von bis zu  $20 \times 10^6$  Zellen/ml beschrieben ist,<sup>52,58</sup> wurden CHO-Zellen eher bei Zelldichten von bis zu  $6 \times 10^6$  Zellen/ml transfiziert (z.B. ExpiCHO™, Thermo Fisher Scientific Inc., USA).<sup>17,56</sup> Schmitt et al. publizierten 2020 ein Transfektionsprotokoll, bei welchem CHO-Zellen bei einer Zelldichte von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml transfiziert wurden. Die erzielten Titer für 20 klinische Antikörper überstiegen dabei die Ausbeuten, die mit dem in der Industrie häufig verwendeten ExpiCHO™-System erzielt wurden.<sup>47</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden CHO-S-Zellen in CHO-TF Medium der Firma Xell kultiviert. Da bislang in der IBA kein Transfektionsprotokoll für CHO-Zellen in diesem Medium existiert, muss dieses im Rahmen der Dissertation erst entwickelt werden.

### **2.3 Transiente Proteinexpression in eukaryotischen Zellen**

Im Abschnitt 2.2 wird die Transfektion von eukaryotischen Zellen beschrieben. Nachdem die DNA in die Zelle eingeschleust wird, liegt sie in der Regel extrachromosomal vor. Das bedeutet, dass die DNA nicht in die chromosomale DNA integriert ist. Allerdings verringert sich die Konzentration der extrachromosomalen DNA in der Zelle innerhalb weniger Tage nach der Transfektion rapide. Ohne Selektionsdruck sinkt der Anteil positiver Zellen bereits nach drei Wochen unter 1 %.<sup>59</sup> Ein wesentlicher Grund dafür ist, dass bei der Zellteilung lediglich die chromosomale DNA dupliziert und an die Tochterzelle weitergegeben wird. Dagegen wird die extrachromosomale DNA nicht repliziert, mit der Folge, dass sich die Konzentration in der Zelle bei jeder Zellteilung und der Weitergabe extrachromosomaler DNA an die Tochterzelle verringert.<sup>60</sup> Außerdem wird extrachromosomale DNA von der Zelle verdaut, wodurch sich deren Konzentration zusätzlich verringert.<sup>61</sup> Diese Faktoren führen dazu, dass die transfizierten Zellen in den ersten Tagen nach der Transfektion eine hohe Proteinexpression aufweisen, diese dann jedoch in den nächsten Tagen rasch abnimmt.<sup>59,60</sup> Aus diesem Grund wird ein derartiger Expressionsverlauf als transiente Expression bezeichnet. Transiente Expression ist die geeignetste Methode, um in kurzer Zeit (wenige Tage bis zwei Wochen) Proteinmengen im Milligramm- oder auch im Grammbereich zu produzieren, da keine Zellselektion nötig



ist.<sup>47,58,62</sup> Sie wird daher in der Wirkstoffentwicklung vor allem in der Forschungsphase bis hin zur präklinischen Phase eingesetzt.<sup>60,63</sup>

Werden jedoch größere Mengen Protein benötigt, so ist diese Methode wegen Limitationen bei der Maßstabserhöhung ungeeignet. Vor allem die hohen Kosten für große DNA-Mengen zur Transfektion vieler Zellen und der hohe technische Aufwand sind hier limitierende Faktoren.<sup>63,64</sup> Außerdem handelt es sich bei einer transient exprimierenden Kultur immer um eine heterogene Zellpopulation. Hinzu kommt eine nicht zu vernachlässigende Varianz der Transfektionsergebnisse. Deshalb sind transiente Expressionsstrategien auch mit den behördlichen Auflagen zur Herstellung von therapeutisch verwendeten Proteinen bislang nicht vereinbar. Ab einem gewissen Punkt in der pharmazeutischen Entwicklung rekombinanter Proteine muss die Produktion daher in sogenannten stabilen klonalen Zelllinien erfolgen.<sup>6,19,22</sup>

## 2.4 Stabile Proteinexpression in eukaryotischen Zellen

Der Inhalt der nachfolgenden Kapitel befasst sich mit einer generellen Einführung zur Herstellung von stabil exprimierenden Zellen sowie verschiedenen Möglichkeiten, die Expression der dazu nötigen Markergene zu kontrollieren.

### 2.4.1 Prinzip der Herstellung von stabilen Zelllinien

Wenngleich der überwiegende Teil der bei der Transfektion in die Zelle eingebrachten DNA extrachromosomal vorliegt, wird in einigen wenigen Zellen die eingeschleuste DNA in die chromosomale DNA integriert. Wie häufig dies in einer Zelle geschieht, ist ebenso zufallsabhängig wie der chromosomale Ort, in den die DNA integriert wird. Durch die Integration in ein Chromosom wird die eingeschleuste DNA bei der Zellteilung dupliziert und an die Tochterzelle weitergegeben. Folglich weist die Tochterzelle dieselbe Expression auf wie die Ursprungszelle; die Expression ist über mehrere Generationen stabil.<sup>19</sup> Eine Möglichkeit, die zufällige Integration der eingebrachten DNA zu vermeiden und eine effizientere, gerichtete Integration in bestimmte Loci zu ermöglichen, ist die Verwendung von Transposasen (PiggyBac™, *Sleeping Beauty*, *Leap-in* Transposase®).<sup>59,65-69</sup> So konnten mittels der PiggyBac™-Transposase stabile Pools mit einer Volumenausbeute des Proteins von Interesse

(POI) von bis zu 7,6 g/l generiert werden.<sup>65</sup> Insbesondere in Bezug auf die Produktion in einem größeren Maßstab ist die stabile Expression vorteilhaft, da im Prinzip keine Kosten für die DNA anfallen und der Bioreaktor mit einer im Vergleich zur transienten Expression geringen Zelldichte inokuliert werden kann. Des Weiteren sind viele Kultivierungsprozesse, wie z.B. eine kontinuierliche Kultivierung, nur mit stabilen Zellen wirtschaftlich.

Die Entwicklung einer stabilen Zelllinie beginnt immer mit einer Transfektion der Zellen bzw. einer viralen Transduktion. Allerdings unterscheiden sich die Anforderungen an die Vektoren, die zur Entwicklung einer stabilen Zelllinie verwendet werden, von denen, die bei Vektoren einer transienten Expression zum Einsatz kommen.<sup>60</sup> Eines der wichtigsten Bestandteile eines Plasmids ist der Promotor. Er reguliert die Expression des nachfolgenden Gens. Soll eine stabile Zelllinie entwickelt werden, so ist neben der durch den Promotor induzierten Expressionsstärke in der Zielzelllinie auch die Stabilität des Promotors in der Zelllinie von Bedeutung.<sup>60</sup> Virale Promotoren ermöglichen oft eine hohe Genexpression. Andererseits ist die Expression einiger Promotoren weniger stabil, als die anderer.<sup>70</sup> Promotoren mit einer instabilen Expression eignen sich durchaus für die transiente Expression, werden aber bei der Generierung von stabilen Zellen vermieden. Es gibt zahlreiche Promotoren aus verschiedenen Organismen und Viren. Einige der am häufigsten verwendeten Promotoren sind der Promotor des *Cytomegalie-Virus* (CMV) sowie der Promotor des eukaryotischen Elongationsfaktors eEF-1 (EF1 $\alpha$ ).<sup>63</sup> Einige Studien kommen zu dem Ergebnis, dass die Expression mittels des EF1 $\alpha$ -Promotors stabiler ist als die des CMV-Promotors.<sup>26,70</sup> Darüber hinaus existieren synthetische Promotoren.<sup>71</sup>

Ein für die Entwicklung von stabilen Zelllinien essenzieller Bestandteil eines Vektors ist ein sogenanntes Markergen/Markerprotein. Da nur wenige der transfizierten Zellen die auf dem Vektor liegende Genkassette stabil in ihr Genom integrieren, muss es eine Möglichkeit geben, diese Zellen von den nicht transfizierten und den transient exprimierenden Zellen zu trennen. Hierzu werden Markerproteine in den Vektor integriert. Es gibt viele Selektionsstrategien und viele mögliche Markerproteine die verwendet werden können, auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.<sup>1,60,63,72</sup> In jedem Fall muss auch die Expression des Markerproteins reguliert

werden (siehe Kapitel 2.4.2). Das Markerprotein kann entweder auf demselben Vektor liegen wie das zu exprimierende POI oder auf einem zweiten Vektor, mit dem die Zelle kotransfiziert wird. Ein klarer Vorteil bei der Integration in demselben Vektor besteht darin, dass POI und Markerprotein bei einer Integration in die Zell-DNA auf dem gleichen genomischen Abschnitt liegen. Dadurch besteht eine höhere Korrelation zwischen der Expression des Gens von Interesse (*gene of interest*, GOI) und des Markerproteins. Wird beispielsweise ein Abschnitt des Zellgenoms inaktiviert, so werden wahrscheinlich beide Gene davon betroffen sein.<sup>1,60,73</sup> Bei einer Zwei-Vektor-Strategie kann die Anzahl der Integrationsereignisse für beide Vektoren und somit für Markergen und GOI unterschiedlich sein.<sup>1,60</sup>

Neben den oben genannten genetischen Elementen werden auch oft Elemente in den Vektor integriert, die die Stabilität der Expression erhöhen sollen (z.B. *ubiquitous chromatin opening elements* (UCOE) und Kerngerüst-/Kernmatrixanheftungsregionen (S/MARS)). Dadurch soll eine größere Unabhängigkeit der Expression vom Integrationsort der eingeschleusten Genkassette erreicht werden.<sup>1,60,64,74</sup>

Nach der Transfektion der Zellen folgt eine Phase der Selektion mit dem Ziel, die stabil exprimierenden Zellen zu isolieren. So entsteht ein heterogener Pool aus stabilen Zellen. Diese Population weist in der Regel eine hohe Variabilität der Zellklone bezüglich der zellspezifischen Produktivität auf, die auf der Anzahl der integrierten Genkassetten, dem Integrationsort und den Eigenschaften der Klone beruhen. Auch sinkt die Expressionsrate dieses Pools in der Regel über die Zeit, da bei vielen Klonen die übertragene Genkassette nicht in chromosomale Loci integriert wird, die dauerhaft transkribiert werden.<sup>1,59,60,69</sup> Darüber hinaus können sich die Klone in Bezug auf ihre Teilungsrate und andere Faktoren wie Sekretionskapazität oder Toleranz gegenüber Scherstress unterscheiden. Darum kann an die Selektion eine Einzelzellablage z.B. durch limitierte Verdünnung oder automatisierte Methoden (FACS, ClonePix<sup>®</sup>, Beacon<sup>®</sup>, etc.) angeschlossen werden. Auf diese Weise kann eine klonale Zelllinie erhalten werden, bei der alle Zellen von derselben Mutterzelle abstammen. Die geeignetsten klonalen Zelllinien haben eine deutlich höhere Expression als der Zellpool, aus dem Sie stammen und weisen in Bezug auf Expression und Proteinqualität identische Eigenschaften bei jeder Proteinproduktion auf. Darum sind sie für die Herstellung von therapeutischen rekombinanten Proteinen

zwingend nötig. Im früheren Verlauf der Wirkstoffentwicklung ist jedoch ein Pool aus stabilen Zellen ausreichend, zumal es Monate dauern kann, eine stabile klonale Zelllinie zu entwickeln. In jedem Fall führt ein höherer Anteil von hochproduzierenden Zellen im stabilen Pool zu mehr hochproduzierenden klonalen Zellen, wodurch die Anzahl der Zellen für die Einzelzellklonierung verringert werden kann.<sup>1,60,74</sup>

### 2.4.2 Strategien zur Regulation der Markergenexpression

Markergene kodieren für Proteine, die zur Selektion einer stabil exprimierenden Zellpopulation verwendet werden. Wie alle Proteine muss auch die Expression der Markergene reguliert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Expression des Markerproteins wie das GOI durch einen eigenen Promotor zu regulieren. Diese Strategie führt zu einer von der GOI-Expression unabhängigen Transkription des Markerproteins. Durch die Wahl eines schwächeren Promotors für die Markergenexpression kann verhindert werden, dass die Zelle einen unnötig hohen Anteil an Energie und zellulären Ressourcen wie Nährstoffen auf die Expression des Markerproteins verwendet. Gleichzeitig wird durch eine geringere Markerproteinexpression die Stringenz der Selektionsmethode erhöht. Beispielsweise können auf diese Weise nur Zellen mit einer vergleichsweise hohen Expression genug eines Antibiotikaresistenz-vermittelnden Proteins exprimieren, um eine Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum zu überstehen. Zellen, die die Genkassette in einen weniger transkriptiven Lokus im Genom integriert haben, oder weniger Kopien der Kassette aufweisen, können so aus der Kultur entfernt werden.<sup>73,75</sup> Als schwache Promotoren können beispielsweise der Promotor des *Simian-Virus 40* (SV40) oder der Promotor des Phosphoglyceratkinase (PGK)-Gens verwendet werden.<sup>26,76</sup> Ein Nachteil der promotorkontrollierten Transkription des Markergens besteht darin, dass die Expression eines der beiden Promotoren unterdrückt werden kann. In der Literatur werden verschiedene Ursachen für eine verringerte oder völlig ausbleibende Expression diskutiert. So können epigenetische Effekte zur Unterdrückung eines Promotors führen.<sup>77</sup> Auch besteht die Möglichkeit, dass die Terminierung der Transkription des ersten offenen Leserahmens (*open reading frame*, ORF) fehlschlägt und dadurch die Transkription des zweiten Promotors verhindert wird.<sup>78</sup> Ferner kann einer der Promotoren mit anderen Elementen wie Enhancer oder

anderen Promotoren wechselwirken und so die Transkription unterdrückt werden. Darüber hinaus kann es zu einer Limitation von Transkriptionsfaktoren und Enhancer kommen sowie einer sterischen oder topologischen Veränderung im Zuge der Transkription eines ORFs.<sup>1,79</sup> Welcher Mechanismus auch immer zutrifft, eine Folge kann darin bestehen, dass der genomische Abschnitt mit dem GOI abgeschaltet wird, die Zelle aber weiterhin das Markerprotein exprimiert und somit trotz mangelnder Expression des POI selektiert wird. Allerdings können bei mehreren Kopien der eingebrachten DNA nach wie vor beide Proteine exprimiert werden. Jedoch können sich dann die Expressionsraten der Proteine mit der Zeit ändern.

Alternativ kann die Expression des Markergens durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) kontrolliert werden. IRES finden sich vor allem bei Viren und ermöglichen die Translation von zwei oder mehr Proteinen von einem mRNA-Strang. Die Transkription der DNA wird von einem Promotor kontrolliert, so dass eine mRNA mit der genetischen Information für ein Protein, der IRES und einem weiteren Gen nach der IRES gebildet wird. Normalerweise wird in der eukaryotischen Zelle die Translation begonnen, indem sich verschiedene Proteinfaktoren an der 7-methyl-guanosin Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA anlagern und die Translationsmaschinerie rekrutieren. Die IRES ist eine Nukleotidsequenz, die zur Bildung einer bestimmten Sekundärstruktur der mRNA führt. Der Translationsmaschinerie (40S-Ribosom-Untereinheit, eukaryotischer Initiationsfaktor-3 (eIF-3)) ist es möglich, direkt an diese Struktur zu binden und so einen Cap-unabhängige Translationsstart zu ermöglichen. Auf diese Weise können von demselben mRNA-Strang ein Protein durch eine Cap-abhängige Translation sowie ein weiteres Protein mittels IRES kontrollierter Translation gebildet werden.<sup>80,81</sup> Es besteht auch die Möglichkeit, mehrere IRES auf einer mRNA zu platzieren und so verschiedene Proteine von einem mRNA-Strang zu translatieren<sup>82</sup> oder die Expression eines Proteins durch mehrere IRES-kontrollierte Kopien zu erhöhen.<sup>83</sup> Häufig wird die IRES Sequenz des *Encephalomyocarditis-Virus* (EMCV) verwendet, von der auch mutierte Varianten existieren, die zu einer schwächeren Expression des nachfolgenden Gens führen.<sup>84-86</sup> Außerdem existieren IRES Sequenzen von anderen Viren.<sup>80,87</sup> Im Falle der Expression von POI und Markerprotein besteht der Vorteil einer IRES darin, dass beide Proteine von derselben mRNA gebildet werden. Aus diesem Grund muss eine Zelle,

die das Markerprotein exprimiert, in jedem Fall auch die mRNA-Sequenz für das POI aufweisen. Außerdem wird eine Wechselwirkung zwischen mehreren Promotoren vermieden.<sup>1,88-90</sup> Ein Nachteil bei der Verwendung von IRES ist, dass die Basensequenz des Gens vor der IRES die Expression des Gens nach der IRES beeinflussen kann.<sup>91,92</sup> Dies kann zu einer geringeren Prozessrobustheit bei der Verwendung eines Vektors für verschiedene Proteine führen. Mansha et al. berichten sogar von einer negativen Beeinflussung der Expression des IRES vorgelagerten Gens.<sup>93</sup>

Eine weitere Strategie ist die Verwendung sogenannter 2A-Peptide. Eines der am häufigsten verwendeten 2A-Peptide ist das des Maul- und Klauenseuche Virus (F2A). Bei 2A-Peptiden handelt sich um virale Strukturmodule die zwei Proteine während der Translation teilen. Folglich kodiert die mRNA ein Protein vor und ein Protein nach dem 2A-Peptid. Es wird angenommen, dass während der Translation eine reguläre Peptidbindung durch die F2A-Sequenz inhibiert wird, wodurch es zu einer Trennung der beiden Proteine kommt. Damit sind die Expression des POI und des Markerproteins wie bei der Verwendung einer IRES gekoppelt.<sup>94</sup> Allerdings trägt das Protein nach dem 2A-Peptid ein zusätzliches Prolin am N-Terminus und das Protein vor dem 2A-Peptid zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus. Darüber hinaus beschreibt die Literatur Fälle, in denen die Proteine vor und nach einem 2A-Peptid nicht getrennt werden, so dass ein Fusionsprotein entsteht.<sup>66,66,95</sup> Dieses müsste im späteren Prozess vom Zielprotein abgetrennt werden, wodurch die Proteinreinigung verkompliziert wird. Allerdings sind diese Faktoren bei der Koexpression von mehreren Markerproteinen weniger problematisch, solange die Funktion der Markerproteine nicht beeinträchtigt ist.

Es gibt also verschiedene Optionen die Markerproteinexpression zu kontrollieren. Einer der entscheidenden Aspekte bei der Entwicklung von stabilen Zelllinien ist, welche Selektionsstrategie und somit welcher Marker ausgewählt werden.

### 2.4.3 Selektion von stabilen Zellen

Die folgenden Kapitel beschreiben den Stand der Technik zu verschiedenen Selektionsmethoden wie der Antibiotikaselektion, der Selektion mittels des Dihydrofolatreduktase-Systems (DHFR) und des Glutamin-Synthetase-Systems (GS) sowie der

Selektion mittels magnetischer Beads und der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS).

#### 2.4.3.1 Selektion von Zellen mittels Antibiotika

Eine der am häufigsten eingesetzten Methoden zu Selektion von stabilen Zellen ist die Selektion mittels eines Antibiotikums.<sup>22,96</sup> Es gibt eine ganze Reihe von Antibiotika, die in eukaryotischen Zellen wirksam sind und die sich in ihrem Wirkmechanismus unterscheiden.<sup>68,72,90,97</sup> Welches Antibiotikum eingesetzt wird, hängt dabei auch maßgeblich von der verwendeten Zelllinie ab. Einige Antibiotika sind sehr wirksam und können Zellen in wenigen Tagen abtöten (z.B. Puromycin).<sup>90,98</sup> Trotzdem verbleiben oft nach der Selektion Zellen in der Kultur, die kein Resistenzgen exprimieren. Unabhängig vom eingesetzten Antibiotikum ist das generelle Vorgehen bei einer antibiotischen Selektion allerdings immer gleich.

Als erstes werden nicht transfizierte Zellen in verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums kultiviert. Dabei wird die Antibiotikakonzentration ermittelt, bei der alle Zellen sterben. Diese oder höhere Konzentrationen werden später eingesetzt, um alle nicht stabilen Zellen aus einer Population zu entfernen. Nun wird eine Zellkultur mit einem Vektor transfiziert, der neben dem GOI auch ein Gen trägt, welches eine Resistenz gegen das entsprechende Antibiotikum vermittelt. Ein bis drei Tage nach der Transfektion werden die Zellen dann in einem Medium kultiviert, welches eine toxische Antibiotikakonzentration für Zellen enthält, die kein Resistenzgen exprimieren. Auf diese Weise sterben Zellen, die nicht transfiziert wurden oder die die eingeschleuste Genkassette nicht stabil exprimieren und dadurch nach einiger Zeit über keine Resistenz mehr verfügen.<sup>60,72,90,98</sup>

Diese Methode wird sehr häufig verwendet und bietet einige Vorteile. Sie kommt ohne teure Geräte aus und führt somit zu keinen hohen Anschaffungs- oder Wartungskosten. Außerdem kann sie auf alle gängigen Produktionszelllinien verwendet werden.<sup>22,72</sup> Im kleinen Maßstab ist sie preiswert und kann leicht parallelisiert werden, wodurch mehrere Selektionen gleichzeitig vorgenommen werden können. Des Weiteren existieren zahlreiche Protokolle und Publikationen zu der Methode.<sup>72,90,97,99</sup> Doch die Selektion mit Antibiotika besitzt auch eine ganze Reihe von Nachteilen. Zunächst muss für die verwendete Zelllinie in dem verwendeten

Kulturmedium die toxische Konzentration ermittelt werden.<sup>60</sup> Dennoch kann der Anteil an Zellen, die das POI nach der Antibiotikaselektion exprimieren, je nach Antibiotikum, gering sein. Außerdem kann die Selektion trotz der vorherigen Bestimmung der zur Selektion nötigen Antibiotikakonzentration fehlschlagen, so dass keine stabilen Pools mit einer ausreichend hohen Viabilität generiert werden können.<sup>72</sup>

Ein Grund hierfür ist vor allem, dass die toxische Konzentration eines Antibiotikums in der Regel nur mit nicht transfizierten Zellen ermittelt wird. Tatsächlich ist aber entscheidend, wie groß die Differenz zwischen den Konzentrationen ist, bei der nicht resistente bzw. resistente Zellen sterben (Selektionsfaktor), um zu ermitteln, welches Antibiotikum für eine Selektion ideal ist.<sup>98</sup> Außerdem bedeutet eine Selektion mittels Antibiotika während der Selektionsphase immer ein hohes Maß an Stress für die Zellen und eine starke Abnahme der Viabilität, von der sich die Zellen erholen müssen. Um die Selektion mittels Antibiotika zu überleben, ist oftmals nur eine geringe Expressionsrate des Antibiotikaresistenzgens nötig. Aus diesem Grund sind die Expressionslevel des POI im stabilen Pool häufig nur gering.<sup>90</sup> Natürlich kann die Antibiotikakonzentration in der Kultur erhöht werden, um Zellen zu selektieren, die eine höhere Expression des Resistenzgens besitzen und damit häufig auch eine höhere Expressionsrate des POI. Allerdings führt dies zu höherem Stress für die Zellen in der Kultur. Darum ist eine Erhöhung des Selektionsdrucks nur bedingt möglich, vor allem wenn der Selektionsfaktor für das gegebene Antibiotikum gering ist. Außerdem resultiert dieser Ansatz nicht zwangsläufig in höheren Produktionsraten.<sup>97</sup> In Vorversuchen dieser Arbeit wurde die GFP-Expression von Kulturen bestimmt, die mit verschiedenen Puromycinkonzentrationen selektiert wurden. Dabei ließ sich die Expression nur bis zu einem gewissen Maße erhöhen, bevor sie bei steigender Antibiotikakonzentration wieder abnahm. Alternativ kann die Expression des Antibiotikaresistenzgens verringert werden, wodurch sich die Konzentration verringert, die ausreicht um dem Selektionsdruck zu widerstehen.<sup>90</sup> Diese Strategie kann wiederum dazu führen, dass auch Zellen, die die Genkassette nicht in ihr Genom integriert haben, aber im Vergleich zu anderen Klonen eine höhere Resistenz gegen das Antibiotikum besitzen, überleben. Weil diese Zellen keine Energie auf die Expression der eingebrachten Gene aufwenden müssen, besitzen sie oft einen



Wachstumsvorteil. In der Folge überwachsen diese Zellen die produzierenden Zellen. Letzten Endes muss eine Strategie identifiziert werden, bei der die Stringenz der Selektion hoch genug ist, um eine hohe POI-Expression zu erlauben und gleichzeitig die Viabilität der Kultur nicht zu sehr leidet.<sup>90</sup>

Ebenfalls problematisch ist eine häufig zu beobachtende Abnahme des Expressionslevels des POI, vor allem wenn nach der Selektion kein Antibiotikum mehr verwendet wird.<sup>26,72,100</sup> Forschungen von Gossen et al. haben gezeigt, dass bei der Selektion mit Antibiotika häufig Mosaikmuster im Genom entstehen.<sup>26</sup> Zudem konnten Lanza et al. und Spidel et al. zeigen, dass eine Selektion über mehrere Wochen nötig ist, um die Expression zu stabilisieren und dies in ihren Experimenten nur mit Zeocin™ in einem effizienten Maße möglich war.<sup>72,97</sup>

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine antibiotikabasierte Selektion zwar eine gut zugängliche Methode darstellt, aber keine einfache oder robuste Art der Selektion ist. Resistenzen von nicht transfizierten Zellen, instabile Expression der Gene, hoher Stress während der Selektion, Entwicklung geeigneter Selektionsstrategien und die unterschiedliche Effizienz diverser Antibiotika in verschiedenen Zelllinien sind einige der Gründe dafür.

#### 2.4.3.2 Das DHFR und GS-System

Eine der in der pharmazeutischen Biotechnologie am häufigsten verwendeten Methoden zur Selektion von stabilen Zellen ist das Dihydrofolatreduktase-System (DHFR). Das Enzym DHFR hydriert Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure. Dabei fungiert reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Kofaktor. Diese Reaktion wird für die Synthese von Purinen, Thymidin und einigen Aminosäuren genutzt.<sup>101</sup> Ohne DHFR wird unter anderem die DNA-Replikation unterbrochen. Zellen, die zum Beispiel durch Knockout des entsprechenden Gens DHFR negativ sind, können durch die Transfektion mit einem Vektor, auf dem das DHFR-Gen liegt, wieder ein funktionierendes Enzym exprimieren. Werden die Zellen in einem Medium ohne Hypoxanthin und Thymidin kultiviert, können Zellen ohne funktionsfähige DHFR kein Thymidin synthetisieren und sterben. So kann das DHFR-System zur Selektion von stabilen Zellen verwendet werden. DHFR kann außerdem durch Methotrexat (MTX) gehemmt werden. Bei Zugabe von MTX zum

Medium kann so der Selektionsdruck erhöht werden oder die Methode kann auf Zellen mit intaktem DHFR-Gen angewendet werden. Der erhöhte Selektionsdruck bewirkt eine Amplifizierung der eingebrachten DNA, wodurch Zelllinien mit einer sehr hohen Expression gewonnen werden und mehrere hundert Kopien des Gens entstehen können.<sup>1,18,64,90</sup> Das DHFR-System ist ein Standardsystem in der Produktion von therapeutischen rekombinanten Proteinen und daher von den Behörden akzeptiert.<sup>20</sup>

Alternativ zum DHFR-System wird das Glutamin-Synthetase-System (GS) verwendet, welches auf einem vergleichbaren Prinzip basiert. Ähnlich wie beim DHFR System können GS defizitäre Zellen bei der Transfektion mit einem Vektor, der ein GS-Gen trägt, wieder in die Lage versetzt werden, mittels GS aus Glutamat und Ammonium Glutamin zu synthetisieren. Zellen, die keine stabile GS-Expression besitzen, können dagegen in Medien ohne Glutamin nicht überleben. Ähnlich wie MTX im DHFR-System eingesetzt wird, um die DHFR-Aktivität zu hemmen, kann Methionin Sulfoximin (MSX) die GS hemmen. Die Verwendung des GS-Systems ermöglicht ebenfalls eine Amplifikation der eingebrachten DNA und somit hohe Expressionsraten.<sup>73</sup> Wie beim DHFR-System führt die Verwendung einer Knockout-Zelllinie ohne GS zu einer effizienteren Anwendung des Systems, zumal CHO-Zellen ein endogenes GS-Gen besitzen.<sup>102</sup>

Die bereits im Kapitel 2.4.2 genannten Methoden zur Erhöhung der Selektionsstringenz (z.B. Nutzung schwacher Promotoren, IRES, etc.) können auch im DHFR- und GS-System verwendet werden.<sup>73,90,103</sup> Sowohl mit dem DHFR-System als auch mit dem GS-System können hohe zellspezifische Produktionsraten und Volumenausbeuten im g/l-Bereich erzielt werden.<sup>65,73,102,104</sup> Dennoch weisen beide Systeme auch Nachteile auf. Oftmals werden die hohen Produktausbeuten durch die Genamplifikation in beiden Systemen erzielt. Diese Amplifikation benötigt jedoch mehrere Wochen.<sup>73,103</sup> Außerdem ist die Expression der erhaltenen Populationen oft instabil.<sup>2,22,90</sup>

### 2.4.3.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Einen vollkommen anderen Ansatz stellt die Selektion mit Hilfe von technischen Geräten dar. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Geräte zu Selektion von Zellen

entwickelt. Zu den am weitesten verbreiteten Verfahren zählt die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS).<sup>24</sup> Bei diesem Verfahren werden als Marker Fluoreszenzproteine wie z.B. das grün fluoreszierende Protein (GFP) koexprimiert.<sup>105-107</sup> Allerdings kann die Expression von GFP zu Störungen im Zellmechanismus führen.<sup>108</sup> Tatsächlich kann auch bei Transfektionen in der IBA häufig eine starke Reduktion der Viabilität bei einer hohen GFP-Expression beobachtet werden.

Alternativ gibt es verschiedene Möglichkeiten, einen Teil des exprimierten POI an der Zelloberfläche zu immobilisieren und dann die Zelle mit gegen das POI gerichteten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern zu markieren. In diesem Fall muss jedoch ein solcher Antikörper gegen das exprimierte POI existieren.<sup>109-111</sup> Da viele Antikörper nicht rekombinant hergestellt werden und somit tierischen Ursprungs sind, besteht immer die Gefahr, Viren in die Kultur einzutragen. Daher ist das Verfahren besonders effizient, wenn das POI selbst ein Antikörper ist, da in diesen Fall ein Anti-IgG-Antikörper zur Markierung der Zelle verwendet werden kann.<sup>109,110</sup> Ist das POI kein Antikörper, kann neben dem POI ein Membranprotein als Markerprotein exprimiert werden, welches für die Fluoreszenzmarkierung genutzt wird. Dabei muss nicht ein Antikörper zur Detektion verwendet werden. Stattdessen kann das Markerprotein beispielsweise mit einem Streptavidin bindenden Peptid fusioniert sein, wodurch eine Detektion mittels fluoreszenzkonjugiertem Streptavidin möglich ist.<sup>112</sup> Die fluoreszierenden Zellen werden dann im FACS-Gerät einzeln detektiert und von nicht fluoreszierenden Zellen getrennt. Auf diese Weise können Zielzellen gesammelt werden. Zellen können aber auch einzeln z.B. in Kavitäten einer Mikrotiterplatte abgelegt werden.

FACS-Selektionen haben den Vorteil, dass der Anwender entscheiden kann, welche Fluoreszenzintensität eine Zelle aufweisen muss, damit sie als positive Zelle selektiert wird. Dadurch können mit der FACS-Methode hochproduzierende Zellen spezifisch isoliert werden.<sup>112</sup> Anders als bei den anderen Methoden besteht auch kein kontinuierlicher Selektionsdruck für die Kultur, wodurch einige der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Probleme wie z.B. ein andauernder Stress für die Kultur vermieden werden. Studien zeigen, dass Populationen, die mit der FACS-Methode selektiert wurden, eine höhere Expressionsstabilität aufweisen als

antibiotikaselektierte Kulturen.<sup>26</sup> Falls nötig, kann FACS aber auch in Kombination mit den zuvor beschriebenen Methoden verwendet werden, um besonders hoch exprimierende Zellen zu isolieren oder noch vorhandene negative Zellen zu entfernen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass viele Faktoren für eine erfolgreiche Selektion berücksichtigt werden müssen und daher oft besonders geschultes Personal nötig ist.<sup>24</sup>

Ein gravierender Nachteil der FACS-Methode besteht in den sehr hohen Anschaffungskosten für das Gerät. Auch die Wartungskosten bzw. der Wartungsaufwand sind nicht zu vernachlässigen.<sup>24</sup> Zusätzlich ist es bei den meisten FACS-Geräten schwer, die Sterilität während der Selektion zu gewährleisten, da die Geräte oftmals zu groß für die Reinraumwerkbank sind. Geräte, die eine sterile Selektion ermöglichen, erhöhen die Anschaffungskosten oder beinhalten nur teilweise sterile Komponenten.<sup>113</sup> Im Vergleich zu einer magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS®) basierten Selektion kann die FACS-Selektion deutlich länger dauern, wenn die Zielpopulation nur gering konzentriert ist und eine große Zellzahl selektiert werden muss. Außerdem ist eine Parallelisierung von Selektionen nicht möglich.<sup>24,25</sup> Stress auf die Zellen während der Selektion kann zudem die Viabilität negativ beeinflussen, wenngleich dieser Effekt nicht sehr stark ist. Hier sind vor allem Scherkräfte beim Transport der Zellen durch die Düse des Gerätes zu nennen.<sup>25</sup> So konnte durch die FACS-Selektion eine Veränderung des Metabolismus von Astrozyten nach der Selektion beobachtet werden,<sup>114</sup> wenngleich nicht klar ist, ob dieser Effekt auch bei robusten Zellen wie CHO- oder HEK293-Zellen auftritt und ob dieser Auswirkung auf die Proteinexpression hat.

### 2.4.3.4 Magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS®)

Zellen können mittels an ferromagnetische Partikel gebundene Antikörper selektiert werden, die gegen ein Oberflächenprotein gerichtet sind, welches auf den Zielzellen präsentiert wird. Über die Antikörper-Antigen-Bindung werden die Beads an der Oberfläche der Zielzellen immobilisiert. Das Prinzip wird vor allem zur Selektion von verschiedenen Zellentypen aus Blutproben, rekombinanten T-Zellen, oder Primärzellen verwendet und wurde von Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG entwickelt. Bei diesem Verfahren wird die Probe auf eine magnetische Säule geladen. Dabei

verbleiben die Beads mit den Zielzellen in der Säule. Nicht gebundene Zellen können durch Waschschriffe entfernt werden. Anschließend wird die Probe aus dem Magnetfeld entfernt, wodurch die Beads mit den Zellen isoliert werden können.<sup>115,116</sup> Wenn die Zielzellen an die Beads gebunden werden, so wird dies als positive Selektion bezeichnet.<sup>117</sup> Allerdings verbleiben dabei sowohl die Antikörper als auch die ferromagnetischen Beads an den Zellen. Dadurch können Zellen negativ beeinflusst werden.<sup>118,119</sup> Alternativ können alle Zellen außer den Zielzellen an magnetische Beads gebunden werden, so dass sich die Zielzellen in der Durchlaufaktion befinden (negative Selektion).<sup>117,118</sup> Es gibt viele weitere Anbieter dieser oder ähnlicher Technologien wie beispielsweise Thermo Fischer Scientific (Dynabeads®), Cloneteck (CherryPicker™) oder RND systems.<sup>117</sup> Hierbei kann je nach Art der Beads statt einer Säule auch ein Magnet an ein Gefäß angelegt werden, um die ferromagnetischen Beads an der Gefäßwand zu immobilisieren. Um das Problem der weiterhin an die Zellen gebundenen Beads und Antikörper zu umgehen, bietet die IBA die sogenannte *Traceless Affinity Cell Selection* (TACS®) an, auf die in Kapitel 2.5 näher eingegangen wird.

Wenngleich MACS® überwiegend zu Selektion von Primärzellen oder von Zellen in der Zelltherapie eingesetzt wird, kann es auch verwendet werden, um Zellen zu isolieren, die ein rekombinantes Protein exprimieren. Dazu werden die Zellen mit einem Vektor transfiziert, der neben dem GOI auch ein Gen für ein auf der Zelloberfläche präsentiertes Markerprotein enthält. Oft sind die Marker cytosolseitig trunziert, so dass nur die Transmembran- und die extrazelluläre Domäne vorhanden sind.<sup>120–122</sup> Neben einem trunzierten CD4-Rezeptor werden auch andere Oberflächenmarker wie beispielsweise trunziertes humanes CD271 (LNGFR), ein Maus MHC Klasse I Molekül H-2Kk (MACSelect™ K<sup>k</sup> System, Miltenyi Biotec B.V. & Co) oder Streptavidin exprimiert, um die Zellen zu selektieren.<sup>121–123</sup> Manchmal werden die Oberflächenmarker zudem mit einem Tag fusioniert, um magnetische Beads mit einem entsprechend bindenden Liganden oder Antikörper zu verwenden.<sup>124,125</sup> Wird die transfizierte Population mit ferromagnetischen Beads, die einen Antikörper gegen das Oberflächenprotein tragen, inkubiert, so binden die magnetischen Beads an die Zielzellen. Auf diese Weise können durch mehrere konsekutive Selektionsrunden Zellen isoliert werden, die eine stabile Expression des GOI aufweisen. Dabei

kann die Expression des GOI an die des Markerproteins mittels einer IRES gekoppelt werden. Selbst bei einer geringen Anzahl an Zielzellen (>0,1 %) in der Ausgangspopulation kann so durch mehrere Selektionsrunden der Anteil der Zielzellen auf über 95 % gesteigert werden.<sup>120</sup>

Im Vergleich zu anderen Methoden werden hohe Scherkräfte oder Zellstress durch toxische Substanzen vermieden. Dadurch kann bei der Selektion mittels magnetischer Beads eine hohe Viabilität von über 95 % erreicht werden.<sup>117</sup> Auch lässt sich die Methode leicht skalieren, da nur die Bead-Menge an die Zellzahl angepasst werden muss. Damit ist diese Form der Selektion auch gut geeignet, um Zielzellen vor einer weiteren FACS-Sortierung anzureichern und damit die Effizienz der FACS-Sortierung zu erhöhen.<sup>24</sup> Des Weiteren sind die Kosten im Vergleich zur Anschaffung von Geräten wie einem FACS gering und die Methode erlaubt eine Parallelisierung der Selektionen. Darüber hinaus ist die magnetbasierte Selektion einfach und schnell durchzuführen.<sup>117</sup>

Ein großer Nachteil der Methode ist, dass zwar positive Zellen aus der Kultur isoliert werden, allerdings können die gebundenen Zellen nicht wieder spezifisch von den Beads dissoziiert werden. Daher eignen sich diese Verfahren zwar zur Anreicherung positiver Zellen, erlauben jedoch keine direkte Sortierung in Abhängigkeit der Oberflächendichte der Marker.<sup>24</sup> Eine spezifische Selektion hochproduzierender Zellen ist so nicht möglich und es existieren nach Kenntnisstand des Autors auch keine Publikationen, die eine Methode zur Selektion von stabilen, hochproduzierenden Zellen mittels dieser Methode beschreiben. Gaines und Wojchowski beschreiben zwar, wie mit der Methode stabile FDCW2 Zellen mittels mehrfacher MACS®-Selektion generiert werden können, allerdings wird auch hier keine Anreicherung von hochexprimierenden Zellen beschrieben. Der Anstieg des gemessenen Luciferasignals in den selektierten Populationen kann primär auf den steigenden Anteil an Luciferase-produzierenden Zellen zurückgeführt werden.<sup>120</sup>

Allerdings ist aus anderen Verfahren wie z.B. dem Hefe-Display bekannt, dass bei einer Koinkubation mit einem Kompetitor Zellen mit einer höheren Markerdichte bevorzugt an Beads gebunden werden und die Bindungswahrscheinlichkeit einer Zelle mit steigender Oberflächenkonzentration des präsentierten Proteins steigt.<sup>126</sup> Bei dieser Anwendung werden allerdings keine hochproduzierenden

Produktionszellen selektiert. Außerdem wäre es bei einer Übertragung dieser Methode auf die Selektion von Produktionszellen ein Nachteil, dass die Selektion zum Zeitpunkt der Inkubation stattfindet. Dadurch besteht die Gefahr, dass zu wenig oder keine Zellen gebunden werden, wenn die Konzentration des Kompetitors zu hoch ist.

Einige der oben beschriebenen Nachteile wurden durch die von Matheson et al. publizierte Methode der antikörperfreien magnetischen Zellselektion umgangen. Die Autoren nutzten als Markerprotein ein an der Zelloberfläche präsentiertes LNGFR-Protein, das mit einem Streptavidin-bindenden Peptid (SBP) fusioniert war. Dadurch können die Zielzellen an magnetische Beads gebunden werden, die mit Streptavidin funktionalisiert sind. Durch Zugabe von Biotin wird die Verbindung zwischen Streptavidin und SBP und somit zwischen Bead und Zelle wieder gelöst. Bei dieser Methode verbleiben keine Antikörper und auch keine Beads an der Zielzelle. Allerdings prüften die Autoren nicht, ob hochproduzierende Zellen isoliert werden konnten, oder ob durch die Methode eine stabile Population gewonnen werden kann. Ein beschriebenes Experiment mit HEK293T-Zellen diente lediglich zum Nachweis, dass der Oberflächenmarker exprimiert wurde und eine Selektion mittels SBP an Streptavidin möglich war. Es konnten sowohl für die Selektion von HEK293T-Zellen als auch für die Selektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine hohe Reinheit von bis zu 99 % erzielt werden.<sup>122</sup>

Han et al. modifizierten Zellen ebenfalls mit einem trunkierten LNGFR-Protein, das zudem noch mit einem Myc-tag und einem BirA-tag fusioniert war. Der BirA-tag kann durch die Biorin-Ligase BirA biotinyliert werden. HEK293T-Zellen wurden neben dem Vektor mit dem LNGFR-Gen mit einem weiteren Vektor, der ein BirA-Gen enthält, mittels Lentiviren transduziert. Dadurch wurde der LNGFR biotinyliert und die Zellen konnten mit ferromagnetischen Streptavidin-Beads selektiert werden. Allerdings beschreiben auch Han et al. nicht, ob die Methode zur Selektion von hochproduzierenden Zellen verwendet werden kann. Die publizierten Daten der FACS-Analyse lassen zwar vermuten, dass die isolierte Zellpopulation eine höhere Markergenexpression aufweist als markerpräsentierende Zellen vor der Selektion, doch wird dies nicht genauer beschrieben. Ferner wurde die Expression des ebenfalls auf dem LNGFR-Vektor liegenden GFP nicht gemessen, so dass es keine Aussage

zu einer erhöhten Expression des vermeintlichen GOI in der selektierten Population gibt. Den Autoren gelang es aber HCT-15 Zellen zu selektieren, die nach 20 Tagen noch eine stabile GFP-Expression aufwiesen. Es muss beachtet werden, dass die Zellen mit Lentiviren transduziert wurden.<sup>121</sup> Ein lentiviral vermittelter Transfer von DNA führt im Gegensatz zu anderen Transfektionsmethoden (PEI, Elektroporation, etc.) in der Regel zu einem hohen Anteil von stabilen Zellen, so dass die Herstellung einer stabilen Zelllinie auf diesem Weg weniger schwierig ist.<sup>107</sup>

Droz et al. beschreiben ein Selektionsverfahren, das auf magnetischen Beads basiert und mit dem die Autoren CHO-Zellen selektieren konnten, die rekombinante Antikörper in hohem Maße sekretieren, doch ist bei dieser Methode ein Antikörper gegen das rekombinante Protein erforderlich, sowie ein Gerät für die Selektion.<sup>127</sup>

## 2.5 Streptamer® bzw. TACS® basierte Zellselektion

Die Selektion von spezifischen Zellpopulationen aus einer Probe stellt eine häufige und komplexe Aufgabenstellung in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie dar. In der Produktion von rekombinanten Proteinen werden genetisch veränderte Zellen isoliert, die für die Proteinproduktion vorteilhafte Eigenschaften besitzen (vgl. 2.4.3). Zellen einer definierten Population aus verschiedenen Ausgangsproben wie z.B. Vollblut werden für medizinische Anwendungen isoliert, um beispielsweise diagnostische Verfahren durchzuführen oder Zellen für die Grundlagenforschung zu gewinnen. Des Weiteren ist die Selektion von Zellen in der Zelltherapie wichtig. Dazu werden unter anderem Stammzellen oder T-Zellen isoliert.<sup>125,128</sup>

In Kapitel 2.4.3.4 wurde die Verwendung von magnetischen Beads für die Selektion von Zellen beschrieben. Eine besondere Form dieser Selektion stellt die *Tracelless Affinity Cell Selection* (TACS®) dar, die von der IBA entwickelt wurde und vertrieben wird. Diese Methode basiert auf dem ebenfalls von der IBA entwickelten Strep-tag®/Strep-Tactin® System. Strep-Tactin® ist eine mutierte Variante des Streptavidins und hat im Vergleich zu Streptavidin eine erhöhte Affinität zu dem aus acht Aminosäuren bestehenden Strep-tag®II-Peptid. Der Strep-tag®II bindet an die Biotinbindungsstelle des Strep-Tactins®. Ursprünglich wurde das Strep-tag®/Strep-Tactin®-System zur Reinigung von rekombinanten Proteinen entwickelt. Durch die Fusion zweier Strep-tag®II-Peptide mittels eines Linkers entsteht ein Twin-Strep-tag®



(TST). Aufgrund des Aviditätseffekts kann die Affinität zum Strep-Tactin® im Vergleich zum Strep-tag®II vom mikromolaren in den nanomolaren Bereich erhöht werden.<sup>129</sup>

Die TACS®-Technologie wurde entwickelt, um Antigen- bzw. Rezeptor-spezifisch Zellen zu isolieren und basiert auf dem Prinzip der Streptamer®-Technologie, die eine reversible Färbung und somit auch Selektion von Zellen erlaubt.<sup>130</sup> Anders als etablierte Verfahren, bei denen Zellen einer bestimmten Population mittels Antikörper irreversibel an eine Matrix (z.B. ferromagnetische Mikropartikel) gebunden und anschließend isoliert werden, erlaubt der Einsatz niederaffiner, mit einem Twin-Strep-tag® fusionierter Fab-Fragmente oder MHC-Komplexe eine reversible Bindung der Zellen an eine Matrix. Dazu werden z.B. die Fab-Fragmente über einen Twin-Strep-tag® an eine mit Strep-Tactin® gekoppelte Oberfläche (z.B. Agarose-Beads oder Magnet-Beads) gebunden.<sup>131</sup> Um die Effizienz der Bindung zu erhöhen, können Strep-Tactin®-Tetramere multimerisiert werden.<sup>132</sup> Heute findet die Technologie Einsatz in der Forschung und Entwicklung sowie in therapeutischen Anwendungen.<sup>119,133-135</sup> Liu et al. entwickelten zudem ein Verfahren, bei dem ein Strep-tag®II mit einem Transmembranprotein fusioniert wird, um so über eine Strep-Tactin®-TACS®-Agarose CAR-T-Zellen zu selektieren.<sup>125</sup>

Zur Isolierung von Zellen, z.B. aus einer Blutprobe, wird zunächst eine Strep-Tactin®-Matrix (Agarose oder ferromagnetische Beads) mit dem Twin-Strep-tag® fusionierten Fab-Fragment oder MHC-Komplex beladen (im weiteren Text wird nur noch das Fab-Fragment erwähnt, impliziert aber auch einen MHC-Komplex). Das Fab-Fragment wird über den Twin-Strep-tag® an der Strep-Tactin®-Matrix immobilisiert. Anschließend wird die Probe zu der Matrix gegeben. Zellen, die ein Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, gegen welches das Fab-Fragment gerichtet ist, werden mittels des Fab-Fragments an die Matrix gebunden. Aufgrund des Aviditätseffekts mehrerer Fab-Antigen-Bindungen können die Zellen mit ausreichender Stringenz an der Matrix gebunden werden; alle übrigen Zellen werden anschließend durch Waschschriffe entfernt. Wird nun biotinhaltiger Puffer zu der Matrix gegeben, besetzt das Biotin die Strep-tag®-Bindungsstelle des Strep-Tactins® und das Fab-Fragment mitsamt der gebundenen Zelle wird eluiert. Aufgrund spontaner

Dissoziation löst sich nachfolgend auch die Verbindung zwischen Fab-Fragment und Zelle, so dass die isolierte Zelle ohne gebundene Isolierungsreagenzien vorliegt.<sup>131,132</sup>

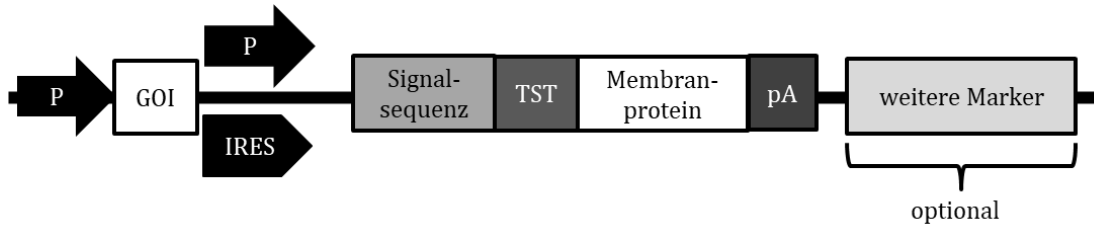
Für das Prinzip der TACS®-Technologie sind zwei Bindungen ausschlaggebend. Die Erste ist die Interaktion von Twin-Strep-tag® und Strep-Tactin®, die für die Reversible Bindung eines Proteins an die Matrix verantwortlich ist. Die Zweite besteht in der Wechselwirkung des auf der Oberfläche der Zielzellen präsentierten Proteins mit dem einem an der Strep-Tactin®-Matrix immobilisierten rekombinanten Protein. Es ist naheliegend, dieses Konzept nicht nur auf die Isolierung von Zellen aus Blut zu reduzieren; theoretisch kann jede Zelle aus einem Zellgemisch isoliert werden, sofern eine spezifische Wechselwirkung zweier Proteine genutzt werden kann.

### **3. Funktionsprinzip der neu entwickelten Strep-Tactin® assistierten Zelleselektion (STACS)**

Die Selektion von hochproduzierenden, stabilen Zellen aus einer heterogenen Zellpopulation stellt eine komplexe Aufgabenstellung in der Biotechnologie und der Produktion rekombinanter Proteine dar. Es existieren zahlreiche Methoden, um Zellen zu selektieren und eine stabile Produktionszelllinie zu erzeugen, von denen einige im Kapitel 2.4.3 beschrieben werden. Alle diese Methoden haben verschiedene Vor- und Nachteile und so muss je nach Zieldefinition eines Projektes und den wissenschaftlichen, ökonomischen, zeitlichen und behördlichen Rahmenbedingungen entschieden werden, welche Methoden eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode nutzt den Vorteil der reversiblen Bindung von TST-Fusionsproteinen an Strep-Tactin®, der bereits bei der im vorherigen Kapitel beschriebenen Streptamer®-Technologie bzw. TACS®-Technologie zum Tragen kommt. Die Methode wird entwickelt, um hochproduzierende stabile Zellen zu isolieren. Die Expression eines rekombinanten Proteins soll somit in der selektierten Zellpopulation deutlich höher sein als in der Ausgangspopulation. Außerdem soll der Einsatz der Methode den Anteil der Zellen, die das rekombinante Zielprotein exprimieren, signifikant erhöhen. Idealerweise wird der selektionsbedingte Stress durch den Einsatz der Methode auf die selektierten Zellen so gering wie möglich gehalten. Des Weiteren soll die Methode leicht und robust durchführbar sein sowie innerhalb einer möglichst kurzen Zeit zu hochproduzierenden, stabilen Zellen führen.

Zunächst werden die Zellen mit einem Vektor transfiziert, der unter anderem das GOI sowie eine Markergen-kassette enthält (Abbildung 1). Die Markergen-kassette enthält entweder ein Transmembranprotein, Domänen eines Transmembranproteins oder lediglich die Transmembrandomäne selbst. Das Transmembranprotein ist mit einem Twin-Strep-tag® (TST) fusioniert, der an dem extrazellulären Terminus des Transmembranproteins platziert wird. Falls nötig kann die

Markergenkassette noch weitere Elemente wie ein Antibiotikaresistenzgen oder einen Fluoreszenzmarker wie GFP enthalten. Transfizierte Zellen exprimieren das GOI und das Markerprotein und präsentieren folglich einen Twin-Strep-tag® auf der Zelloberfläche.

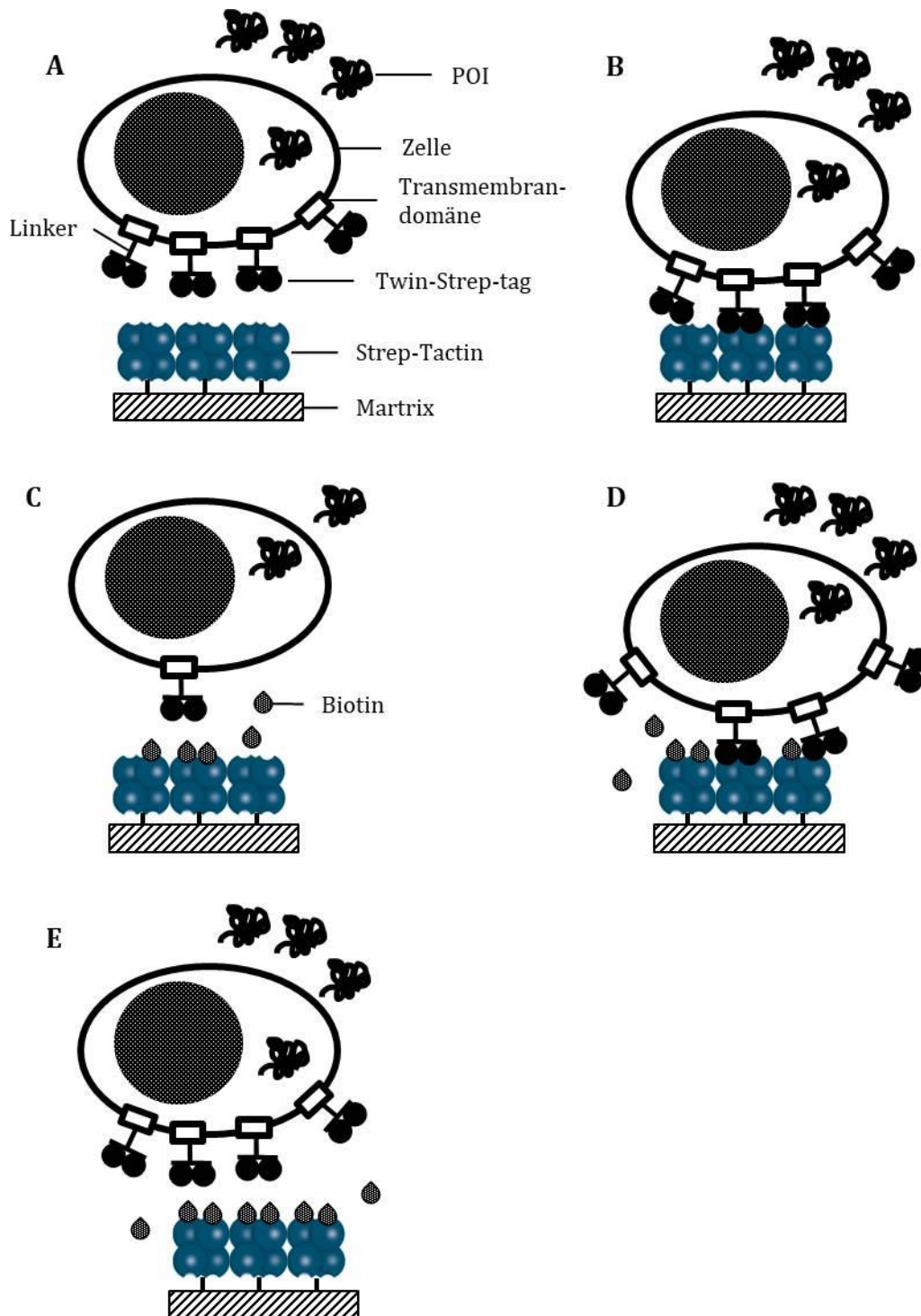


**Abbildung 1:** Darstellung der verschiedenen Elemente eines Modellvektors, der bei der entwickelten Methode eingesetzt wird. Die Expression des POI wird durch ein GOI kodiert, dessen Expression von einem Promotor (P) kontrolliert wird. Ein zweiter Promotor (P) oder eine IRES kontrolliert die Expression der Markergenkassette. Diese besteht aus einem Sekretionssignal (Signalsequenz) und einem Twin-Strep-tag® (TST), der mit dem extrazellulären Terminus eines Membranproteins oder einer Transmembrandomäne (Membranprotein) fusioniert ist. Optional können weitere Gene wie z.B. ein GFP-Gen oder ein Antibiotikaresistenzgen in der Markergenkassette (weitere Marker) enthalten sein.

Nach der Transfektion werden die Zellen mit einer festen Matrix inkubiert, an die Strep-Tactin® gekoppelt ist (Abbildung 2A). Bei der Matrix kann es sich um ferromagnetische Beads handeln, aber auch andere Matrices wie z.B. Agarose-Beads sind denkbar. Während der Inkubation werden die Zielzellen, die das TST-Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche präsentieren, über die Bindung des TST mit Strep-Tactin® an die magnetischen Beads gebunden (Abbildung 2B). Anschließend können die Zell-Bead-Komplexe durch einen Magneten an der Gefäßwand des Gefäßes immobilisiert werden. Zellen, die das POI und somit auch das TST-Oberflächenprotein nicht exprimieren, verbleiben in der flüssigen Phase und können einfach aus dem Ansatz entfernt werden. Sukzessive Wiederholungen dieses Waschschrilles führen zu einer vollständigen Entfernung nicht produzierender Zellen. Nach der Entfernung nicht produzierender Zellen können die an den Magnet-Beads verbleibenden produzierenden Zellen von den Beads eluiert werden. Mittels Biotin im Elutionspuffer werden Strep-tag®-Bindungsstellen des Strep-Tactins® blockiert, sobald ein Strep-tag® vom Strep-Tactin® dissoziiert (Abbildung 2C-E). Dadurch kommt es zu einer vollständigen Dissoziation der gebundenen Zellen von den Beads. Zellen, die das POI

nur in geringem Maße produzieren, weisen eine geringere Markerproteinexpression und somit eine geringere TST-Konzentration auf ihrer Oberfläche auf. Dagegen besitzen Zellen mit einer hohen Expressionsrate des POI eine höhere Konzentration des Markerproteins. Deshalb dissoziieren gering produzierende Zellen früher als hochproduzierende Zellen (Abbildung 2C). Bei Letzteren werden zwar bei einer gegebenen Biotinkonzentration ebenfalls Strep-tag®/Strep-Tactin®-Bindungen gelöst, dennoch bleiben ausreichend Bindungen bestehen, um hochproduzierende Zellen weiter an Beads zu binden (Abbildung 2D). Aufgrund dieser Dynamik sollen sich in der ersten Elutionsfraktion vor allem Zellen mit einer geringen Expression des POI und des Markerproteins befinden. Durch konsekutive Elutionsschritte werden die Zellen mit einer höheren POI Expression eluiert (Abbildung 2E), wobei die mittlere Expression des POI in der eluierten Fraktion mit zunehmender Elutionsfraktion steigt. Auf diese Weise können mittels einer einfachen Fraktionierung hochproduzierende Zellen gewonnen werden.

Wird die oben beschriebene Selektion während einer transienten Expressionsphase durchgeführt, so bilden die gewonnenen Zellen noch keine stabil exprimierende Kultur. Allerdings ist es möglich, durch konsekutive Anwendung der Methode über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen, stabile Zellen zu selektieren. Während die transient exprimierenden Zellen die Expression des POI und des Markerproteins nach wenigen Tagen einstellen, bleibt die Expression in stabilen Zellen erhalten. Bei jeder Anwendung der Methode werden die nicht mehr produzierenden Zellen entfernt, bis nach einigen Tagen ausschließlich produzierende und somit stabile Zellen in der Kultur verbleiben (s. Kapitel 5.4). Alternativ kann zunächst eine stabil exprimierende Kultur mittels einer der klassischen Selektionsmethoden etabliert werden (vgl. Kapitel 2.4.3). In diesem Fall kann die in dieser Arbeit entwickelte Methode genutzt werden, um hochproduzierende Zellen aus der stabilen Kultur zu isolieren.



**Abbildung 2:** Darstellung des Funktionsprinzips der entwickelten Methode. Im ersten Schritt wird eine Zellprobe mit einer Strep-Tactin® funktionalisierten Matrix (z.B. einem ferromagnetischen Bead) inkubiert. Zielzellen in der Probe sekretieren ein POI und tragen ein Markerprotein auf ihrer Oberfläche. Das Markerprotein besteht aus der Transmembrandomäne sowie dem extrazellulären Proteinbestandteil, der mit einem TST fusioniert ist. Alternativ kann nur eine Transmembrandomäne mittels eines Linkers mit einem TST fusioniert sein (A). Während der Inkubation werden Zielzellen mittels des präsentierten TST an das Strep-Tactin® der Matrix

(Fortsetzung Abbildung 2) und somit an die Matrix selbst gebunden (B). Nichtproduzierende Zellen werden durch konsekutive Waschschriffe entfernt. Anschließend werden die Zell-Bead-Komplexe mit einem biotinhaltigen Puffer inkubiert. Dissoziiert ein TST vom Strep-Tactin®, wird die Bindungsstelle durch Biotin blockiert. Die Biotinkonzentration ist ausreichend, um geringproduzierende Zellen von der Matrix zu dissoziieren, so dass sie aus der flüssigen Phase entfernt werden können (C). Hochproduzierende Zellen bleiben dagegen aufgrund ihrer höheren Anzahl an TST-Strep-Tactin®-Bindungen weiterhin an die Matrix gebunden (D). Weitere Elutionsschritte mit Biotin führen zu einer Dissoziation der hochproduzierenden Zellen von der Matrix (E). Mit steigender Elutionsfraktion werden somit Populationen mit höherer Produktivität selektiert.

## 4. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien, Materialien und Methoden beschrieben. Ausgenommen ist die Beschreibung der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Zellselektion, die im Ergebnis- und Diskussionsteil erläutert wird und außerdem im Anhang in Kapitel 7.1 zusammengefasst ist.

### 4.1 Verwendete Materialien und Reagenzien

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und Reagenzien aufgeführt.

**Tabelle 1:** Geräte und Instrumente sowie Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer bzw. Version</b>
Bio-Layer-Interferometrie	BLItz®	Sartorius AG	n. a.
BLItz®-Software	BLItz® Pro	Sartorius AG	Version 1.2.1.5
Durchflusszytometer	Accuri™ C6 flow cytometer	Becton, Dickinson and Company	n. a.
Durchflusszytometer-Software	Accuri™ C6 Software	Becton, Dickinson and Company	Version 1.0.264.21
Durchflusszytometer	CytoFLEX	Beckman Coulter, Inc.	A00-1-1102
Durchflusszytometer-Software	CytExpert	Beckman Coulter, Inc.	Version 2.4.0.28
Inkubator	BB6620	Thermo Fisher Scientific, Inc.	n. a.
Inkubator	HEARcell 240	Thermo Fisher Scientific, Inc.	51019557
Inkubator	Multitron Cell	Infors AG	n. a.
Laborschüttler Zellkultur	Celltron	Infors AG	n. a.
Laborschüttler Zellkultur	KS 260 B	IKA-Werke GmbH & CO. KG	06.023349
Magnet	Magnetic Separator	IBA Lifesciences GmbH	2-1602-000
Magnet	StrepMan	IBA Lifesciences GmbH	6-5650-065



<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer bzw. Version</b>
Mikroskop	090-131.002	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH	520803, 145767
Photometer	NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific, Inc.	ND-2000
Photometer-Software	NanoDrop™ 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Version 1.6.198
Reinstwasseranlage	Arium pro DI	Sartorius AG	n. a.
Rollmischer	RM 5	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH	348
Statistiksoftware	GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc.	Version 7.02
Statistiksoftware	R	The R Foundation for Statistical Computing	Version 3.6.0
Statistiksoftware	R Paket RcmdrPlugin.DoE	n. a.	Version 2.5-3
Tabellenkalkulationssoftware	Excel 365	Microsoft	2109 Build 16.0.14430.20154
Thermoblock	Trio Thermoblock	Biometra GmbH	n. a.
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf AG	5424000010
Vortexmischer	G-560E	Scientific Industries, Inc.	n. a.
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Inc.	75003060

**Tabelle 2:** Reagenzien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Affinitäts-Chromatographiesäule	Strep-Tactin®XT Superflow® column	IBA Lifesciences GmbH	2-4011-005
Agarose-Beads	CellThru™ Agarose-Beads (200-300 µm)	Sterogene Bioseparations, Inc.	Kundenanfertigung
Amine-Kopplungs-kit	Amine Reactive 2nd Generation (AR2G) Reagent Kit	Sartorius AG	18-5095
Antibiotikum	Ampicillin	Carl Roth GmbH Co. KG	K029

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Antibiotikum	Puromycin	Carl Roth GmbH Co. KG	0240
ATP	ATP-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Inc.	R0441
Biotinlösung	100 mM D-biotin stock solution	IBA Lifesciences GmbH	6-6325-001
BLI-Sensoren	Amine Reactive (AR2G) sensors	Sartorius AG	18-5092
Bromphenolblau	Bromphenolblau	Amresco	0449-256
CHO-Zellen	FreeStyle™ CHO-S Cells	Thermo Fisher Scientific, Inc.	R80007
CHO-Kulturme- dium	CHO-TF	Xell AG	886-0001
Coomassie Brilliant Blue	Brillant Blau R 250	Carl Roth GmbH Co. KG	3862
DTT	DL-Dithiothreit	Merck KGaA	D0632
EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH Co. KG	8043
Elutionspuffer (Proteinreinigung)	10x Buffer BXT	IBA Lifesciences GmbH	2-1042-025
Essigsäure	Essigsäure	Carl Roth GmbH Co. KG	7332
Ethanol	Ethanol	Carl Roth GmbH Co. KG	9065.4
Gelelektropho- resegel	Gelelektrophore- sekassette Tris- Glycin-Gel 14 %	Anamed Elektro- phorese GmbH	TG14110
Glutaminersatz	GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Inc.	35050038
Glycerin	Glycerin 99,8 %	Carl Roth GmbH Co. KG	3783
Glycin	Glycin	Carl Roth GmbH Co. KG	3908
HEK293-Zellen	MEXi-293E	IBA Lifesciences GmbH	2-6001-001
HEK293 Kultur- medium	MEXi-CM Medium	IBA Lifesciences GmbH	2-6010-010
HEK293 Trans- fektionsmedium	MEXi-TM Medium	IBA Lifesciences GmbH	2-6011-010
Isopropanol	Isopropanol	Carl Roth GmbH Co. KG	9866
Kompetente <i>E. coli</i>	Competent <i>E. coli</i> TOP10	IBA Lifesciences GmbH	5-1600-020

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Ligase	T4DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Inc.	EL0016
Magnetische Beads zur Proteinreinigung	MagStrep "type3" XT beads	IBA Lifesciences GmbH	2-4090-002
Magnetische Beads zur Zellselektion	Strep-Tactin® Magnetic Microbeads	IBA Lifesciences GmbH	6-5510-050
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH Co. KG	4227
Multimeres StrepTactin®	Multimeres StrepTactin® m2	IBA Lifesciences GmbH	Auf Anfrage erhältlich
Natriumdodecylsulfat	SDS ultra pure	Carl Roth GmbH Co. KG	2326
Nitrozellulosemembran	Whatman Non-Sterile Cellulose Nitrate, 8 µM	Cytiva	10400106
Nukleotide	dNTP Set	Thermo Fisher Scientific, Inc.	R0181
PCR-Reinigungskit	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH	28104
Plasmid-Präparation	Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH	12123
Plasmid-Präparation	Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH	12143
Phosphat gepufferte Salzlösung	PBS	Capricorn Scientific GmbH	PBS-1A
Polymerase	PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent	600670
Proteinmarker	PageRuler™	Thermo Fisher Scientific, Inc.	26614
Proteinmarker	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc.	26619
Restriktionsenzym	EspI	Thermo Fisher Scientific, Inc.	ER0451
Restriktionsenzym	HindIII	Thermo Fisher Scientific, Inc.	ER0501
Restriktionsenzym	XbaI	Thermo Fisher Scientific, Inc.	ER0681
Salzsäure	Salzsäure 25 % reinst	Carl Roth GmbH Co. KG	X897.2
Strep-Tactin®XT	Strep-Tactin®XT lyophilisiert	IBA Lifesciences GmbH	2-4202-001

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Transfektionsreagenz	25 kDa lineares Polyethylenimin	Polysciences Inc.	
Tris	Tris	Carl Roth GmbH Co. KG	4855
Waschpuffer (Proteinreinigung)	10x Buffer W	IBA Lifesciences GmbH	2-1003-100
Zell-Dissoziationspuffer	Cell Dissociation Buffer, enzyme-free	Thermo Fisher Scientific, Inc.	13151014
Zellselektionspuffer	10x Buffer IS	IBA Lifesciences GmbH	6-5602-500

**Tabelle 3:** Verbrauchsmaterial

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Membran	AirPore Tape Sheets	Qiagen GmbH	19571
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Mikro-Schraub- röhre, 0,5 ml, steril	SARSTEDT AG & Co. KG	72.730.005
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Mikro-Schraub- röhre, 1,5 ml, steril	SARSTEDT AG & Co. KG	72.692.005
Reaktionsgefäße (2 ml)	Mikro-Schraub- röhre, 2 ml, steril	SARSTEDT AG & Co. KG	72.694.005
Röhre für FACS-Messungen	Röhre, 5 ml, 75 x 12 mm, PP	SARSTEDT AG & Co. KG	55.526
Schraubröhre	Schraubröhre, 15 ml	SARSTEDT AG & Co. KG	62.554.502
Schraubröhre	Schraubröhre, 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG	62.547.254
Schraubröhre für Zellkultivierung	TubeSpin® Bioreaktor 50	TPP	87050
Zellkulturflasche	Enghalsflasche GL 45, 250 ml	Carl Roth GmbH Co. KG	PY01.1

## 4.2 Herstellung von Plasmiden

### 4.2.1 Herstellung der Vektoren pZSG4-IBA102-SEAP und pZSG5-IBA102-SEAP

Die in dieser Arbeit verwendeten pZSG4-IBA102- und pZSG5-IBA102-Vektoren wurden im Rahmen dieser Arbeit sowie eines KMU-Projektes (FKZ: 031A522A) in

Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Gossen des Berlin-Brandenburger Zentrums für Regenerative Therapien designt. Sie sind das Produkt aus der Entwicklung verschiedener Vektorvarianten und deren Zwischenstufen, welche im Zuge dieser Kooperation entwickelt und kloniert wurden. Nähere Informationen dazu finden sich im Kapitel 4.2.2. Außerdem finden sich im Anhang die Plasmidkarten (Kapitel 7.3) sowie die Sequenzen der auf dem Plasmid enthaltenen relevanten Elemente (Kapitel 7.4).

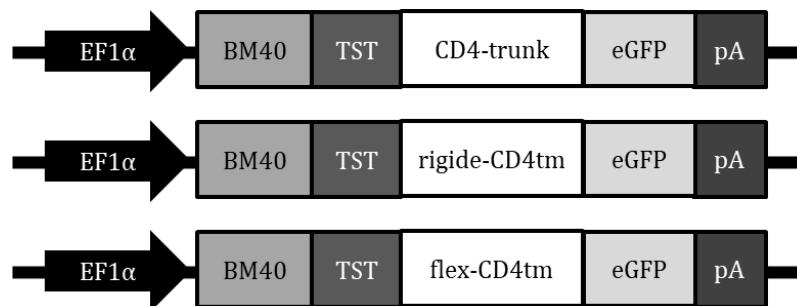
Für die Experimente in dieser Arbeit wurde sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) als Zielprotein in die Vektoren integriert. Die Klonierung des SEAP-Gens in die pZSG-IBA102-Vektoren erfolgte entsprechend des *Stargate Direct Transfer Cloning*-Protokolls.<sup>136</sup> Dieses wird im Folgenden kurz zusammengefasst. Das verwendete SEAP-Gen wurde aus einer in der Vergangenheit bei der IBA durchgeführten Gensynthese (GS223.1) mittels PCR amplifiziert. Die Aminosäuresequenz ist für die Mammalia-Expression Codon-optimiert. AGC GCG TCT CCA ATG ATC ATC CCA GTT GAG GAG GAG A wird als *Forward*-Primer und AGC GCG TCT CCT CCC CCC AGG AT als *Reverse*-Primer verwendet. Durch die Primer wird zudem an beiden Enden des Gens eine *EspI*-Schnittstelle angefügt. Die Primer wurden von der IBA bereit gestellt. Für die Reinigung des PCR-Fragments wurde ein *QIAquick PCR Purification Kit* entsprechend den Herstellerangaben verwendet.<sup>137</sup>

Das amplifizierte SEAP-Gen wurde anschließend mittels des *Esp3I*-Restriktionsenzym in den pZSG4-IBA102- bzw. den pZSG5-IBA102-Vektor kloniert, die im Rahmen dieses Projektes in der IBA konzipiert wurden. Anschließend wurde das Plasmid in kompetenten Top10 *E. coli* amplifiziert. Nach der Transformation der Bakterien wurden weiße Kolonien von der inkubierten Ampicillin-Agarplatte isoliert. Die Kolonien wurden in LB-Medium (modifiziert) mit Antibiotika (1:1000) in Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Die pZSG-IBA102-SEAP-Plasmide wurden mittels *Qiagen Plasmid Kits* entsprechend der Herstellerangaben präpariert und gereinigt.<sup>138</sup> Die gereinigten Plasmide wurden in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) gelagert. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurden mit einem NanoDrop™ 2000 überprüft. Außerdem wurde mittels der Restriktionsenzyme *XbaI* und *HindIII* die korrekte Größe des Inserts verifiziert. Des Weiteren wurde mit den Primern TCA AGC CTC AGA CAG TGG TTC (*Forward*-Primer) und GAA ATT TGT

GAT GCT ATT GC (*Reverse-Primer*) bei der Microsynth Seqlab GmbH die Sequenz der integrierten SEAP überprüft.

#### 4.2.2 Weitere in dieser Arbeit verwendeter Vektoren

Neben den während dieser Arbeit in der IBA hergestellten Vektoren, wurden weitere Plasmide von der Arbeitsgruppe Dr. Gossen des Berlin-Brandenburger Zentrums für Regenerative Therapien her- und bereitgestellt. Dies geschah im Zuge eines gemeinsamen KMU-Projektes (FKZ: 031A522A Titel: Neues Verfahren zur effektiven Etablierung hoch-effizienter, spezialisierter Produktionszelllinien). Die Arbeitsgruppe Dr. Gossen erweiterte die in dieser Arbeit entwickelte Markergen-kassette (CD4-Rezeptor mit fusioniertem TST), indem ein eGFP mit dem C-Terminus des CD4-Markergens fusioniert wurde. Des Weiteren entwickelte die Gruppe ein verkürztes CD4-Markergen, welches aus der CD4-Transmembranregion (Aminosäuren 393-427) besteht und eine flexible oder eine rigide Linkersequenz beinhaltet. Die entsprechenden Expressionskassetten sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3:** Darstellung der Expressionskassette der von der Arbeitsgruppe Dr. Gossen bereitgestellten Plasmide. Ein EF1 $\alpha$ -Promotor (EF1 $\alpha$ ) kontrolliert die Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einer BM40-Signalpeptidsequenz (BM40), Twin-Strep-tag<sup>®</sup> (TST), CD4-Transmembranprotein, eGFP und einer bGH-Poly(A)-Signalsequenz (pA). Das CD4-Transmembranprotein besteht aus der Transmembrandomäne und den extrazellulären Domänen (CD4-trunk) oder der Transmembrandomäne, die entweder über einen rigiden Linker (rigide-CD4tm) oder einen flexiblen Linker (flex-CD4tm) mit dem TST verbunden ist.

Außerdem wird in dieser Arbeit ein weiteres Plasmid von der Arbeitsgruppe Dr. Gossen verwendet, welches neben einem Gen zur Kodierung eines B18R-Proteins die Markergen-kassette um eine F2A-kodierende Sequenz sowie ein damit fusioniertes Puromycin-Resistenzgen erweitert (Abbildung 4). Die Verwendung des PGK-

Promotors basiert wiederum auf der Empfehlung des Autors dieser Arbeit auf Grundlage publizierter Arbeiten verschiedener Wissenschaftler. Außerdem wurde für die Transfektionsexperimente in dieser Arbeit das Plasmid pDSG-IBA103-GFP von der IBA verwendet.



**Abbildung 4:** Darstellung der Expressionskassette des von der Arbeitsgruppe Dr. Gossen bereitgestellten Plasmids mit einem B18R-Gen. Das Plasmid enthält eine EF1 $\alpha$ -promotorkontrollierte (EF1 $\alpha$ ) Expressionskassette, welche für ein B18R-Protein mit N-terminalen TST und BM40-Signalpeptidsequenz sowie bGH-Poly(A)-Signalsequenz kodiert (B18R). Anschließend folgt eine PGK-promotorkontrollierte (PGK) Markergen-kassette. Diese enthält ein Fusionsprotein, wie in Abbildung 3 beschrieben, welches über eine selbst spaltende F2A-Sequenz (2A) mit einer Puromycinresistenz-vermittelnden Puromycin-N-Acetyltransferase (PuroR) verbunden ist und am Ende eine SV40-Poly(A)-Signalsequenz trägt (pA).

### 4.3 Kultivierung von CHO-S und MEXi-293E Zellen

CHO-S-Zellen wurden aus einer Zellbank der IBA aufgetaut. MEXi-293E-Zellen wurden ebenfalls aus einer *working cell bank* der IBA revitalisiert. Die eingefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C für maximal 2 min aufgetaut, in 20 ml kaltes Kulturmedium überführt und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen in 20 ml 37 °C warmen Medium suspendiert. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 125 rpm in einer 250 ml Enghalsflasche im Inkubator kultiviert. Die Flaschen wurden vor der Nutzung mit GL45-Deckeln, die eine Bohrung aufwiesen und mit *AirPore Tape Sheets* verschlossen waren, zur Sterilisation autoklaviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Kulturen mit frischem Medium passagiert, wobei eine Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt wurde. Das verwendete Kulturmedium wurde mit GlutaMAX™ zu einer finalen Konzentration von 8 mM supplementiert. Bei einer Kultivierung in 50 ml TubeSpin® Bioreaktoren wurden die Kulturen mit 300 rpm auf einem KS 260 B-Schüttler geschüttelt.

### 4.4 Transfektion von CHO-S und MEXi-293E-Zellen

Die Transfektion von CHO-Zellen wird in Kapitel 5.1 beschrieben. MEXi-293E-Zellen wurden entsprechend des Herstellerprotokolls transfiziert.<sup>139</sup> Dazu wurden Zellen

zentrifugiert und in Transfektionsmedium suspendiert, welches 8 mM GlutaMAX™ enthält. Zuerst wurde DNA zu einer finalen Konzentration von 1,5 µg/ml direkt in die Kultur pipettiert. Anschließend wurde dem Ansatz 25 kDa lineares PEI aus einer 1 mg/ml konzentrierten Stammlösung zu einer finalen Konzentration von 5,5 µg/ml hinzugefügt. Nach einer schüttelnden Inkubation von 2–4 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Ansatz 1:2 mit Kulturmedium verdünnt und die Zellen für ihre weitere Verwendung kultiviert.

#### 4.5 Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Zellkonzentration und der Viabilität einer Kultur wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurde entweder ein Accuri™ C6 oder ein CytoFLEX-Durchflusszytometer mit der jeweils geräteeigenen Software verwendet. Beide Instrumente ermöglichen die Ermittlung einer Zellkonzentration ohne die Verwendung von sogenannten *counting beads*. Viable und tote Zellen wurden entsprechend ihres Signals im Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) mittels entsprechender Gitter im Streudiagramm identifiziert. Bei Messungen mit dem Accuri™ C6 wurden die Peakflächen des FSC und SSC für die Analyse verwendet (FCS-A und SSC-A). Wurde die Messung im CytoFLEX durchgeführt, wurden bei CHO-Zellen ebenfalls die Peakflächen des FSC und SSC analysiert. MEXi-293E-Zellen wurden dagegen mittels der Peakbreite des FSC-Signals (*FSC-width*) und der Fläche des SSC-Peaks analysiert, da sich viable und tote MEXi-293E-Zellpopulationen mit dieser Kombination besser separieren ließen. Der Grad der Aggregation lebender Zellen wurde außerdem in einem Streudiagramm bestimmt, in welchem die Höhe des FCS-Peaks (FSC-H) gegen das FSC-A-Signal aufgetragen war. Die Methode wurde in der Vergangenheit bei der IBA anhand von Vergleichsmessungen mittels Trypanblaufärbung und Auszählung in einer Neubauerkammer etabliert.

Zur Identifikation von GFP-positiven Zellen wurde die Population der viablen Zellen in einem Streudiagramm dargestellt, in dem die mittlere Fluoreszenzintensität (FI) im FITC-Kanal gegen das FSC-A-Signal aufgetragen war. Alternativ wurde die mittlere FI im FITC-Kanal in einem Histogramm dargestellt. Zur Bestimmung der mittleren FI von Zellen, die als GFP-positiv bewertet wurden, wurden negative



Referenzzellen einer nicht transfizierten Kultur vermessen. Wurden Zellen analysiert, nachdem sie mittels der in dieser Arbeit entwickelten Methode isoliert wurden, so musste die Lage des Gitters der viablen Zellen angepasst werden, weil die isolierten Zellen unmittelbar nach der Selektion ein leicht erhöhtes FSC-Signal aufwiesen und außerdem noch einige *Microbeads* in der Population enthalten waren. *Microbeads* besitzen ein geringfügig niedrigeres FSC-Signal als die isolierten Zellen und können so aus der Auswertung entfernt werden.

#### 4.6 Berechnung der Zelldichte, Viabilität und spezifischen Produktivität von Zellen

Nach der Analyse der Zellen im Durchflusszytometer wurde die Dichte der viablen Zellen mittels der folgenden Formel berechnet:

$$X_{lebend\ total} = X_{lebend} + X_{Aggregate}$$

Mit:  $X_{lebend\ total}$  = Zelldichte aller viablen Zellen,  $X_{lebend}$  = Zelldichte der viablen Zellen,  $X_{Aggregate}$  = Zelldichte viabler aggregierter Zellen

Durch die Addition der aggregierten Zellen wird berücksichtigt, dass im Mittel aggregierte Zellen in den Kulturen aus je zwei Zellen bestehen. Die Gesamtzelldichte berechnete sich aus:

$$X_{gesamt} = X_{lebend\ total} + X_{tot}$$

Mit:  $X_{gesamt}$  = Gesamtzelldichte und  $X_{tot}$  = Zelldichte der toten Zellen

Ausgehend von diesen Berechnungen konnte die Viabilität in Prozent wie folgt berechnet werden:

$$Viabilität = \frac{X_{lebend\ total}}{X_{gesamt}} \times 100$$

Für die Berechnung der zellspezifischen Produktivität [pg/Zelle/Tag] wurde folgende Formel verwendet:<sup>76</sup>

$$qP = \frac{P_1 - P_0}{X_1 - X_0} \times \mu$$

Mit:  $qP$  = zellspezifische Produktivität,  $P_0$  = Produktkonzentration im Überstand zu Beginn der Kultivierung,  $P_1$  = Produktkonzentration im Überstand am Ende der Kultivierung,  $X_0$  = Zelldichte der GFP positiven Zellen zu Beginn der Kultivierung,

$X_1$  = Zelldichte der GFP positiven Zellen am Ende der Kultivierung und  $\mu$  = zellspezifische Wachstumsrate

Wobei  $\mu$  wie folgt berechnet wurde:<sup>76</sup>

$$\mu = \frac{\ln \frac{X_1}{X_0}}{t_1 - t_0}$$

Mit:  $t_0$  = Zeitpunkt des Beginns der Kultivierung und  $t_1$  = Zeitpunkt am Ende der Kultivierung

#### 4.7 Chromatografische Reinigung von Twin-Strep-tag®-Fusionsproteinen

Kulturproben wurden bei  $100 \times g$  für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Dem Überstand wurden  $5 \mu\text{l}$  BioLock-Lösung und  $100 \mu\text{l}$  *10x Buffer W* pro Milliliter hinzugefügt. Anschließend wurde der Überstand bei  $3.345 \times g$  für 20 min und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und mittels  $0,2 \text{ ml}$  Strep-Tactin®XT Superflow® *high capacity* Gravitationsssäulen entsprechend den Herstellervorgaben gereinigt.<sup>140</sup> Die Säulen wurden mit 2 Säulenvolumen (*column volume, CV*) *1x Buffer W* equilibriert. Anschließend wurde der Überstand auf die Säule geladen. Nachdem die Säulen mit  $5 \text{ CV}$  *1x Buffer W* gewaschen waren, wurde das auf der Säule gebundene TST-Fusionsprotein mit *1x Buffer BXT* eluiert.

#### 4.8 Reinigung von Twin-Strep-tag®-Fusionsproteinen mittels MagStrep "type3" XT Beads

Bei einer Reinigung von Twin-Strep-tag® Fusionsproteinen mit magnetischen *MagStrep „type3“ XT Beads* wurden  $7 \text{ ml}$  Zellsuspension je Kultur entnommen und bei  $100 \times g$  für 5 min und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurden dem Überstand  $200 \mu\text{l}$  BioLock Solution zugefügt und die Probe bei  $3.345 \times g$  für 20 min und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die Reinigung erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls<sup>141</sup>. Dazu wurden  $6 \text{ ml}$  des jeweiligen vorbereiteten Kulturüberstandes mit  $20 \mu\text{l}$  *MagStrep „type3“ XT Bead-Suspension* für 30 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Ansätze mehrmals auf einem Vortexmischer gemischt. Anschließend wurden die Ansätze in einem Magneten platziert und der Überstand von den Beads getrennt. Danach wurden die Beads dreimal mit  $100 \mu\text{l}$  *Buffer W* gewaschen, bevor zwei Elutionsschritte mit jeweils  $25 \mu\text{l}$  *1x Buffer BXT* folgten.

#### 4.9 Analyse der Proteinkonzentration in Kulturüberständen mittels Bio-Layer-Interferometrie und Strep-Tactin®XT-Biosensoren

Eine Möglichkeit die TST-Fusionsproteinkonzentration im Überstand kultivierter Zellen zu analysieren, ist die Vermessung mit einem BLitz®-System. Hierzu wurde Strep-Tactin®XT mittels *des Amine Reactive 2nd Generation (AR2G) Reagent Kit* an *Amine Reactive (AR2G)* Sensoren entsprechend den Herstellerangaben gekoppelt.<sup>142,143</sup> Sensoren wurden dazu erst 10 min in einer aktivierten EDC/NHS Lösung und anschließend in einer Lösung aus 45 µg/ml Strep-Tactin®XT, 10 mM Natriumacetat pH 5 inkubiert, gefolgt von einer 10 min Absättigung mit 1 M Ethanolamine/HCl pH 8,5. Nach einer zehnminütigen Inkubation der Sonden in Kulturüberstand ohne TST-Fusionsprotein erfolgte die Messung der zu analysierenden Kulturüberstände.

Kulturproben für die Messung wurden bei  $100 \times g$  für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Dem Überstand wurden 5 µl BioLock-Lösung und 100 µl 10x *Buffer W* pro Milliliter hinzugefügt. Anschließend wurde der Überstand bei  $3.345 \times g$  für 20 min und 4 °C zentrifugiert. Für die einminütige Messung wurde das systemeigene Programm *Quantitate Sample* der Software BLitz® Pro verwendet. Konzentrationen wurden mittels einer zuvor bei der IBA ermittelten SEAP-TST-Standardkurve und einer linearen Regression berechnet.

#### 4.10 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen in gereinigten Proben wurden photometrisch mit einem NanoDrop™ 2000 mit dem Programm *Protein A280* bestimmt. Dazu wurde zunächst der Referenzwert des Elutionspuffers gemessen (*blank*). Anschließend erfolgte die Messung der Proben in dreifacher Bestimmung. Aus den gemessenen Werten wurde der Mittelwert gebildet und mit dem molaren Extinktionskoeffizient von SEAP-TST bei 280 nm ( $58.330 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , Absorption 0.1 % (=1 g/l) = 1,035) multipliziert, um die Konzentration zu erhalten.

#### 4.11 Analyse von Proteinen im Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gel

Eine genauere Untersuchung von Proben erlaubt die Analyse mittels Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE-Gel. Hierzu wurden fertige 14 % SDS-PAGE-Gele in einer

Gelelektrophoresekammer fixiert. Auftragspuffer (250 mM Tris-HCl, pH 8, 25 % Glycerin, 8 % SDS, 0,5 mg/ml Bromphenolblau, 12,5 % 2-Mercaptoethanol) wurde im Verhältnis 1:5 mit der aufzutragenden Probe gemischt und der Ansatz für 10 min bei 90 °C auf einem Thermoblock inkubiert. Es folgte der Auftrag der Proben und des Markers sowie der eigentliche Gellauf bei 60 mA und 120 V. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris, 200 mM Glycin und 3,4 mM SDS verwendet. Anschließend wurde das Gel in eine Coomassie-Färbelösung gegeben (0,25 % Coomassie Brilliantblau R250 in 45 % v/v Isopropanol, 9 % v/v Essigsäure). Zur Entfärbung wurde das Gel in einer Lösung aus 40 % v/v Ethanol und 10 % v/v Essigsäure inkubiert. Abschließend wurde das Gel in vollentsalztem Wasser inkubiert, bis es ausreichend entfärbt war. Dabei wurde das Wasser mehrmals gewechselt.

#### 4.12 Planung und Auswertung von statistischen Versuchsplänen (DoE)

Die Erstellung und Auswertung der in dieser Arbeit verwendeten statistischen Versuchspläne wurde mit der Statistiksoftware R (Version 3.6.0) und dem Paket *RcmdrPlugin.DoE* (Version 2.5-3) durchgeführt. Tabelle 17 listet die jeweiligen Programmeinstellungen der entwickelten Versuchspläne auf. In dieser Arbeit werden vollfaktorielle Versuchspläne mit und ohne *center point* sowie sogenannte *Central Composite Designs* (CCD) verwendet. Untersuchte Faktoren sowie die jeweiligen Stufen sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben. Faktoren und Stufen können im Programm bei der Erstellung des jeweiligen Designs eingetragen werden. Versuchsergebnisse werden später entweder aus einer CSV-Datei importiert oder direkt in dem Programm als Werte von Ergebnisvariablen eingefügt. Experimente wurden mit der Funktion *Design* → *Analyze design* → *Response surface model* zur Analyse mittels der Reaktionsoberflächenmethode (RSM) ausgewertet. Da in keinem Experiment verschiedene Blöcke untersucht wurden, wurde diese Variable aus der Formel entfernt. So ergibt sich die Formel:

$$Y = FO(x_1, x_2, x_3) + TWI(x_1, x_2, x_3) + PQ(x_1, x_2, x_3)$$

Mit Y = abhängige Variable, FO = Term erster Ordnung, TWI = Zwei-Faktoren-Interaktion, PQ = quadratischer Term, x = Faktor

Faktoren, die nicht signifikant sind, wurden anschließend sukzessiv aus dem Modell entfernt und das Modell mit den verbleibenden Faktoren und Termen neu

berechnet. Das finale Modell wurde mit der Funktion *Design → Analyze design → Response surface plots* grafisch dargestellt. Wurde ein vollfaktorielles Design ausgewertet, so wurde der quadratische Term zu Beginn der Auswertung aus der Gleichung entfernt, da dieser bei diesem Design nicht berechnet werden kann. Der *center point* in einem derartigen Experiment dient nur dazu, zu ermitteln, ob ein quadratischer Faktor in der Beschreibung der Ergebnisse vorliegt, oder ob das Modell ohne einen entsprechenden Faktor verlässliche Aussagen ermöglicht. Um den quadratischen Faktor mit in das Modell aufzunehmen, sind entsprechende Sternpunkte wie im CCD-Design nötig. Bei der Analyse eines vollfaktoriellen Designs wurde außerdem in einigen Experimenten über die Funktion *Design → Analyze design → Main Effects and Interaction plots* die Auswirkung und Interaktion der Haupteffekte grafisch analysiert.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Kapiteln wird die Optimierung von Transfektionsprotokollen sowie die Entwicklung der Methode zur Selektion von stabilen hochproduzierenden Zellen (STACS) beschrieben und diskutiert. Dabei werden zunächst verschiedene Varianten von Oberflächenproteinen als mögliche Markerproteine untersucht. Außerdem werden verschiedene Matrices wie magnetische *Microbeads*, Agarose-Beads oder eine Nitrozellulosemembran zur Selektion der Zellen getestet. Anschließend wird die STACS-Methode eingesetzt, um stabile Kulturen zu selektieren und das generelle Funktionsprinzip der Methode im Vergleich zur antibiotikabasierten Selektion wird analysiert. In der nächsten Experimentreihe wird zudem die Frage bearbeitet, ob die Markergen-kassette von einer IRES oder einem zweiten Promotor kontrolliert werden sollte. Abschließend werden die STACS-Methode optimiert und Einflussfaktoren auf den Selektionserfolg untersucht.

### 5.1 Optimierung der Transfektion von CHO-S-Zellen mittels statistischer Versuchsplanung

Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen mittels stabiler eukaryotischer Zellen werden im pharmazeutischen Bereich überwiegend CHO-Zellen verwendet. Während für die in dieser Arbeit verwendeten HEK293-Zellen bereits ein optimiertes Transfektionsprotokoll zu Verfügung stand, musste für die CHO-Zellen zunächst ein geeignetes Transfektionsprotokoll entwickelt werden. In diesem Kapitel werden zwei verschiedene Transfektionsprotokolle beschrieben. Das Erste stellt eine Transfektion bei Zelldichten zwischen  $1 \times 10^6$  Zellen/ml bis  $5 \times 10^6$  Zellen/ml dar. Im zweiten Ansatz werden Zellen bei einer hohen Zelldichte zwischen  $10 \times 10^6$  Zellen/ml und  $20 \times 10^6$  Zellen/ml transfiziert.

### 5.1.1 Entwicklung eines CHO Transfektionsprotokolls für Zelldichten bis zu $5 \times 10^6$ Zellen/ml

Um die optimalen Transfektionsbedingungen zur Transfektion von CHO-Zellen bei Zelldichten zwischen  $1 \times 10^6$  Zellen/ml bis  $5 \times 10^6$  Zellen/ml zu identifizieren sowie den Einfluss der drei Faktoren PEI-, DNA- und Zellkonzentration zu ermitteln, wurde mittels statistischer Versuchsplanung ein *Central Composite Design* (CCD) generiert. Die getesteten Stufen der drei Faktoren PEI, DNA und Zelldichte sowie das Design sind in Tabelle 4 aufgeführt. Bei allen Transfektionen wurde zuerst die entsprechende DNA-Menge zu 2,5 ml Zellkultur gegeben. Zur Expression wurde das Plasmid pDSG-IBA103-GFP (Anhang, Abbildung 71) verwendet, das für ein eGFP-Protein kodiert, welches in einen pDSG-IBA103-Vektor (IBA) kloniert wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Mengen PEI. Alle Ansätze wurden zwei Stunden bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Danach wurden alle Ansätze mit 2,5 ml CHO-TF-Kulturmedium verdünnt. Die Experimente wurden in 50 ml TubeSpin® Bioreaktor-Röhren durchgeführt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Ansätze im Accuri™-Durchflusszytometer analysiert. Tabelle 4 enthält die entsprechenden Ergebnisse.

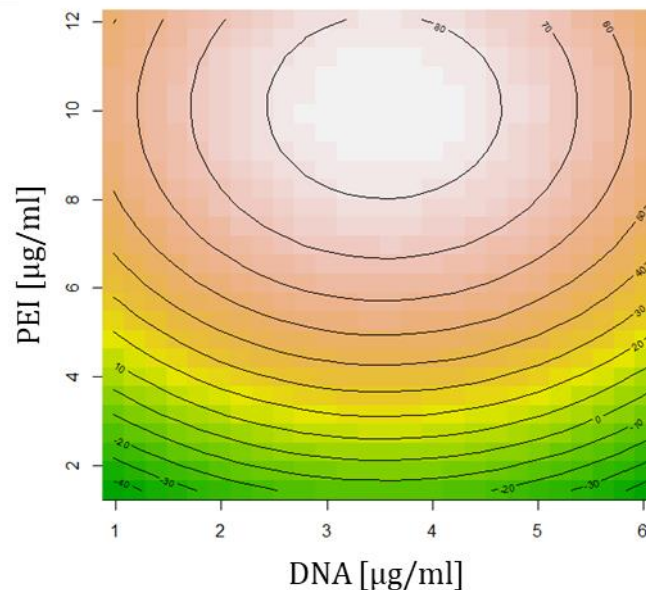
Die Daten in Tabelle 4 wurden mit der Reaktionsoberflächenmethode (*Response Surface Methodology*, RSM) analysiert. Es wurden Modelle für den Einfluss der Faktoren auf die drei Messgrößen GFP-positive Zellen, mittlere Fluoreszenzintensität und Viabilität errechnet. Da die Interaktionseffekte der drei Faktoren im RSM für den Anteil GFP-positiver Zellen nicht signifikant waren, wurden die Interaktionseffekte aus dem Modell entfernt. In dem neuen Modell sind sowohl der Haupteffekt PEI sowie die quadratischen Terme für PEI, DNA und Zelldichte signifikant. Aufgrund des hohen Bestimmtheitsmaßes ( $R^2 = 0,93$ ) und des adjustierten Bestimmtheitsmaßes ( $\bar{R}^2 = 0,88$ ) sowie eines nicht signifikanten *lack of fit* (0.103) ist das Modell geeignet, die Messwerte adäquat zu beschreiben.

**Tabelle 4:** Darstellung des verwendeten CCD. Es werden die Faktoren PEI-Konzentration (PEI), DNA-Konzentration (DNA) und Zelldichte untersucht. Die für jeden Faktor gewählten Stufen sind aufgeführt. Aus allen Ansätzen wurden zwei Tage nach der Transfektion Proben im Durchflusszytometer analysiert und der Anteil GFP-positiver Zellen (GFP+), die mittlere Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen (mittlere FI) sowie die Viabilität der Kultur (Viabilität) gemessen.

Nr.	PEI [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	DNA [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	Zelldichte [ $10^6$ Zellen/ml]	GFP+ [%]	mittlere FI	Viabilität [%]
C1.1	3,6	2,0	1,8	15	1.696.206	97
C1.2	9,9	2,0	1,8	72	3.100.185	25
C1.3	3,6	5,0	1,8	0	25.934	98
C1.4	9,9	5,0	1,8	67	2.409.421	16
C1.5	3,6	2,0	4,2	1	52.852	95
C1.6	9,9	2,0	4,2	74	2.412.748	82
C1.7	3,6	5,0	4,2	1	156.557	93
C1.8	9,9	5,0	4,2	80	3.194.653	53
C1.9	6,8	3,5	3,0	75	3.181.205	64
S2.1	1,5	3,5	3,0	0	59.383	96
S2.2	12,1	3,5	3,0	67	3.221.746	26
S2.3	6,8	1,0	3,0	35	937.385	97
S2.4	6,8	6,0	3,0	48	3.230.397	77
S2.5	6,8	3,5	1,0	47	2.840.635	29
S2.6	6,8	3,5	5,0	54	1.944.803	87
S2.7	6,8	3,5	3,0	68	3.423.741	69
S2.8	6,8	3,5	3,0	69	3.438.871	68

Abbildung 5 fasst die Ergebnisse des Modells in einer Reaktionsoberfläche zusammen. Demnach hat die PEI-Konzentration den größten Einfluss auf den Anteil GFP-positiver Zellen. Bei einer Konzentration oberhalb von 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ist die Transfektionseffizienz hoch, wobei das Optimum mit ca. 80 % positiven Zellen zwischen 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  liegt. Wird eine PEI-Konzentration unter 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gewählt, so verringert sich der Anteil GFP-positiver Zellen im Ansatz schnell. Deutlich geringer fällt der Einfluss der DNA-Konzentration aus. Bei ausreichend hoher PEI-Konzentration lassen sich hier bei DNA-Konzentrationen zwischen 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hohe Transfektionsraten erzielen. Den geringsten Einfluss auf den Anteil GFP-positiver Zellen hat im Modell die Zelldichte.

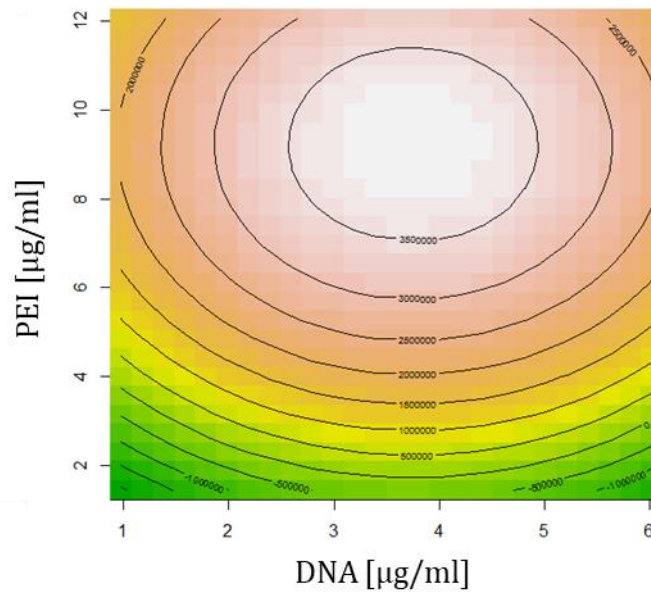




**Abbildung 5:** Response surface für die Zielgröße GFP-positiver Zellen [%] in Abhängigkeit der PEI- und DNA-Konzentration. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des RSM bei einer Zelldichte von  $3.1 \times 10^6$  Zellen/ml im Transfektionsansatz, welche die Zelldichte im Sattelpunkt (Optimum) des Modells ist.

Wird der Einfluss der drei Parameter auf die mittlere Fluoreszenzintensität als Maß der Expressionsstärke der GFP-positiven Zellen betrachtet, so ergibt sich ein ähnliches Ergebnis wie für die Messgröße der GFP-positiven Zellen (Abbildung 6). Das ursprüngliche Modell lässt sich mangels Signifikanz der Interaktionseffekte auf die Haupteffekte und die quadratischen Terme im Modell reduzieren. Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R = 0,82$ , einem adjustierten Bestimmtheitsmaß  $\bar{R}^2 = 0.71$  sowie eines signifikanten *lack of fit* (0.03) ist das Modell für die mittlere Fluoreszenzintensität weniger präzise als das Modell zur Beschreibung der GFP-positiven Zellen.

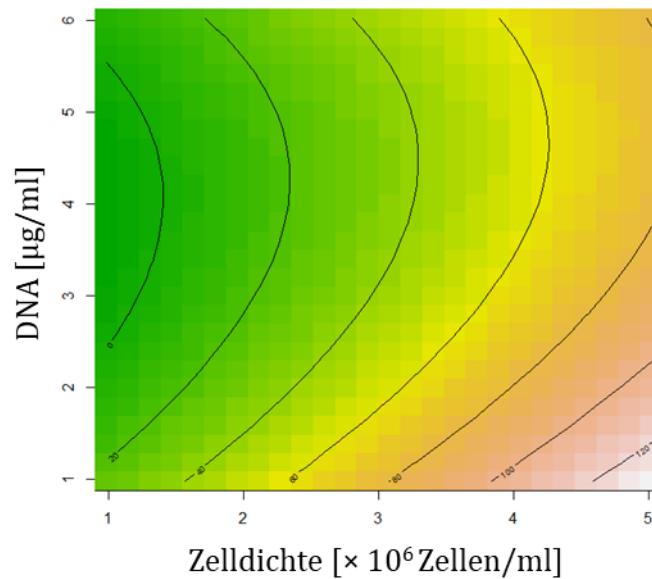
Auch für die mittlere Fluoreszenzintensität wird die höchste Transfektionseffizienz bei PEI-Konzentrationen ab  $7 \mu\text{g/ml}$  und DNA-Konzentrationen zwischen  $2 \mu\text{g/ml}$  und  $5 \mu\text{g/ml}$  erreicht, wobei die PEI-Konzentration den größeren Einfluss hat. Der Faktor Zelldichte ist nur bei einem Vertrauensniveau von 0,90 signifikant und hat damit im Modell den geringsten Einfluss auf die mittlere Fluoreszenzintensität.



**Abbildung 6:** *Response surface* für die Zielgröße mittlere Fluoreszenzintensität GFP-positiver Zellen in Abhängigkeit der PEI- und DNA-Konzentration. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des RSM bei einer Zelldichte von  $2.69 \times 10^6$  Zellen/ml im Transfektionsansatz, welche die Zelldichte im Sattelpunkt (Optimum) des Modells ist.

Im RSM zur Beschreibung der Viabilität waren die Haupteffekte der drei Faktoren sowie die Interaktion zwischen PEI und Zelldichte und der quadratische Term der DNA signifikant. Auf einem Vertrauensniveau von 0,90 ist auch die Interaktion zwischen PEI und DNA signifikant. Die quadratischen Terme für PEI und Zelldichte konnten somit aus dem Modell entfernt werden. Das resultierende Modell ist zur Beschreibung der Messwerte geeignet ( $R^2 = 0,97$ ,  $\bar{R}^2 = 0,95$  und *lack of fit* = 0,12).

PEI und Zelldichte haben in dem Modell den größten Einfluss auf die Viabilität. Weil die vorangegangenen Analysen zeigen, dass eine hohe PEI-Konzentration für eine hohe Transfektionseffizienz nötig ist, wird für die Analyse der Viabilität in Abbildung 7 eine PEI-Konzentration von 10,1 µg/ml gewählt. Bei dieser PEI-Konzentration ist ein Zelldichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml oder höher sowie eine geringe DNA-Konzentration von 1 µg/ml bis 2,5 µg/ml nötig, um zwei Tage nach der Transfektion eine akzeptable Viabilität von 70–100 % zu erzielen.



**Abbildung 7:** *Response surface* für die Zielgröße Viabilität [%] in Abhängigkeit der Zell- und DNA-Konzentration. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des RSM bei einer PEI-Konzentration von 10,1 µg/ml.

Basierend auf der Auswertung des CCD-Experiments wurden vier Transfektionsbedingungen getestet, um zum einen die Modelle aus dem CCD-Experiment zu prüfen und zum anderen, um ein finales Transfektionsprotokoll zu entwickeln. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der Versuchsbedingungen sowie die Ergebnisse der vier Experimente, zwei Tage nach der Transfektion. Bei allen Ansätzen wurden jeweils 2 ml Kultur transfiziert. Zwei Stunden nach der Transfektion wurde die Zelldichte in allen Ansätzen durch Verdünnung mit CHO-TF-Kulturmedium auf  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Zwischen den mit dem Modell prognostizierten Werten und den gemessenen Werten gibt es eine gute Übereinstimmung. Lediglich die gemessene Fluoreszenzintensität ist in allen Experimenten höher als es das Modell vorhersagt. Allerdings variieren Ergebnisse bei transienten Transfektionen und das Modell zur Vorhersage der mittleren FI weist einen signifikanten *lack of fit* auf. Dennoch stimmen die Werte zwischen den Experimenten qualitativ in ihrer mittleren FI mit den prognostizierten Werten überein. So besitzt z.B. Experiment Nr. 1 in beiden Fällen die höchste FI und Experiment Nr. 2 die niedrigste.

Es lässt sich feststellen, dass bei einer DNA-Konzentration von 2 µg/ml die Viabilität höher ausfällt, die Transfektionseffizienz jedoch reduziert ist. Zellen in Experiment Nr. 2 haben zwei Tage nach der Transfektion die höchste Viabilität (93 %), wenngleich die Transfektionseffizienz am geringsten ist (62 % GFP-positive Zellen, 2.581.000 mittlere FI). Zwar ist die Transfektionseffizienz in den Ansätzen Nr. 1. (80 % GFP-positive Zellen, 4.346.000 mittlere FI) und Nr. 3 (76 % GFP-positive Zellen, 3.967.000 mittlere FI) deutlich höher, jedoch ist die Viabilität in beiden Ansätzen mit 60 % zu gering, um in späteren Experimenten Zellen für eine stabile Expression zu selektieren. Im Ansatz Nr. 4 wird eine geringfügig höhere Transfektionseffizienz als im Ansatz Nr. 2 erreicht (69 % GFP-positive Zellen, 3.182.000 mittlere FI), doch die Viabilität ist mit 81 % bereits deutlich reduziert. Darum sind die Bedingungen in Experiment 2 (9 µg/ml PEI, 2 µg/ml DNA und  $4,7 \times 10^6$  Zellen/ml) für weitere Transfektionen zu bevorzugen.

**Tabelle 5:** Übersicht der durchgeführten Experimente zur Überprüfung der CCD-Ergebnisse. Es werden jeweils die durch das Modell vorhergesagten Ergebnisse (progn.) den im Experiment gemessenen Werten (experi.) gegenübergestellt. Aus allen Ansätzen wurden zwei Tage nach der Transfektion Proben im Durchflusszytometer analysiert und der Anteil GFP-positiver Zellen (GFP+), die mittlere Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen (mittlere FI) sowie die Viabilität der Kultur (Viabilität) gemessen.

Nr.	PEI [µg/ml]	DNA [µg/ml]	Zelldichte [10 <sup>6</sup> Zellen/ml]	progn. GFP+ [%]	experi. GFP+ [%]	progn. mittlere FI [× 1000]	experi. mittlere FI [× 1000]	progn. Viabilität [%]	experi. Viabilität [%]
1	9	4	4,0	75-80	<b>80</b>	3.000 - 3.500	<b>4.346</b>	60-70	<b>60</b>
2	9	2	4,7	55-65	<b>62</b>	2.000	<b>2.581</b>	90-100	<b>93</b>
3	10	3	4,0	75-80	<b>76</b>	3.000 - 3.500	<b>3.967</b>	60-70	<b>60</b>
4	10	2	4,0	70-80	<b>69</b>	2.500	<b>3.182</b>	75-85	<b>81</b>

5.1.2 Entwicklung eines Hochzelldichte-Transfektionsprotokolls für CHO-S-Zellen  
Als Alternative zu dem in Kapitel 5.1.1 entwickelten Transfektionsprotokoll wurde im späteren Verlauf der Arbeit eine Transfektionsmethode bei hohen Zelldichten

zwischen  $10 \times 10^6$  Zellen/ml und  $20 \times 10^6$  Zellen/ml entwickelt. Hierbei wurde ebenfalls die statistische Versuchsplanung genutzt. Es wurde ein vollfaktorielles Design mit *center point* generiert, welches die Faktoren PEI-, DNA- und Zellkonzentration enthält. Eine Übersicht der Versuchsbedingungen sowie die Ergebnisse der jeweiligen Ansätze sind in Tabelle 6 aufgelistet. Alle Transfektionen wurden in 0,5 ml Kulturen durchgeführt. Zuerst wurden die Kulturen mit dem eGFP kodierenden Plasmid pDSG-IBA103-GFP (Anhang, Abbildung 71) und einer anschließenden PEI-Zugabe direkt in der Kultur transfiziert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C und 300 rpm in einem TubeSpin® Bioreaktor wurden alle Ansätze durch Zugabe von CHO-TF-Kulturmedium auf eine Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt und weiter kultiviert. Einen Tag nach der Transfektion erfolgte die Analyse der Kulturen mit einem Accuri™-Durchflusszytometer.

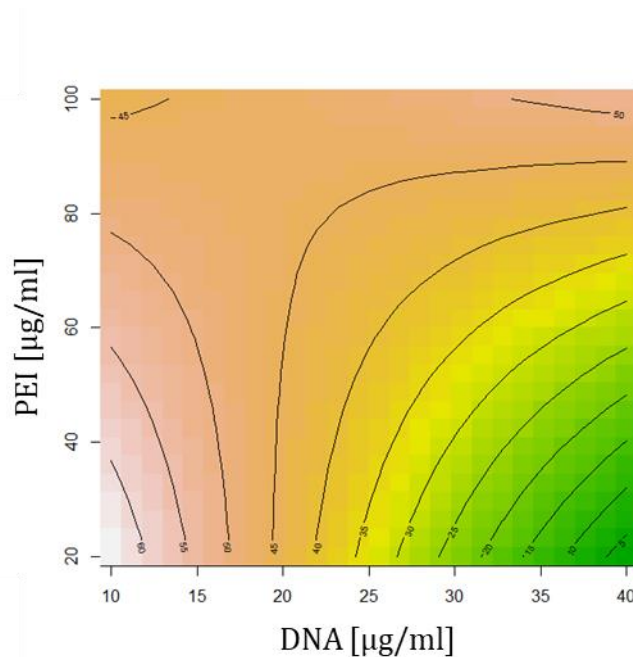
**Tabelle 6:** Darstellung des verwendeten vollfaktoriellen Designs. Es werden die Faktoren PEI-Konzentration (PEI), DNA-Konzentration (DNA) und Zelldichte untersucht. Die für jeden Faktor gewählten Stufen sind aufgeführt. Aus allen Ansätzen wurden ein Tag nach der Transfektion Proben im Durchflusszytometer analysiert und der Anteil GFP-positiver Zellen (GFP+), die mittlere Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen (FI) sowie die Viabilität der Kultur (Viabilität) gemessen.

Nr.	PEI [µg/ml]	DNA [µg/ml]	Zelldichte [ $10^6$ Zellen/ml]	GFP+ [%]	FI	Viabilität [%]
1	100	40	20	55	2.684.892	45
2	20	10	10	65	4.190.217	75
3	100	10	20	39	4.400.681	43
4	100	10	10	46	2.467.340	10
5	20	40	20	1	107.606	100
6	100	40	10	45	2.152.623	13
7	20	40	10	1	230.133	100
8	20	10	20	60	3.035.655	97
9	60	25	15	54	2.572.660	59

Die Ergebnisse in Tabelle 6 wurden mit Hilfe der RSM analysiert, wobei keine quadratischen Terme eingeschlossen wurden, da diese bei einem Zweistufendesign nicht berechnet werden können. Weil der Faktor Zelldichte keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil GFP-positiver Zellen hatte, wurde die Zelldichte aus dem Modell entfernt. Im daraus resultierenden Modell waren sowohl die beiden Haupteffekte PEI

und DNA als auch die Interaktion zwischen PEI und DNA signifikant. Mit einem  $R^2 = 0,94$  und einem  $\bar{R}^2 = 0,90$  ist das Modell geeignet, den Einfluss der Faktoren zu untersuchen. Der *lack of fit* ist zwar signifikant (0,039), allerdings liegt dies daran, dass das Ergebnis im *center point* aufgrund des Fehlens eines quadratischen Terms nicht mit dem Modell abgebildet werden kann. Insofern ist der *lack of fit* in diesem Modell zu vernachlässigen, da in diesem Experiment zunächst der Versuchsraum für eine folgende Bestimmung des Optimums eingegrenzt werden soll.

Abbildung 8 ist zu entnehmen, dass die höchste Transfektionseffizienz von mehr als 50 % GFP-positiver Zellen bei einer DNA-Konzentration von weniger als 20  $\mu\text{g/ml}$  zu erwarten ist. Der Einfluss der PEI-Konzentration auf den Anteil der GFP-positiven Zellen ist geringer als der Einfluss der DNA-Konzentration. Während bei einer DNA-Konzentration von mehr als 20  $\mu\text{g/ml}$  eine höhere PEI-Konzentration den Anteil GFP-positiver Zellen verbessert, führen PEI-Konzentrationen von weniger als 60  $\mu\text{g/ml}$  bei niedrigen DNA-Konzentrationen zu dem höchsten Anteil GFP-positiver Zellen.

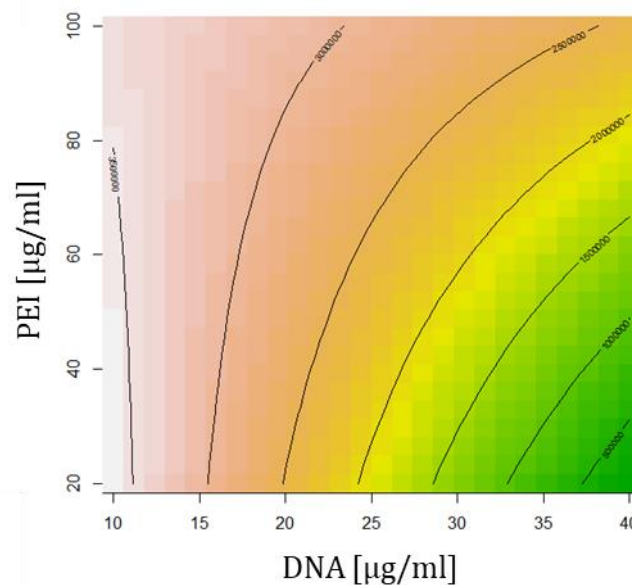


**Abbildung 8:** Response surface für die Zielgröße GFP-positiver Zellen [%] in Abhängigkeit der PEI- und DNA-Konzentration. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des RSM.

Auch bzgl. der mittleren FI kann das Modell auf die beiden Faktoren PEI und DNA reduziert werden, da die Terme mit dem Faktor Zelldichte nicht signifikant waren.

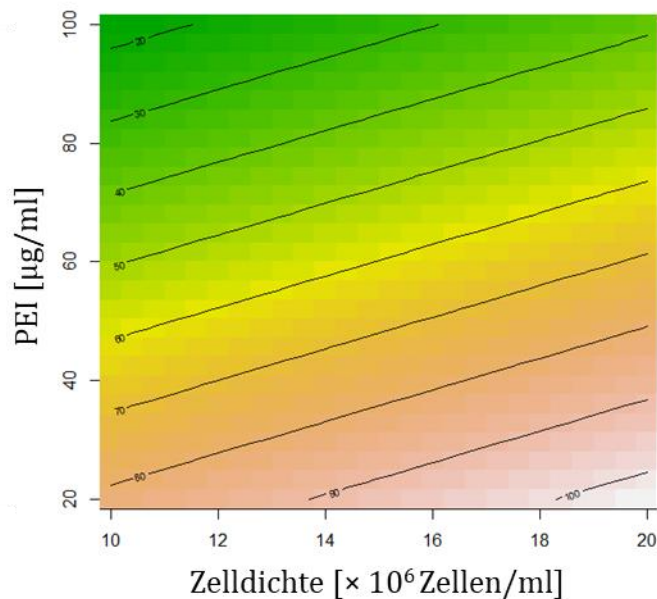
Allerdings ist eine PEI-DNA-Interaktion nur bei einem Vertrauensniveau von 0,90 signifikant. Als Haupteffekt ist lediglich der Faktor DNA signifikant. Das Modell ist mit  $R = 0,85$ ,  $\bar{R} = 0,76$  ausreichend genau. Der *lack of fit* (0,86) ist nicht signifikant und somit lässt sich die mittlere FI ohne quadratische Terme beschreiben.

Aus Abbildung 9 lässt sich ableiten, dass auch die mittlere FI bei einer geringen DNA-Konzentration von weniger als 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  am höchsten ist. Der Einfluss der PEI-Konzentration ist gering und nimmt bei geringen DNA-Konzentrationen ab. Werden DNA-Konzentrationen von mehr als 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt, lässt sich die mittlere FI durch eine höhere PEI-Konzentration steigern.



**Abbildung 9:** *Response surface* für die Zielgröße mittlere Fluoreszenzintensität GFP-positiver Zellen in Abhängigkeit der PEI- und DNA-Konzentration.

Für die Analyse der Viabilität lässt sich das Modell auf die einzigen beiden Haupteffekte PEI und Zelldichte reduzieren. Alle anderen Terme sind nicht signifikant. Mit  $R^2 = 0,94$ ,  $\bar{R}^2 = 0,93$  und einem *lack of fit* von 0,34 wird die Viabilität durch das Modell sehr präzise beschrieben. Vor allem die PEI-Konzentration beeinflusst die Viabilität, die mit steigender PEI-Konzentration sinkt (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** *Response surface* für die Zielgröße Viabilität [%] in Abhängigkeit der PEI- und Zell-Konzentration.

Anhand der Ergebnisse lässt sich nicht erkennen, ob innerhalb des gewählten Versuchsraums ein Optimum identifiziert werden konnte. Da sowohl bei der mittleren FI als auch bei dem Anteil GFP-positiver Zellen die höchsten Werte bei den geringsten DNA- und PEI-Konzentrationen zu beobachten sind und kein Sattelpunkt zu erkennen ist, kann das Optimum jenseits dieser Grenzen liegen. In einem weiteren vollfaktoriellen Design mit den Faktoren PEI (Stufen: 10 µg/ml und 30 µg/ml) und DNA (Stufen: 5 µg/ml und 10 µg/ml) sowie zwei *center points* wurde überprüft, ob sich das Optimum bei niedrigeren PEI- und DNA-Konzentrationen befindet. Allerdings wurde die höchste Transfektionseffizienz bei 10 µg/ml DNA und 30 µg/ml PEI identifiziert (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich optimale Transfektionsbedingungen in diesem Bereich finden lassen. Aus diesem Grund wurde im nächsten Kapitel mittels eines CCD das Optimum näher bestimmt.

### 5.1.3 Optimierung des Hochzelldichte-Transfektionsprotokolls

Basierend auf den Ergebnissen in 5.1.2 wurde ein optimiertes Transfektionsprotokoll für eine Zelldichte von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml entwickelt. Dazu wurde die ideale DNA- und PEI-Konzentration in einem CCD ermittelt. In allen Ansätzen wurde DNA



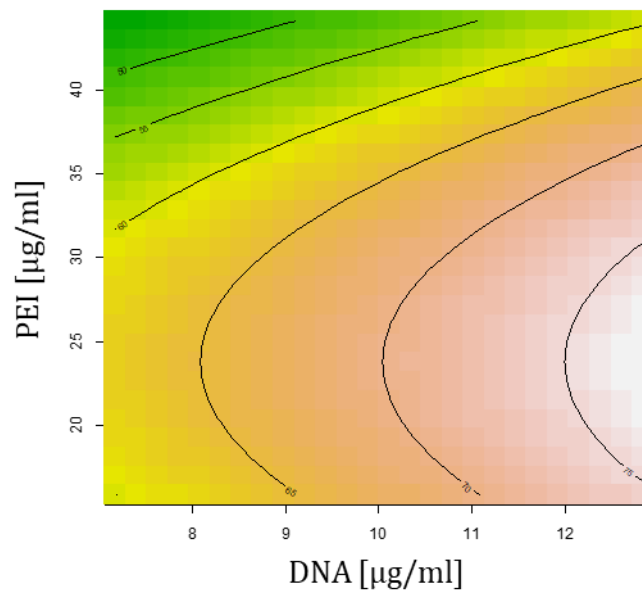
(pDSG-IBA103-GFP, kodiert für eGFP) zu 2 ml Zellkultur pipettiert, um die in Tabelle 7 aufgeführten DNA-Konzentrationen zu erhalten. Anschließend wurden die entsprechende Menge PEI zur Kultur zugegeben, um die in Tabelle 7 gelisteten PEI-Konzentrationen einzustellen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C und 300 rpm in einem TubeSpin® Bioreaktor wurden alle Ansätze durch Zugabe von CHO-TF-Kulturmedium auf eine Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt und weiter kultiviert. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Analyse der Kulturen mit einem CytoFLEX-Durchflusszytometer, deren Ergebnisse in Tabelle 7 aufgeführt sind.

**Tabelle 7:** Darstellung des verwendeten CCD. Es werden die Faktoren PEI-Konzentration (PEI) und DNA-Konzentration (DNA) bei einer Zelldichte von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml untersucht. Die für jeden Faktor gewählten Stufen sind aufgeführt. Aus allen Ansätzen wurden zwei Tage nach der Transfektion Proben im Durchflusszytometer analysiert und der Anteil GFP-positiver Zellen (GFP+), die mittlere Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen (mittlere FI) sowie die Viabilität der Kultur (Viabilität) gemessen.

Nr.	PEI [µg/ml]	DNA [µg/ml]	GFP+ [%]	mittlere FI	Viabilität [%]
C1.5	30,0	10,0	69	1.005.964	78
C1.2	40,0	8,0	53	711.803	80
C1.1	20,0	8,0	68	869.138	91
C1.3	20,0	12,0	77	1.261.856	87
C1.4	40,0	12,0	61	1.036.328	73
C1.6	30,0	10,0	67	1.047.339	82
S2.2	44,1	10,0	55	977.628	78
S2.6	30,0	10,0	70	1.229.683	82
S2.1	15,9	10,0	63	906.870	79
S2.3	30,0	7,2	59	759.394	82
S2.4	30,0	12,8	76	1.388.830	87
S2.5	30,0	10,0	67	1.020.020	87

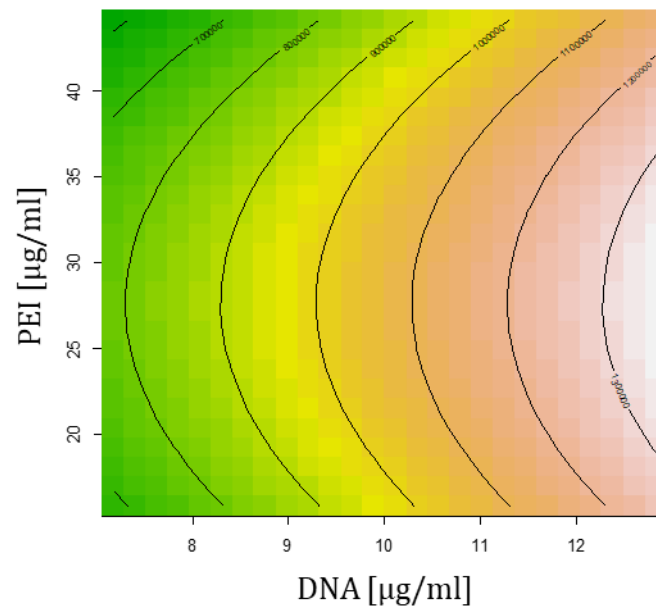
Nach der Analyse der Proben mit dem Durchflusszytometer wurde der Einfluss der Faktoren DNA-Konzentration und PEI-Konzentration auf die Messgrößen GFP-positiver Zellen, mittlere Fluoreszenzintensität und Viabilität mittels RSM ermittelt. Nachdem alle nicht signifikanten Terme aus den Modellen entfernt wurden, haben sowohl die DNA-Konzentration als auch die PEI-Konzentration einen signifikanten

Einfluss auf den Anteil GFP-positiver Zellen. Eine Wechselwirkung beider Faktoren kann im Modell nicht nachgewiesen werden. Mit einem  $R^2 = 0,90$  sowie einem  $\bar{R}^2 = 0,84$  sowie einem *lack of fit* von 0,23 werden die Messwerte durch das Modell gut beschrieben. Eine hohe Transfektionseffizienz von über 65 % wird bei einer DNA-Konzentration ab 10  $\mu\text{g/ml}$  und einer PEI-Konzentration zwischen 20  $\mu\text{g/ml}$  und 30  $\mu\text{g/ml}$  erreicht (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** *Response surface* für die Zielgröße GFP-positiver Zellen in Abhängigkeit der PEI- und DNA-Konzentration

In Bezug auf die mittlere Fluoreszenzintensität sind ebenfalls beide Faktoren signifikant, ohne dass es im Modell eine Wechselwirkung beider Faktoren gibt. Anhand des Modells kann der Einfluss der Faktoren auf die Fluoreszenzintensität adäquat beschrieben werden ( $R^2 = 0,84$  sowie einem  $\bar{R}^2 = 0,78$  sowie einem *lack of fit* von 0,66). Wie beim Anteil GFP-positiver Zellen wird der höchste Wert bei DNA-Konzentrationen von über 10  $\mu\text{g/ml}$  erzielt. Eine ideale PEI-Konzentration liegt zwischen 20  $\mu\text{g/ml}$  und 35  $\mu\text{g/ml}$ . Die DNA-Konzentration hat im Modell einen stärkeren Einfluss auf die mittlere FI als die PEI-Konzentration. Für die Viabilität konnte kein valides Modell errechnet werden, bzw. war keiner der untersuchten Faktoren signifikant.



**Abbildung 12:** *Response surface* für die Zielgröße mittlere Fluoreszenzintensität GFP-positiver Zellen in Abhängigkeit der PEI- und DNA-Konzentration

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse ist eine DNA-Konzentration von 12  $\mu\text{g/ml}$  und eine PEI-Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  ideal, um Zellen bei einer hohen Zelldichte von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml zu transfizieren. Höhere PEI-Konzentrationen erhöhen die Effizienz nur minimal. Weil PEI jedoch auf Zellen toxisch wirkt und übermäßiger Zellstress vor der späteren Selektion vermieden werden soll, wird die PEI-Konzentration möglichst gering gewählt. Indem zwei Kulturen unter diesen Bedingungen transfiziert werden, wird dieses auf dem Modell basierten Optimum verifiziert. Sowohl die erzielte Transfektionseffizienz als auch die Viabilität zeigen, dass die ermittelten Transfektionsbedingungen zu einer hohen Transfektionsrate und GFP-Expression sowie einer hohen Viabilität führen (Tabelle 8). So beträgt die Viabilität an Tag 4 noch 85 % und 99 % der Zellen sind GFP-positiv. Allerdings ließen sich GFP-negative Zellen und GFP-positive Zellen mit geringer FI nicht als klare Populationen im Streudiagramm der Durchflusszytometeranalyse trennen.

**Tabelle 8:** Verifizierung der im DoE ermittelten optimalen Bedingungen zur Transfektion von CHO-S-Zellen.  $20 \times 10^6$  Zellen/ml werden mit  $12 \mu\text{g/ml}$  DNA und  $20 \mu\text{g/ml}$  PEI transfiziert. Nach der Transfektion werden die Zellen auf  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt und vier Tage kultiviert. Die Tabelle zeigt die Viabilität, den Anteil GFP-positiver Zellen (GFP+), die mittlere FI der GFP-positiven Zellen (mittlere FI) sowie die jeweiligen Standardabweichungen (StdAbw).

Tag	Viabilität [%]	StdAbw Viabilität [%]	GFP+ [%]	StdAbw GFP+ [%]	mittlere FI	StdAbw mittlere FI
2	<b>92</b>	4,9	<b>83</b>	2,8	<b>1.666.536</b>	144.702
3	<b>90</b>	2,1	<b>92</b>	0,0	<b>1.373.776</b>	58.813
4	<b>85</b>	2,8	<b>99</b>	0,0	<b>969.690</b>	56.516

#### 5.1.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse zur Entwicklung von Transfektionsprotokollen

Eine hohe Transfektionseffizienz ist vorteilhaft, um viele hochproduzierende, stabile Zellen zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels statistischer Versuchsplanung ein Transfektionsprotokoll für CHO-Zellen bis zu einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml entwickelt und verwendet. In der Literatur gibt es mehrere Beispiele für CHO-Transfektionsprotokolle bis zu einer Zelldichte von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml.<sup>17</sup> Später wurde ein weiteres Protokoll für eine Transfektion bei hohen Zelldichten bis zu  $20 \times 10^6$  Zellen/ml etabliert. Derartige Zelldichten wurden bis dahin vor allem für HEK293-Zellen publiziert.<sup>52</sup> Erst kürzlich beschrieben Schmitt et al. ein Transfektionsprotokoll für CHO-Zellen bei einer derartigen Zelldichte.<sup>47</sup> Dabei wurde ebenfalls ein DoE zur Ermittlung der idealen Transfektionsbedingungen verwendet. Die Autoren identifizierten in ihrer Studie für eine optimale Transfektion ähnliche DNA- und PEI-Konzentrationen ( $12,5 \text{ mg DNA/l}$  und  $27 \text{ mg PEI/l}$ ).

Beide in dieser Arbeit entwickelten Protokolle erlauben eine effiziente Transfektion von CHO-Zellen. So exprimieren zwei Tage nach der Transfektion 62 % der Zellen GFP, die nach dem ersten Protokoll transfiziert wurden, bei einer Viabilität von 92 %. Allerdings erweist sich die Transfektion bei einer Zelldichte von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml als effizienter. Hier kann zwei Tage nach der Transfektion ein Anteil von 83 % GFP-positiver Zellen identifiziert werden, wobei die Viabilität der Kultur 92 % beträgt. In den folgenden zwei Tagen erhöht sich der Anteil GFP-positiver Zellen auf bis zu 99 %. Zwar kann auch bei geringeren Zelldichten nach zwei Tagen ein

ähnlicher Anteil GFP-positiver Zellen erzielt werden wie im Hochzelldichteprotokoll (siehe Tabelle 5), allerdings führen die verwendeten PEI- und DNA-Konzentrationen zu einer geringen Viabilität. Gerade dieser negative Effekt auf die Viabilität ist bei den idealen Bedingungen des Hochzelldichteprotokolls nicht zu verzeichnen. Dabei zeigt der Vergleich der Protokolle, dass die PEI-Konzentration im optimierten Hochzelldichteprotokoll mit 20 µg/ml doppelt so hoch ist wie bei einer Transfektion mit geringer Zelldichte. Die DNA-Konzentration ist sechsmal höher als beim Protokoll mit einer niedrigen Zelldichte.

Ein Grund für die höhere Viabilität im Hochzelldichte-Transfektionsprotokoll ist vor allem die hohe Zelldichte. Bereits bei der Optimierung der Transfektion bei geringeren Zelldichten und dem DoE in Kapitel 5.1.2 ist zu beobachten, dass die Viabilität der Kultur bei einer gegebenen PEI-Konzentration mit steigender Zelldichte im Ansatz zunimmt. Auch Bertschinger et al. beschreiben in ihrer Studie, dass bei einer gegebenen PEI-Menge die Wachstumsrate der Zellen nach der Transfektion bei hohen Zelldichten höher ist. Mutmaßlich ist eine geringere Menge an aufgenommenen PEI pro Zelle für dieses Ergebnis verantwortlich.<sup>40</sup> Tatsächlich beträgt die PEI-Menge im Hochzelldichteprotokoll nur 1 µg PEI pro  $10^6$  Zellen. Im Falle einer Transfektion bei einer Zelldichte von  $4,7 \times 10^6$  Zellen/ml beträgt der Wert schon 1,9 µg PEI pro  $10^6$  Zellen, bzw. 2,25 µg, wenn ein Protokoll verwendet wird, bei dem 80 % der Zellen GFP-positiv sind. Mehrere Studien haben gezeigt, dass ein großer Teil des eingesetzten PEIs keinen Komplex mit der DNA bildet. Stattdessen liegt dieses PEI frei in der Lösung vor.<sup>38,42,49,51,144</sup> Einerseits wird die toxische Wirkung des PEIs auf das freie PEI zurückgeführt,<sup>35,38,51</sup> andererseits hat freies PEI einen positiven Einfluss auf die Transfektionseffizienz.<sup>43,49,51</sup> Aufgrund der geringeren PEI-Menge pro Zelle und des geringeren PEI-DNA-Verhältnisses von 1,66 dürfte die Menge an freiem PEI pro Zelle im Hochzelldichte-Transfektionsprotokoll geringer sein.

Auch andere Faktoren beeinflussen die Effizienz der Protokolle. So ist anzunehmen, dass sich die gebildeten DNA-PEI-Komplexe zwischen den beiden Protokollen aufgrund der unterschiedlichen PEI- und DNA-Konzentrationen und des unterschiedlichen PEI-DNA-Verhältnisses in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden. Publikationen belegen, dass unterschiedliche Bedingungen

bei der Komplexbildung einen Einfluss auf die Eigenschaften der Komplexe wie Stabilität, Größe und Ladung und somit auf die Transfektionseffizienz haben (vgl. 2.2).

Zudem könnte die höhere Konzentration von DNA, PEI und Zellen dazu führen, dass die DNA-PEI-Komplexe schneller und effizienter mit den Zellen assoziieren und aufgenommen werden. Auch Backliwal et al. konnten in ihren Experimenten mit HEK293-Zellen eine höhere Transfektionseffizienz bei Verwendung eines Hochzell-dichte-Transfektionsprotokolls beobachten. So stieg die Anzahl an Plasmidkopien in den Zellen mit höheren Zelldichten sowie höheren DNA- und PEI-Konzentrationen. Dabei blieben Zellzahl, DNA- und PEI-Menge sowie das PEI-DNA-Verhältnis in den Ansätzen gleich.<sup>52</sup> Eine höhere Anzahl an Plasmidkopien lässt darauf schließen, dass mehr DNA-PEI-Komplexe in die Zellen aufgenommen wurden. Dies ist im Hinblick auf die Wahrscheinlichkeit vorteilhaft, stabile Zellen zu erhalten. Damit der Protonenschwamm-Effekt einsetzt, ist außerdem eine ausreichende Menge PEI in den Endosomen nötig (vgl. 2.2). Wenn jedoch mehr PEI in Form von komplexierter DNA in die Zelle gelangt, so kann postuliert werden, dass weniger freies PEI vorhanden sein muss, um den Protonenschwamm-Effekt zu induzieren. Dies könnte eine Erklärung sein, weshalb weniger PEI pro Zelle im Hochzell-dichte-Transfektionsprotokoll benötigt wird. Außerdem ist bei der direkten Zugabe von PEI und DNA in eine geschüttelte Kultur die Komplexstabilität gering, weshalb eine hohe DNA-, PEI- und Zellkonzentration und eine schnelle Komplexaufnahme in diesem Fall wichtig ist.<sup>38</sup>

## **5.2 Auswahl von Vektorelementen und Test verschiedener Matrices für die Selektion von Zellen mittels STACS**

In diesem Kapitel werden sowohl verschiedene Varianten eines CD4-TST-Markerproteins für die Selektion untersucht als auch die Verwendung von verschiedenen Matrices, an die Strep-Tactin® gebunden ist. Zellen werden an magnetische *Microbeads*, eine Nitrozellulosemembran und an große Agarose-Beads gebunden. Bei den Experimenten werden unter anderem die Anreicherung von GFP-positiven Zellen und die Oberflächenkonzentration des Markers in den jeweiligen Populationen analysiert.

### 5.2.1 Test verschiedener Oberflächenmarker-Varianten für die Selektion von MEXi-293E-Zellen mit Strep-Tactin® Magnetic Microbeads

In Kapitel 3 wird das generelle Funktionsprinzip der in dieser Arbeit entwickelten STACS-Methode beschrieben. Ein entscheidender Schritt der Methode ist die Bindung der positiven Zellen mittels des koexprimierten TST-Membranproteins an die Strep-Tactin® *Magnetic Microbeads*. Um zu analysieren, welchen Einfluss die Art des TST-Membranproteins auf die Effizienz der Bindung der Zellen an die Beads hat, wurden drei verschiedene Varianten eines CD4-Rezeptors getestet (Abbildung 3).

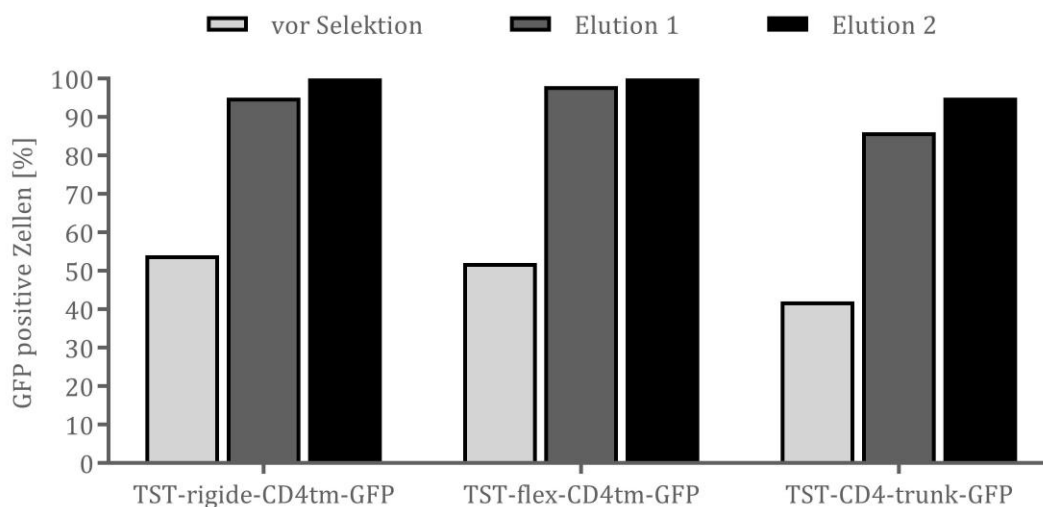
Die für das Experiment verwendeten Plasmide wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Gossen des Berlin-Brandenburger Zentrums für Regenerative Therapien zur Verfügung gestellt. Eine CD4-Variante besteht aus der CD4-Transmembrandomäne sowie aus den extrazellulären Domänen des CD4-Rezeptors an dessen N-Terminus ein TST fusioniert ist (TST-CD4-trunk-GFP, Abbildung 75). Bei der zweiten und dritten Variante wird nur die CD4-Transmembrandomäne verwendet und der TST ist mit einer rigiden oder flexiblen Linker an das N-terminale Ende der Domäne platziert (Abbildung 76 und Abbildung 77). In einem Fall wird eine Aminosäuresequenz (GGGGS) gewählt, die einen flexiblen Linker bildet (TST-flex-CD4tm-GFP). Bei der dritten Variante (TST-rigide-CD4tm-GFP) wird eine rigide Aminosäuresequenz als Linker verwendet (EAAAK). Alle CD4-Varianten sind am C-Terminus mit eGFP fusioniert. Auf diese Weise kann die Fluoreszenzintensität einer Zelle als Maß der CD4-Expression dienen. Die Expression des TST-Membranproteins wird bei allen Plasmiden von einem EF1 $\alpha$ -Promotor kontrolliert.

Für das Experiment wurden  $1 \times 10^7$  MEXi-293E Zellen einen Tag nach der Transfektion mit jeweils einem der oben beschriebenen Plasmiden mittels der STACS-Methode selektiert (vgl. Kapitel 7.1). Pro Ansatz wurden 30  $\mu$ l *Microbead*-Lösung eingesetzt. Die erste Elution erfolgte in einem Volumen von 10 ml. Weitere Elutionen wurden mit einem Volumen von 5 ml durchgeführt. Es wurde eine D-Biotinkonzentration von 1 mM in den Elutionsschritten verwendet. Eine Analyse der Proben erfolgte im CytoFLEX-Durchflusszytometer.

Die Selektion der Zellen führt gegenüber der Ausgangskultur mit allen drei verwendeten CD4-Varianten zu einer Anreicherung der GFP-positiven Zellen (Abbildung 13). In den Elutionen wird in allen Experimenten eine Anreicherung auf  $\geq 95$  %

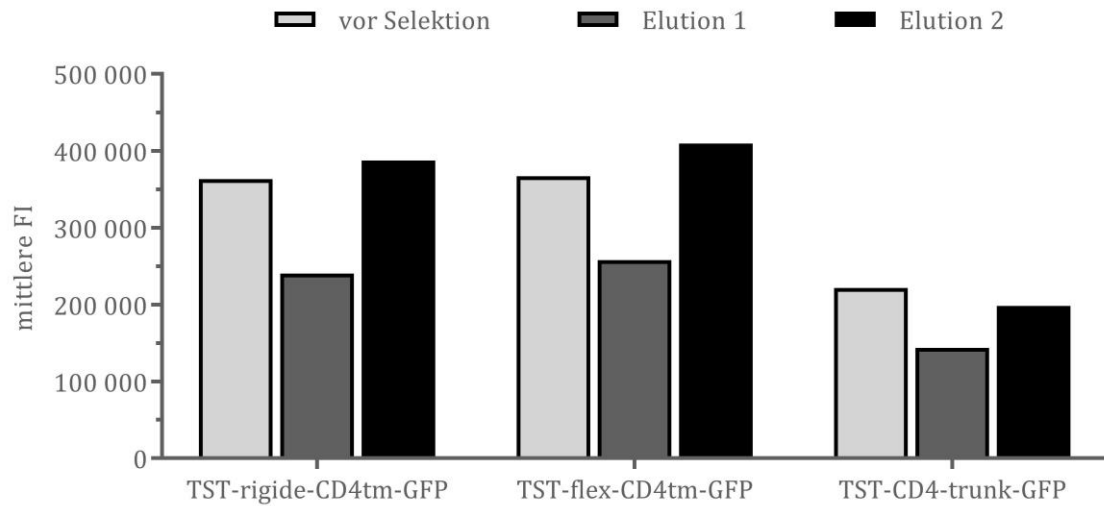
positive Zellen erreicht. Nur in der ersten Elution der Kultur TST-CD4-trunk-GFP beträgt der Anteil positiver Zellen 86 %. Bezüglich der Markerproteinkonzentration auf der Zelloberfläche, gemessen an der mittleren FI, tragen Zellen in der ersten Elutionsfraktion weniger CD4 auf der Oberfläche als in der Ausgangskultur und der zweiten Elutionsfraktion (Abbildung 14). In Elution 2 und der Ausgangskultur ist die Markerdichte vergleichbar.

Es fällt auf, dass die CD4-Konzentration auf Zellen, die nur die Transmembrandomäne exprimieren, in der Ausgangskultur 1,64- bis 1,66-mal höher ist als bei Zellen mit der TST-CD4-trunk-GFP-Variante. Außerdem werden insgesamt 1,5- bis 1,8-mal mehr Zellen selektiert, wenn nur die Transmembrandomäne exprimiert wird (Abbildung 15). Der höhere Anteil an selektierten Zellen ist vor allem auf eine höhere Zellzahl in Elution 2 zurückzuführen. Daraus ergibt sich eine höhere Selektionseffizienz bei Verwendung von Konstrukten, die nur die Transmembrandomäne kodieren.

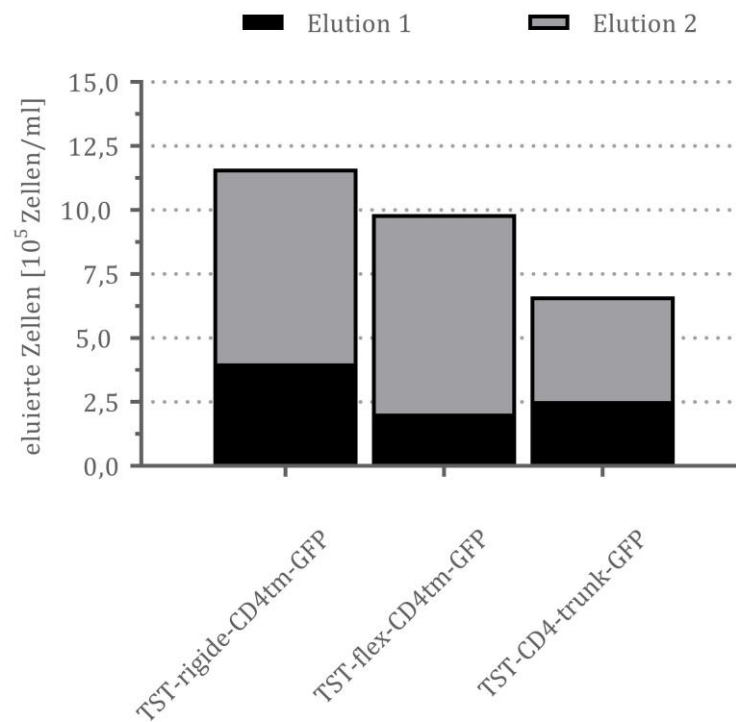


**Abbildung 13:** Anreicherung von GFP-positiven Zellen in Elution 1 und Elution 2 mittels der STACS-Methode. Der Anteil der GFP-positiven Zellen vor der Selektion ist ebenfalls dargestellt. Die Zellen exprimieren verschiedene Varianten des CD4-Rezeptors. Der cytosolische Terminus des Rezeptors ist mit einem eGFP fusioniert. Alle Varianten enthalten die CD4-Transmembrandomäne. CD4tm-Varianten sind N-terminal mittels eines rigiden (TST-rigide-CD4tm-GFP) oder flexiblen (TST-flex-CD4tm-GFP) Linkers mit einem TST fusioniert. TST-CD4-trunk-GFP enthält zusätzlich zur Transmembrandomäne die extrazellulären Domänen des CD4 und ist ebenfalls am N-Terminus mit einem TST fusioniert.





**Abbildung 14:** Mittlere Fluoreszenzintensität der GFP-positiven Zellen aus Abbildung 13 vor der Selektion und nach der Selektion in den Elutionsfraktionen 1 und 2.



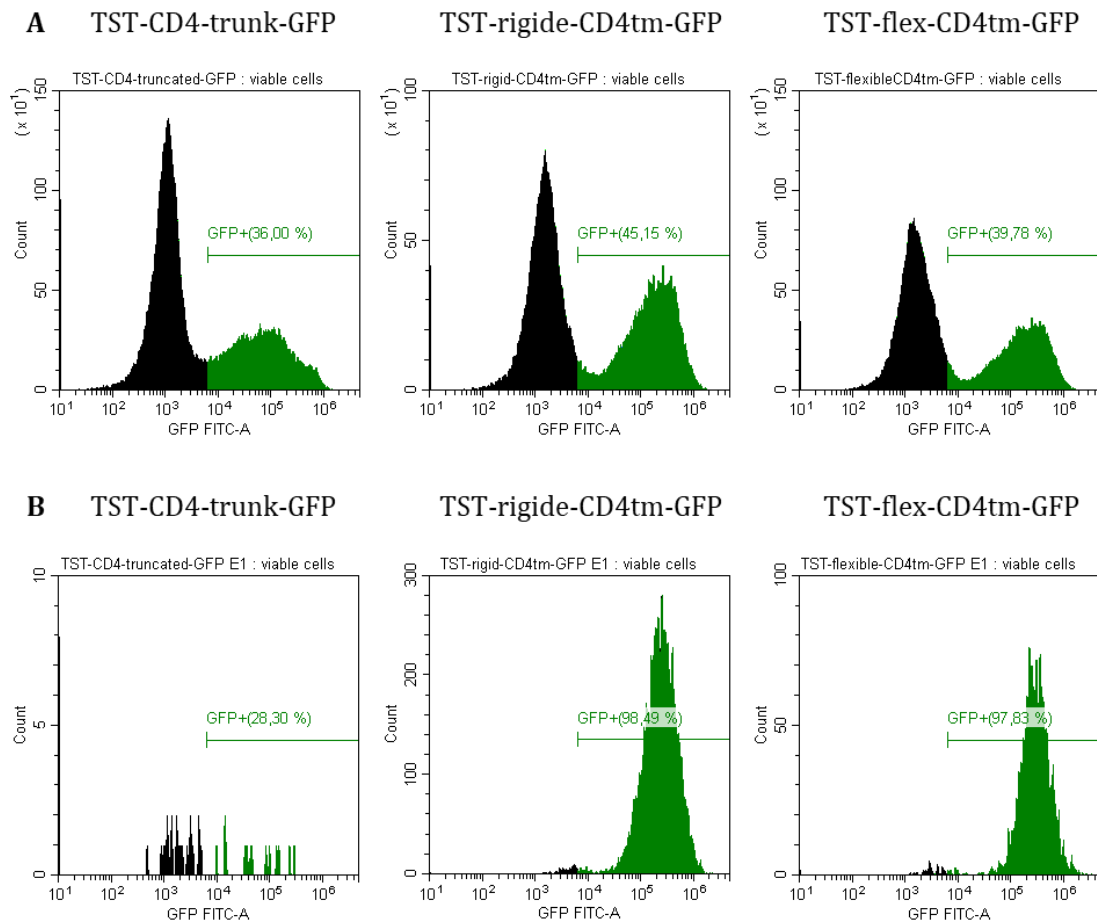
**Abbildung 15:** Ausbeute selektierter Zellen, welche verschiedene TST-CD4-GFP-Varianten exprimieren. Die Grafik zeigt die Ausbeute in Elutionsfraktion 1, Elutionsfraktion 2 sowie der Summe aus Elutionsfraktionen 1 und 2.

### 5.2.2 Test verschiedener Oberflächenmarker-Varianten für die Selektion von MEXi-293E-Zellen mittels Strep-Tactin® beschichteter Nitrozellulose

Neben der Selektion mittels Strep-Tactin® *Magnetic Microbeads* wurde überprüft, ob auch zweidimensionale Oberflächen für eine Selektion geeignet sind. Dazu wurden Zellen mittels einer mit Strep-Tactin® beschichteten Nitrozellulosemembran (Durchmesser 2,2 cm, 60 µg Strep-Tactin m2 Multimer pro cm<sup>2</sup>) selektiert, welche von der IBA bereitgestellt wurde. Die Zellen wurden vor der Selektion mit jeweils einer der in Kapitel 5.2.1 beschriebenen CD4-Varianten transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden pro Ansatz  $1,05 \times 10^7$  MEXi-293E Zellen, wie in Abschnitt 7.1 beschrieben, vorbereitet. Nach Inkubation im *Dissociation Buffer* und der nachfolgenden Zentrifugation wurden die Zellpellets in 400 µl MEXi-TM Medium suspendiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit der Membran in einer Zellkulturplatte, wobei die Platte alle 5 min vorsichtig geschwenkt wurde. Anschließend wurde die Membran in ein Well mit frischem MEXi-TM Medium überführt und die Platte leicht geschwenkt, um ungebundene Zellen von der Membran zu waschen. Die Waschprozedur wurde in zwei weiteren Wells mit frischem Medium wiederholt, bevor die Membran zur Elution in eine Petrischale mit 10 ml MEXi-CM und 1 mM Biotin überführt wurde. Abschließend wurde der Überstand nach 10 min aus der Petrischale abgenommen, die eluierten Zellen zentrifugiert, in 500 µl MEXi-CM resuspendiert und im CytoFLEX-Durchflusszytometer vermessen.

Zellen, die nur die CD4-Transmembrandomäne (CD4<sub>tm</sub>) exprimieren, können mittels einer Strep-Tactin® beschichteten Nitrozellulosemembran selektiert und angereichert werden (Abbildung 16). Dabei werden mehr Zellen selektiert, wenn der Linker zwischen CD4-Transmembrandomäne und TST aus einer rigiden Aminosäuresequenz besteht ( $1,39 \times 10^5$  Zellen) als aus einer flexiblen ( $0,32 \times 10^5$  Zellen). Wird dagegen die CD4-Variante mit der extrazellulären Domäne exprimiert, so können bei Verwendung einer zweidimensionalen Membran keine Zellen angereichert werden. Bei beiden CD4<sub>tm</sub>-Kulturen erhöht sich im Zuge der Selektion der Anteil GFP-positiver Zellen auf 98 %. Selektierte Zellen weisen eine 1,2-fach bzw. 1,4-fach (TST-rigide-CD4<sub>tm</sub>-GFP bzw. TST-flex-CD4<sub>tm</sub>-GFP) höhere mittlere FI auf als die nicht selektierte Ausgangskultur. Auch in diesem Experiment erweist sich somit die

Verwendung eines Konstrukts, das nur die Transmembrandomäne des CD4 kodiert, als effizienter.



**Abbildung 16:** Anreicherung von GFP-positiven Zellen in Elution 1 mittels der STACS-Methode auf einer Strep-Tactin® beschichteten Nitrozellulosemembran. (A) Analyse der Kulturen vor der Selektion. (B) Analyse der eluierten Zellen. Die Zellen exprimieren verschiedene Varianten des CD4-Rezeptors. Der cytosolische Terminus des Rezeptors ist mit einem eGFP fusioniert. Alle Varianten enthalten die CD4-Transmembrandomäne. CD4tm-Varianten sind N-terminal mittels eines rigiden (TST-rigide-CD4tm-GFP) oder flexiblen (TST-flex-CD4tm-GFP) Linkers mit einem TST fusioniert. TST-CD4-trunk-GFP enthält zusätzlich zur Transmembrandomäne die extrazellulären Domänen des CD4 und ist am N-Terminus mit einem TST fusioniert.

### 5.2.3 Selektion von MEXi-293E-Zellen mittels Strep-Tactin®-Multimer-Agarose

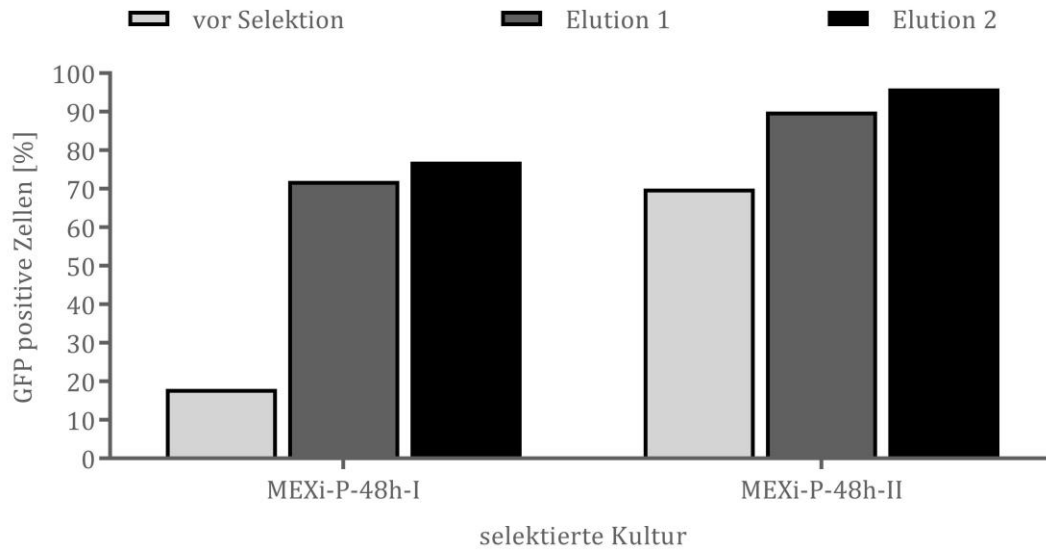
Nachdem Zellen sowohl mittels Strep-Tactin® *Magnetic Microbeads* als auch mit einer Strep-Tactin® beschichteten Nitrozellulosemembran selektiert werden können, wurde untersucht, ob sich auch eine Agarosematrix für die Selektion der Zellen

eignet. Für das Experiment wurden CellThru™-Agarose-Beads verwendet, die mit multimerisiertem Strep-Tactin® gekoppelt waren und von der IBA bereitgestellt wurden. Der Bead-Durchmesser beträgt 200–300 µm. Agarose-Beads sind in der Regel preiswerter als ferromagnetische Beads. Außerdem führt die Größe der CellThru™-Agarose zu einer hohen Sedimentationsgeschwindigkeit. Dadurch lässt sich eine Selektion leicht ohne weiteres Equipment wie einen Magneten durchführen. Zudem lässt sich Überstand von den Beads leicht trennen, wodurch eine Automatisierung der Methode mit einem etablierten automatischen Pipettiersystem realisiert werden könnte. Zur Selektion wurden MEXi-293E-Zellen aus dem Experiment in Kapitel 5.3.3 verwendet (MEXi-P-48h-I und MEXi-P-48h-II), die bereits eine stabile Expression des TST-flex-CD4tm-GFP-Markers aufwiesen.

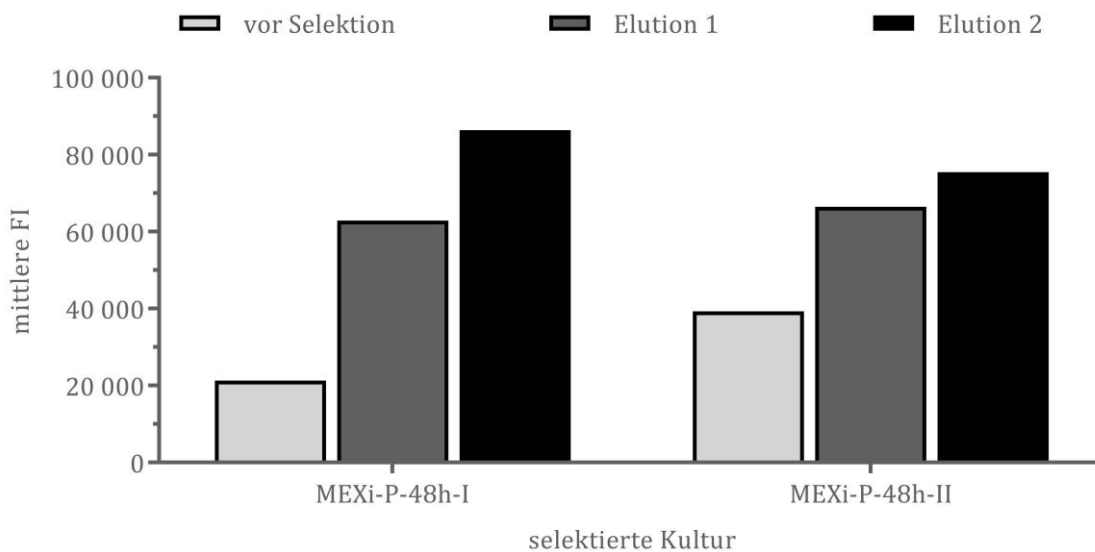
Für das Experiment wurden 900 µl der Strep-Tactin®-Agarose-Bead-Suspension (enthält zu 50 % Agarose-Beads) viermal mit 5 ml MEXi-TM-Medium gewaschen und anschließend in 900 µl MEXi-TM suspendiert. Dazu wurden die Beads in einer 15 ml Schraubröhre sedimentiert und der Überstand abgenommen.  $2 \times 10^7$ – $2,22 \times 10^7$  Zellen wurden zentrifugiert und in 10 ml MEXi-TM-Medium suspendiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl MEXi-TM suspendiert und mit jeweils 300 µl der vorbereiteten Beads gemischt. Beads und Zellen wurden für 10 min bei 2–8 °C auf einem Roller inkubiert. Anschließend erfolgte ein fünfmaliger Waschschrift mit jeweils 1,5 ml MEXi-TM, bei dem die Beads sedimentiert und der Überstand mit ungebundenen Zellen entfernt wurde. Zum Schluss wurden die Zellen in drei Elutionsfraktionen mit jeweils 1,5 ml MEXi-TM, welches 1 mM Biotin enthielt, eluiert. Die Proben wurden in einem CytoFLEX-Durchflusszytometer analysiert.

Die Ergebnisse belegen, dass die STACS-Methode auch mit einer agarosebasierten Matrix funktioniert. Bei beiden Kulturen wird der Anteil der GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen im Vergleich zur jeweiligen Ausgangskultur deutlich erhöht (Abbildung 17). Im Falle der MEXi-P-48h-I Kultur wird der Anteil positiver Zellen von 18 % vor der Selektion auf 72 % (Elution 1) und 77 % (Elution 2) gesteigert. Bei der Kultur MEXi-P-48h-II erhöht sich der Anteil positiver Zellen von 70 % auf 90 % (Elution 1) und 96 % (Elution 2).

Durch die Selektion wird zudem der Anteil an hochproduzierenden Zellen erhöht. Dabei korreliert der Anstieg der mittleren FI mit einem Anstieg der Elutionsfraktionsnummer (Abbildung 18). So steigt bei der Selektion von MEXi-P-48h-I die mittlere FI von 21.250 in der Ausgangskultur auf 62.874 (Elution 1) und 86.373 (Elution 2). Für die Selektion der MEXi-P-48h-II Kultur fällt der Anstieg der FI geringer aus. Hier wird die FI der Ausgangskultur (39.303) auf 66457 (Elution 1) und 75477 (Elution 2) erhöht.



**Abbildung 17:** Anreicherung von TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP-positiven MEXi-293E-Zellen in Elution 1 und Elution 2 mittels der STACS-Methode und Agarose-Beads, die mit multimerisiertem Strep-Tactin<sup>®</sup> gekoppelt sind. Die selektierten Kulturen MEXi-P-48h-I und MEXi-P-48h-II stammen aus dem Experiment in Kapitel 5.3.3.



**Abbildung 18:** Mittlere FI der TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP-positiven MEXi-293E-Zellen in Elution 1 und Elution 2 nach Selektion mit der STACS-Methode und Agarose-Beads, die mit multimerisiertem Strep-Tactin<sup>®</sup> gekoppelt sind. Die selektierten Kulturen MEXi-P-48h-I und MEXi-P-48h-II stammen aus dem Experiment in Kapitel 5.3.3.

#### 5.2.4 Zusammenfassung und Diskussion des Vergleichs verschiedener CD4-Varianten und Matrices

Im Abschnitt 5.2 wird untersucht, wie sich verschiedene Varianten des TST-Markerproteins auf die Selektion der Zellen auswirken und ob verschiedene Matrices für eine Anwendung der STACS-Methode verwendet werden können. Dazu wurden drei Varianten eines CD4-Rezeptors, der mit einem TST am extrazellulären N-terminus fusioniert war, getestet. Eine Variante enthielt die CD4-Transmembrandomäne sowie die extrazellulären Domänen des Rezeptors (CD4-trunk). Die beiden anderen Varianten enthielten die CD4-Transmembrandomäne (CD4tm), wobei der TST am N-Terminus mit einer flexiblen oder rigiden Linkersequenz fusioniert war. Alle Varianten waren intrazellulär mit eGFP fusioniert. Außerdem wurden STACS-Selektionen mit magnetischen Beads, Agarose-Beads (Durchmesser 150-300 µm) und einer Nitrozellulosemembran durchgeführt. Jede Matrix war mit Strep-Tactin® beschichtet.

Es gibt Unterschiede in den Ergebnissen zwischen dem Markerprotein, bei dem alle extrazellulären Domänen exprimiert wurden (CD4-trunk) und den beiden Varianten, bei denen nur die CD4-Transmembrandomäne (CD4tm) exprimiert wurde. Dass verschiedene Markervarianten zu unterschiedlichen Selektionsergebnissen führen, kann erwartet werden. Matheson et al. konnten ebenfalls einen Einfluss des gewählten Markerproteins für die Bead-Selektion feststellen. So schlug die Selektion mit einigen Markerproteinen fehl.<sup>122</sup>

Eine Selektion mittels einer Nitrozellulosemembran ließ sich nur mit Zellen erfolgreich durchführen, die die CD4tm-Varianten exprimierten. Bei der Selektion mittels magnetischer Beads war die Ausbeute an selektierten Zellen höher, wenn nur die CD4-Transmembrandomäne exprimiert wurde. Spätere Experimente dieser Arbeit zeigen, dass zwei Elutionen nicht ausreichend sind, um alle Zellen von den magnetischen *Microbeads* zu eluieren. Da vor allem Zellen mit einer höheren Markerdichte später eluieren und CD4tm-exprimierende Zellen eine höhere Markerkonzentration aufweisen als CD4-trunk-Zellen, würde sich das Verhältnis eluierter Zellen bei mehr Elutionsfraktionen eher weiter zu Gunsten der CD4tm-Varianten verschieben (siehe Kapitel 5.5.7).

Der Grund für die höhere Ausbeute der CD4<sup>tm</sup>-Varianten dürfte vor allem deren höhere Expression und somit höherer Dichte von TST auf der Zelloberfläche sein, wie an der höheren FI (GFP-Expression) der Zellen TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP und TST-rigide-CD4<sup>tm</sup>-GFP im Vergleich zu TST-CD4-trunk-GFP Zellen zu erkennen ist. Demnach wäre eine gewisse Mindestmenge an Oberflächenmarker auf einer Zelle nötig, um eine effiziente Bindung der Zellen an die Matrix zu gewährleisten. Tatsächlich ist aus anderen Methoden wie dem Hefedisplay bekannt, dass die Bindung von Zellen an mit Ligand funktionalisierte Beads mit der Konzentration von Bindungspartnern auf der Zelloberfläche korreliert.<sup>126</sup>

Eine weitere Ursache kann die Orientierung und Zugänglichkeit des TST sein. Bei der extrazellulären Domäne des CD4 ist der N-Terminus nicht direkt vertikal zur Zelle orientiert, sondern etwas diagonal (vgl. Protein Data Bank in Europe, 1wio<sup>145</sup>). Dadurch könnte der Tag weniger gut zugänglich sein als bei der Verwendung eines rekombinanten Linkers wie bei den beiden CD4<sup>tm</sup>-Varianten. Diese These der Tag-zugänglichkeit wird durch die Ergebnisse des Experimentes mit der Nitrozellulosemembran gestützt. Während bei der Verwendung von magnetischen *Microbeads* nur eine geringfügig höhere Zellausbeute bei der Verwendung eines rigiden Linkers im Vergleich zur Verwendung eines flexiblen Linkers zu beobachten war (1,2-fach), ist die Ausbeute bei der Verwendung der Membran um den Faktor 4,3 erhöht. Bei der Selektion von CD4-trunk-Zellen konnten mit der Membran nahezu keine Zellen isoliert werden, wogegen dies bei der Verwendung von *Microbeads* möglich war. Daher scheint es, dass die Orientierung des TST bei einer zweidimensionalen Matrix von größerer Bedeutung ist als bei 1-3 µm großen *Microbeads*.

Somit sind die idealen Bindungsbedingungen bei der Verwendung einer zweidimensionalen Matrix offenbar deutlich wichtiger als bei einer dreidimensionalen Bead-Matrix. Im Falle einer Membran stehen für die Bindung nur jene Bindungsstellen auf der Zelle zur Verfügung, die zu der Membran orientiert sind. Im Falle der *Microbeads* kann dagegen jede Bindungsstelle auf der Zelle (360°) genutzt werden. Dadurch würde sich eine geringe Anzahl von Bindungsstellen und die Orientierung des TST gerade bei der Verwendung einer Membran stärker auf die Effizienz der Bindung der Zellen auswirken.



Alle getesteten Matrices erlauben eine Selektion und Anreicherung von GFP-positiven Zellen. Werden Agarose-Beads verwendet, ist der Anteil an GFP-positiven Zellen in den selektierten Populationen geringer als bei den beiden anderen Matrices. Allerdings wurden weder die membranbasierte Selektion noch die agarosebasierte Selektion optimiert. Dagegen gab es bei der Verwendung von *Microbeads* aus den Protokollen zur Isolierung von Blutzellen bereits Erfahrungen hinsichtlich der idealen Waschprozedur zur Entfernung negativer Zellen.

Sowohl die Selektion mit Agarose-Beads als auch mit der Nitrozellulosemembran führen zur Selektion von Zellen mit einer im Mittel höheren Expression des Markers als in der Ausgangskultur. Dies ist aufgrund der in Kapitel 3 beschriebenen Theorie zur STACS-Methode zu erwarten. Auch im Experiment mit *Microbeads* ist ein Anstieg der FI im Vergleich zur Ausgangskultur zu erwarten, wenn mit weiteren Fraktionen eluiert worden wäre (vgl. Kapitel 5.3, 5.4 und 5.5). Im Gegensatz zum *Microbead*-Experiment kann sowohl bei Verwendung von Agarose-Beads als auch einer Membran ein Anstieg der FI im Vergleich zur Ausgangskultur bereits in der ersten Elutionsfraktion nachgewiesen werden. In beiden Fällen dürfte die Bindung der Zellen an die Matrix weniger stark sein als bei *Microbeads*. Daraus resultiert eine schnellere Elution von Zellen. Wie oben beschrieben, stehen den Zellen bei einer zweidimensionalen Matrix weniger Bindungsstellen zur Verfügung. Gleiches gilt für die sehr großen Agarose-Beads, bei denen eine Zelle an nur einem Bead bindet und somit Bindungsstellen auf der Bead-abgewandten Seite nicht genutzt werden können. Die insgesamt höhere FI der Zellen im *Microbead*- und Membran-Experiment resultiert daraus, dass sich das zur Transfektion verwendete Plasmid (Abbildung 3, Abbildung 75–Abbildung 77) und vor allem der für die Kontrolle der Markergenexpression verantwortliche Promotor von dem Plasmid im Agaroseexperiment (Abbildung 72) unterscheiden.

Die hier beschriebenen Versuche dienten der Überprüfung, ob andere Matrices als magnetische *Microbeads* für die STACS-Methode verwendet werden können und ob unterschiedliche Markerproteine die Effizienz der Methode beeinflussen. Daher wurden die Experimente ohne Replikationen durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden *Microbeads* verwendet, weil sie bei verschiedenen Zellmengen leichter skalierbar sind als eine Membran. Außerdem verfügen Beads generell über eine

größere Oberfläche als eine zweidimensionale Matrix; ein Vorteil hinsichtlich der Bindungskapazität pro Volumen. Des Weiteren verfügt die IBA über einen validierten Herstellungsprozess für *Microbeads*, nicht aber für große Agarose-Beads. Daher ist die Verwendung der *Microbeads* strategisch sinnvoller, weil nicht erst die Produktion der Matrix für eine Markteinführung entwickelt werden muss und das bestehende Portfolio genutzt werden kann. Das Ergebnis dieses Kapitels zeigt jedoch, dass die STACS-Methode in Zukunft auf große Agarose-Beads adaptiert und optimiert werden kann. Dies könnte bei einer späteren Automatisierung vorteilhaft sein, weil kein Magnet nötig ist und die bloße Sedimentation der großen Beads zur Trennung der gebundenen Zielzellen ausreicht. So kann theoretisch jedes automatisiertes Pipettiersystem verwendet werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die STACS-Methode hinsichtlich der Matrices als auch der Markerproteine eine große Flexibilität zulässt. Damit wird es Anwendern ermöglicht, das Prinzip auf individuelle Anforderungen anzupassen. Für eine Verwendung der Agarose- und Membranimatrix bedarf es allerdings weiterer Optimierungen.

### **5.3 Nutzung der STACS-Methode zur Selektion stabiler hochexprimierender CHO- und MEXi-293E-Zellen und Vergleich mit antibiotikabasierter Selektion**

In diesem Kapitel werden CHO- und MEXi-293E-Zellen zunächst mit Puromycin und anschließend mittels der STACS-Methode selektiert. Zudem wird der Effekt einer STACS-Selektion zwei Tage nach der Transfektion und vor Beginn der Puromycinselektion untersucht. Des Weiteren wird geprüft, wie sich die Markerproteinexpression und die Expression des B18R-Zielproteins durch die Selektion mittels STACS im Vergleich zur Puromycin-selektierten Kultur unterscheiden. Außerdem wird anhand der GFP-positiven Zellen und der mittleren FI die Effizienz der jeweiligen STACS-Selektionen analysiert. Zusätzlich werden der Verlauf der GFP-positiven Zellen, der mittleren FI sowie der Viabilität der selektierten Kulturen über einen längeren Zeitraum betrachtet.

### 5.3.1 Analyse der Selektion und des Kulturverlaufs selektierter CHO-Zellen anhand der Expression des TST-flex-CD4tm-GFP-Markerproteins

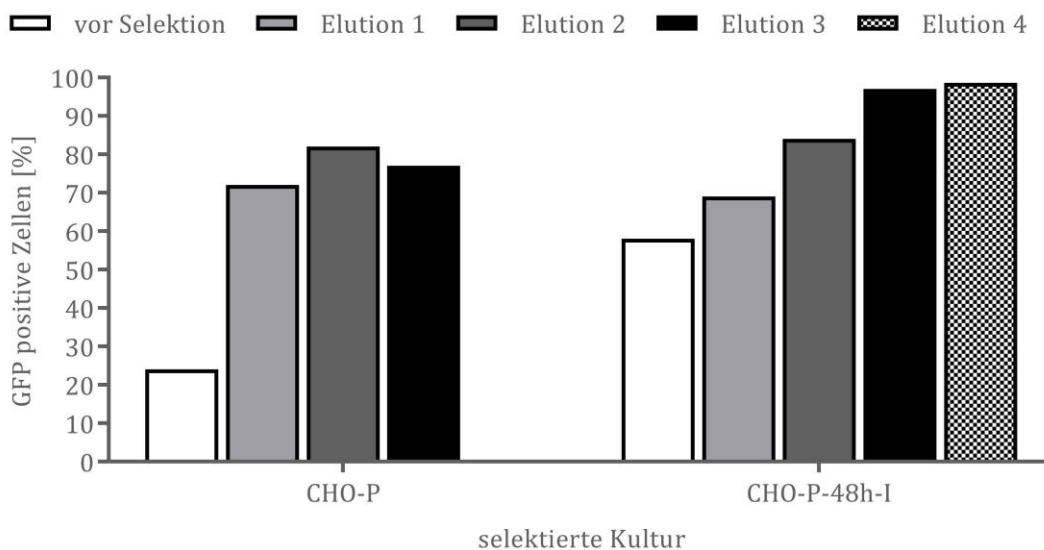
In diesem Experiment soll untersucht werden, ob durch die Verwendung der STACS-Methode CHO-Zellen aus einer stabil exprimierenden Kultur selektiert werden können, deren mittleres Expressionslevel über dem der ausschließlich mit Puromycin selektierten Kultur liegt. Damit könnte die STACS-Methode ähnlich der FACS-Methode mit anderen Selektionsmethoden kombiniert werden, um die Expression eines stabilen Zellpools zu erhöhen.

Für das Experiment wurden CHO-Zellen mit dem Plasmid pCDNA.3-EF1-TST-CD4tm-GFP-F2A-PuroR (Abbildung 4 bzw. Abbildung 72) nach der in Kapitel 5.1.1 entwickelten Transfektionsmethode transfiziert (Kulturname: CHO-P). Das Plasmid stammte von der Arbeitsgruppe Dr. Gossen des Berlin-Brandenburger Zentrums für Regenerative Therapien und wurde im Rahmen eines gemeinsamen KMU-Projektes entwickelt. Als POI exprimieren transfizierte Zellen B18R, dessen Expression von einem EF1 $\alpha$ -Promotor kontrolliert wird. Die Expression der Markergen-kassette wird durch einen PGK-Promotor kontrolliert. Durch die Markergen-kassette werden zwei Markerproteine exprimiert. Das erste Markerprotein ist ein TST-flex-CD4tm-GFP-Fusionsprotein. An dessen Expression wird mittels eines F2A-Elements die Expression eines Puromycin-Resistenzgens gekoppelt.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen zentrifugiert und in CHO-TF-Kulturmedium kultiviert, welches 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Puromycin enthielt. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein kompletter Austausch des Mediums mit frischem CHO-TF-Kulturmedium und 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Puromycin. Dabei wurde die Zellkonzentration immer auf  $6 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt (CHO-P). Parallel zum Beginn der Selektion der Zellen mit Puromycin wurde ein Teil der transfizierten Kultur zwei Tage nach der Transfektion mit der STACS-Methode selektiert. Einen weiteren Tag nach der STACS Selektion wurden die Zellen wie oben beschrieben ebenfalls in CHO-TF-Kulturmedium mit 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Puromycin kultiviert (Kulturname: CHO-P-48h-I). 22 Tage nach der STACS-Selektion wurde die Kultur CHO-P-48h-I in CHO-TF-Kulturmedium ohne Puromycin eingesät und fortan in Abwesenheit von Puromycin alle drei bis vier Tage subkultiviert. Gleichzeitig (22-Tage nach der ersten STACS-Selektion) wurde ein Teil der Kultur CHO-P-48h-I erneut mittels STACS selektiert. Zellen der

Elutionsfraktionen drei und vier wurden vereinigt und ebenfalls in Abwesenheit von Puromycin alle drei bis vier Tage in CHO-TF-Kulturmedium subkultiviert (Kulturname: CHO-P-48h-II). Eine detaillierte Aufstellung der STACS-Selektionsbedingungen findet sich in 7.2. Der Kulturverlauf sowie das Ergebnis der Selektionen wurden mit Hilfe eines CytoFLEX-Durchflusszytometers analysiert.

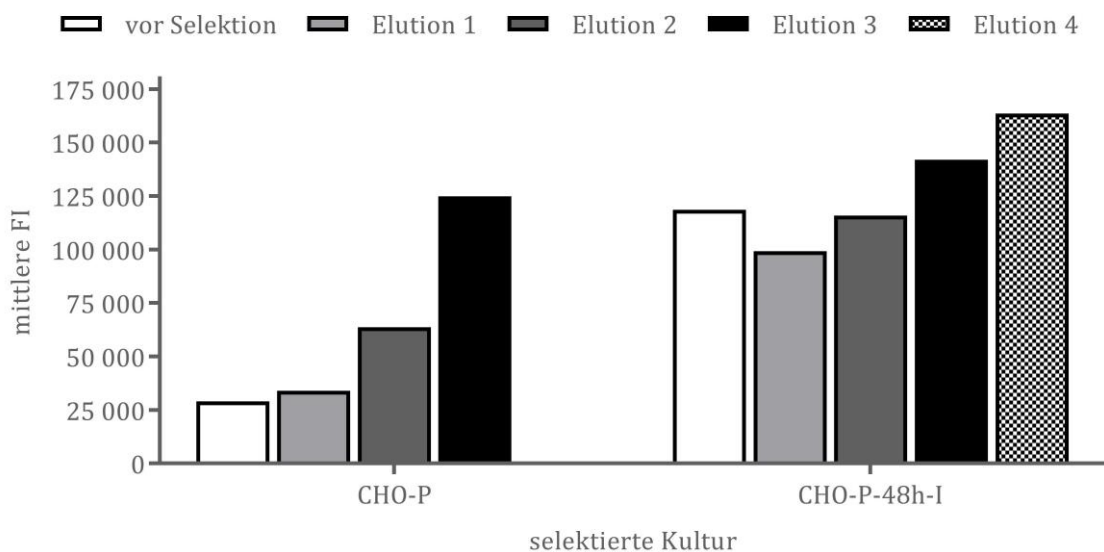
Zunächst werden die in diesem Experiment durchgeführten STACS-Selektionen betrachtet. Durch die Verwendung der STACS-Methode wird der Anteil an GFP-positiven Zellen in allen Elutionsfraktionen im Vergleich zur Ausgangspopulation erhöht (Abbildung 19). Im Falle der Selektion der CHO-P Kultur erhöht sich der Anteil GFP-positiver Zellen von 24 % vor der Selektion auf 72–82 % in den Elutionsfraktionen. Aufgrund der Vorselektion mit Puromycin ist der Anteil GFP-positiver Zellen bei der Selektion aus CHO-P-48h-I in der Ausgangskultur höher (58 %). Im Zuge der Selektion wird der Anteil GFP-positiver Zellen mit steigender Elutionsfraktion immer weiter bis auf über 99 % erhöht.



**Abbildung 19:** Anreicherung von TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP-positiven CHO-Zellen in Elution 1 bis Elution 4 mittels der STACS-Methode aus der jeweiligen Ausgangskultur. CHO-P wurde zwei Tage nach der Transfektion selektiert, bevor die Zugabe von Puromycin erfolgte. Aus der Selektion entstand CHO-P-48h-I, welche 22 Tage später erneut selektiert wurde.

Auch die mittlere FI als Maß für die Markergenexpression wird durch die Anwendung von STACS in den eluierten Populationen erhöht (Abbildung 20). Dabei

korreliert ein Anstieg der mittleren FI mit der Elutionsfraktion. Zellen, die später eluieren, weisen entsprechend der Arbeitshypothese in Kapitel 3 eine höhere Markerexpression und somit eine höhere FI auf als Zellen früherer Elutionsfraktionen. Im Vergleich zur Ausgangskultur ist die mittlere FI in Elution 3 bei der Selektion von CHO-P 4,3-mal höher. Bei der Selektion von CHO-P-48h-I ist die FI in Elution 4 im Vergleich zur Ausgangspopulation um den Faktor 1,4 erhöht. Erwartungsgemäß ist die FI in den Elutionsfraktionen höher, wenn die FI der Ausgangsfraktion hoch ist. Zwischen den beiden dritten Elutionen ist dieser Unterschied aber nur noch gering.

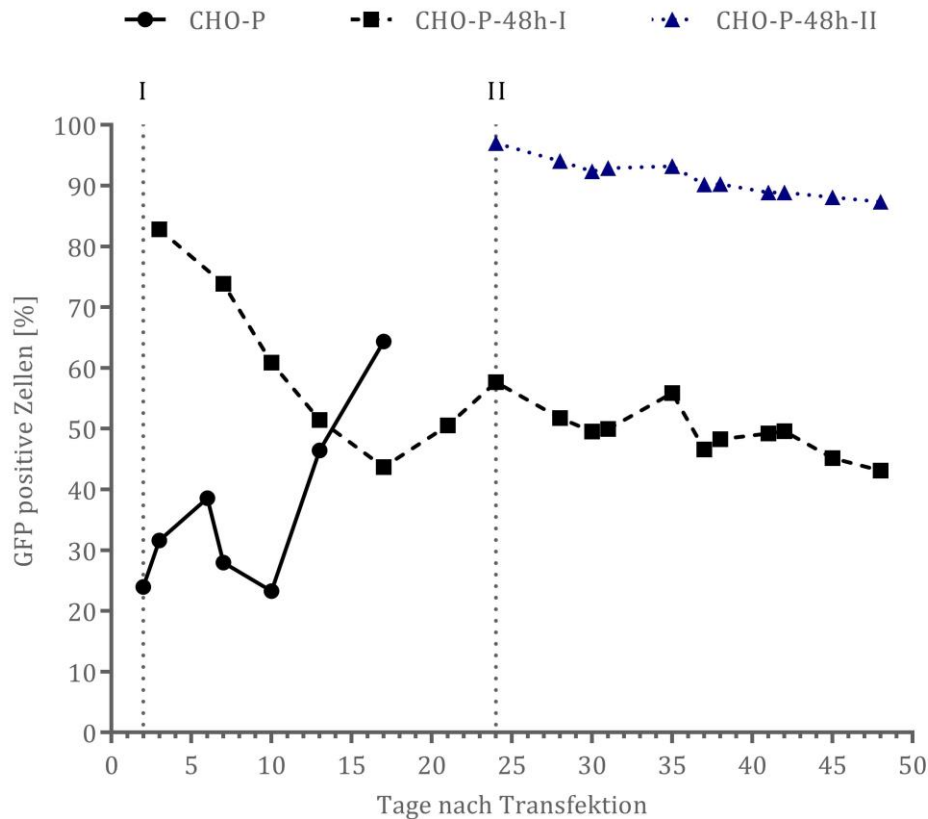


**Abbildung 20:** Mittlere Fluoreszenzintensität (FI) der mittels STACS selektierten TST-flex-CD4tm-GFP-positiven CHO-Zellen in Elution 1 bis Elution 4 sowie der jeweiligen Ausgangskultur. CHO-P wurde zwei Tage nach der Transfektion selektiert, bevor die Zugabe von Puromycin erfolgte. Aus der Selektion entstand CHO-P-48h-I, welche 22 Tage später erneut selektiert wurde.

Neben dem unmittelbaren Einfluss der STACS-Selektion auf die Anreicherung von hochproduzierenden Zellen ist vor allem die Frage nach der Stabilität der Expression der selektierten Kulturen von Bedeutung. Das Ergebnis in Abbildung 21 zeigt, dass sowohl die vor allem durch Puromycin selektierte Kultur CHO-P-48h-I als auch die noch einmal mit STACS selektierte Kultur CHO-P-48h-II einen stabilen Anteil GFP-positiver Zellen enthalten. In beiden Kulturen verringert sich der Anteil der GFP-positiven Zellen während der Kultivierung ohne Puromycin nur geringfügig. Während der Kultivierung von CHO-P-48h-II sinkt der Anteil GFP-positiver Zellen

um 7 Prozentpunkte (Tag 28 bis Tag 48). Im gleichen Zeitraum verringert sich der Wert in der Kultur CHO-P-48h-I um 9 Prozentpunkte. Aufgrund der zweiten STACS-Selektion wird allerdings der Anteil der positiven Zellen in der Kultur erhöht. Nach einer 24-tägigen Kultivierung ohne Puromycin ist der Anteil GFP-positiver Zellen in der STACS-Kultur CHO-P-48h-II zweimal höher (87 %) als in der Kultur CHO-P-48h-I.

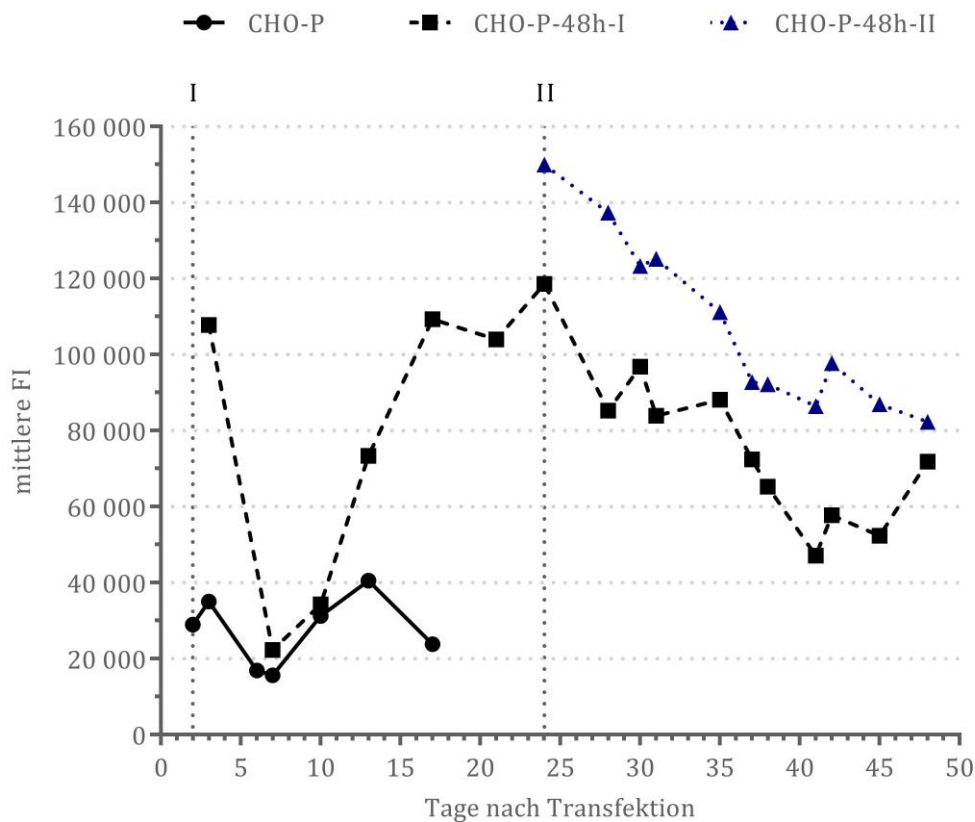
Zwar wurde auch CHO-P-48h-I mittels STACS selektiert, allerdings geschah dies noch während der transienten Expressionsphase der Kultur, weshalb der Anteil GFP-positiver Zellen auch innerhalb der ersten 17 Tage von über 80 % auf über 40 % sinkt. Die Kultivierung von CHO-P musste nach 17 Tagen abgebrochen werden, da sich die Viabilität der Kultur während der Selektion mit Puromycin ständig verringerte und nach 17 Tagen lediglich 21 % betrug. Dagegen wies die mittels STACS zwei Tage nach der Transfektion selektierte Kultur CHO-P-48h-I während der Selektion mit Puromycin eine höhere Viabilität von mindestens 63 % auf (Abbildung 23).



**Abbildung 21:** Verlauf der kultivierten TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP-positiven CHO-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (CHO-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-P-48h-I und CHO-P-48h-II). Der Zeitpunkt der Selektion wird durch gepunktete Linien markiert. Ein Teil von CHO-P wurde zwei Tage nach der Transfektion, vor Zugabe von Puromycin, mittels STACS selektiert, wodurch CHO-P-48h-I entstand. CHO-P-48h-II wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-P-48h-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 24. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

Eine der Puromycinselektion nachfolgende STACS-Selektion erhöht neben dem Anteil der GFP-positiven Zellen auch die Expression des Markerproteins über die Dauer des betrachteten Kultivierungszeitraums (Abbildung 22). Das Expressionslevel ist in den Kulturen aber nicht stabil. Im von der transienten Expression geprägten Verlauf der Kultivierung von CHO-P-48h-I sinkt die mittlere FI erwartungsgemäß zunächst von 107.807 auf 22.306 an Tag 7 und steigt anschließend wieder auf das Anfangsniveau. Nach Beginn der Kultivierung in puromycinfreiem Medium sinkt die FI in CHO-P-48h-I um den Faktor 2,3, wobei es am letzten Tag der Aufzeichnung noch einmal zu einem Anstieg der FI kommt. In der Kultur CHO-P-48h-II verringert sich die Expression des Markers während der 24-tägigen Kultivierung in

puromycinfreiem Medium um den Faktor 1,8. Sie liegt aber die ganze Zeit über dem Expressionslevel von CHO-P-48h-I.

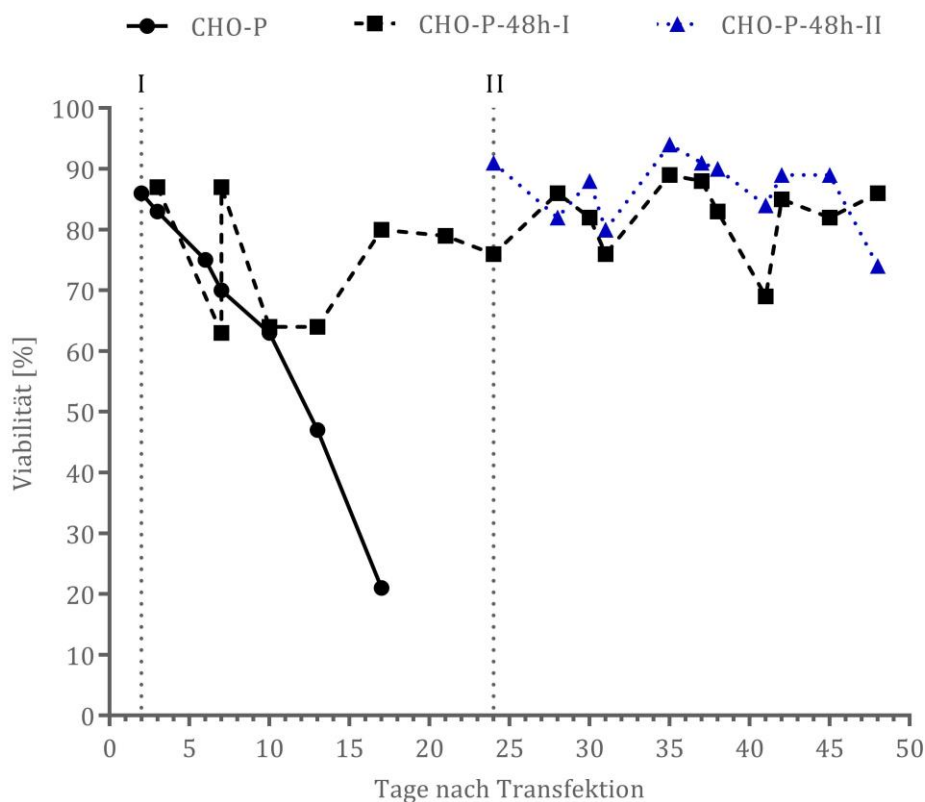


**Abbildung 22:** Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität (FI) der kultivierten TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP-positiven CHO-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (CHO-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-P-48h-I und CHO-P-48h-II). Der Zeitpunkt der Selektion wird durch gepunktete Linien markiert. Ein Teil von CHO-P wurde zwei Tage nach der Transfektion, vor der Zugabe von Puromycin, mittels STACS selektiert, wodurch CHO-P-48h-I entstand. CHO-P-48h-II wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-P-48h-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 24. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

Beim Verlauf der Viabilität der Kulturen fällt auf, dass die nur mit Puromycin selektierte Kultur CHO-P kontinuierlich an Viabilität verliert, bis diese nach 17 Tagen lediglich 21 % beträgt (Abbildung 23). In der Kultur CHO-P-48h-I ist die Viabilität dagegen mit einem Minimum von 63 % wesentlich höher. Nach 13 Tagen steigt die Viabilität wieder und schwankt danach zwischen 69 % und 89 %. Die zunächst verringerte Viabilität sowie deren späterer Anstieg ist zu erwarten, da während der



Phase der transienten Expression nicht stabile Zellen die Puromycinresistenz verlieren und sterben. Erkennbar ist der transiente Verlauf auch an der sinkenden FI (Abbildung 22) und dem sich verringern den Anteil GFP-positiver Zellen (Abbildung 21) in den ersten Tagen der Kultivierung. Gegen Ende der transienten Phase erhöht sich der Anteil stabiler Zellen in der Kultur, wodurch sich die FI und der Anteil GFP-positiver Zellen sowie die Viabilität wieder erhöhen. Im Fall der Kultur CHO-P-48h-II verläuft die Viabilität ähnlich wie in der Kultur CHO-P-48h-I. Somit beeinträchtigt die STACS-Selektion der Kultur CHO-P-48h-I die Viabilität der selektierten Population nicht.



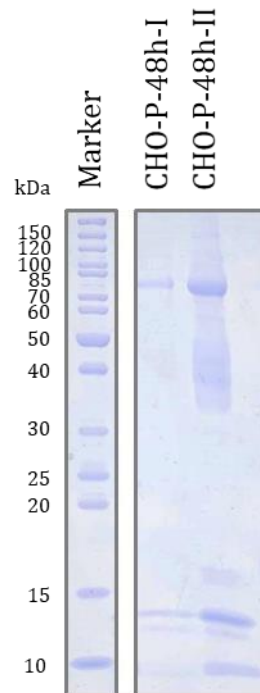
**Abbildung 23:** Verlauf der Viabilität der Kulturen, die ausschließlich mit Puromycin (CHO-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-P-48h-I und CHO-P-48h-II). Der Zeitpunkt der Selektion wird durch gepunktete Linien markiert. Ein Teil von CHO-P wurde zwei Tage nach der Transfektion, vor der Zugabe von Puromycin, mittels STACS selektiert, wodurch CHO-P-48h-I entstand. CHO-P-48h-II wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-P-48h-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 24. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich durch die Verwendung von STACS sowohl der Anteil von markergenexprimierenden Zellen als auch das Expressionslevel der Kultur erhöhen lässt. Außerdem hat die STACS-Selektion einen positiven Einfluss auf die Viabilität einer nachfolgenden Puromycinselektion.

### 5.3.2 Bestimmung der B18R-Expression in den selektierten CHO-Kulturen

Neben der Markergenexpression soll auch die Expression des Zielproteins B18R in den selektierten Kulturen verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden 31 Tage nach der Transfektion Zellen der Kulturen CHO-P-48h-I und CHO-P-48h-II zentrifugiert und die Pellets in frisches CHO-TF-Medium mit einer Zelldichte von  $6 \times 10^5$  Zellen/ml eingesät. Die Zellen wurden vier Tage bei 37 °C, 300 rpm (10 mm Hub) und 5 % CO<sub>2</sub> in 50 ml TubeSpin® Bioreaktoren kultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände, wie in Kapitel 4.8 beschrieben, aufgearbeitet und in einem SDS-PAGE-Gel analysiert (Abbildung 24).

Aus dem Coomassiegel lässt sich erkennen, dass die Elutionsfraktion der Kultur CHO-P-48h-II wesentlich mehr Protein enthält als die der Kultur CHO-P-48h-I. Bei B18R ist eine Bande bei einer Proteingröße zwischen 45 kDa und 65 kDa zu erwarten, wenn das Protein in HEK293-Zellen produziert wird (vgl. #14-8185-6, Thermo Fisher Scientific und #B1R-H52H6, AcroBiosystems). Das theoretische Molekulargewicht des TST-Fusionsproteins beträgt 42 kDa. Aus der Reinigung der Kultur CHO-P-48h-II konnte eine diffuse Bande zwischen 30 und 50 kDa detektiert werden. Im Gel sind jedoch weitere Banden mit einem geringeren Molekulargewicht zu erkennen. Hierbei kann es sich entweder um Verunreinigungen oder Abbauprodukte des Proteins handeln. Außerdem gibt es eine prominente Bande zwischen 75 kDa und 85 kDa.



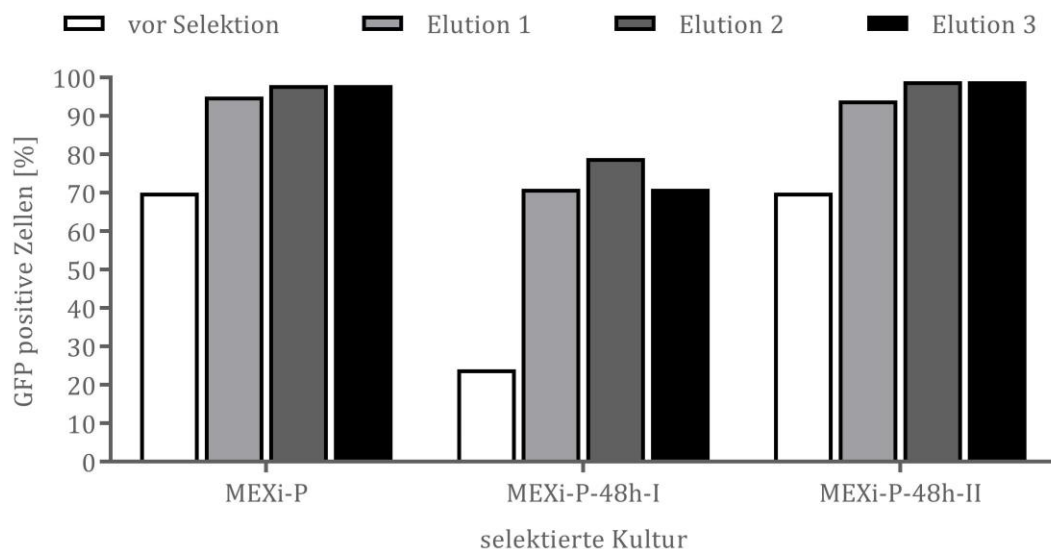
**Abbildung 24:** SDS-PAGE-Coomassiegelelutionen der B18R exprimierenden Kulturen CHO-P-48h-I und CHO-P-48h-II. Außerdem ist ein auf dem Gel aufgetragener Proteinmarker abgebildet.

### 5.3.3 Analyse der Selektion und des Kulturverlaufs B18R-exprimierender, selektierter MEXi-Zellen anhand der Expression des TST-flex-CD4tm-GFP-Markerproteins

Ein Ziel dieser Arbeit ist, die hier entwickelte STACS-Methode auch für die Selektion von HEK293-Zellen zu nutzen. Aus diesem Grund wird das Experiment, welches im Kapitel 5.3.1 beschrieben wird, mit MEXi-293E-Zellen durchgeführt. Dazu wurden MEXi-293E Zellen mit dem Plasmid pCDNA.3-EF1-TST-CD4tm-GFP-F2A-PuroR (Abbildung 4 bzw. Abbildung 72) entsprechend Kapitel 4.4 transfiziert (Kulturname: MEXi-P). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen zentrifugiert und in MEXi-CM-Kulturmedium kultiviert, welches 1,7 µg/ml Puromycin enthielt. Danach wurde alle drei bis vier Tage ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt, bei dem die Zellkonzentration auf  $6 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt wurde und das verwendete Kulturmedium 1 µg/ml Puromycin enthielt (MEXi-P). Wie bei der CHO-Kultur in Kapitel 5.3.1 wurde auch ein Teil der MEXi-P-Kultur zwei Tage nach der Transfektion und vor der Zugabe von Puromycin mittels STACS selektiert, die Elutionen 2 und 3

vereinigt und zwei Tage später in Kulturmedium mit 1 µg/ml Puromycin kultiviert. Danach wurden die Zellen alle drei bis vier Tage in Medium mit 1 µg/ml Puromycin kultiviert (Kulturname: MEXi-P-48h-I). 21 Tage nach der Transfektion wurde ein Teil der Kultur MEXi-P-48h-I erneut mittels STACS selektiert, die Elutionen 2 und 3 vereinigt und ohne Puromycin kultiviert (Kulturname: MEXi-P-48h-II). Der andere Teil der Kultur MEXi-P-48h-I wurde ebenfalls ohne Puromycin weiter kultiviert. Abschließend erfolgte 39 Tage nach der Transfektion eine STACS-Selektion eines Teils der Kultur MEXi-P-48h-II, nach der die Elution 3 weiter kultiviert wurde (Kulturname: MEXi-P-48h-III). Eine detaillierte Aufstellung der STACS-Selektionsbedingungen findet sich in 7.2. Der Kulturverlauf sowie das Ergebnis der Selektionen wurden mit Hilfe eines CytoFLEX-Durchflusszytometers analysiert.

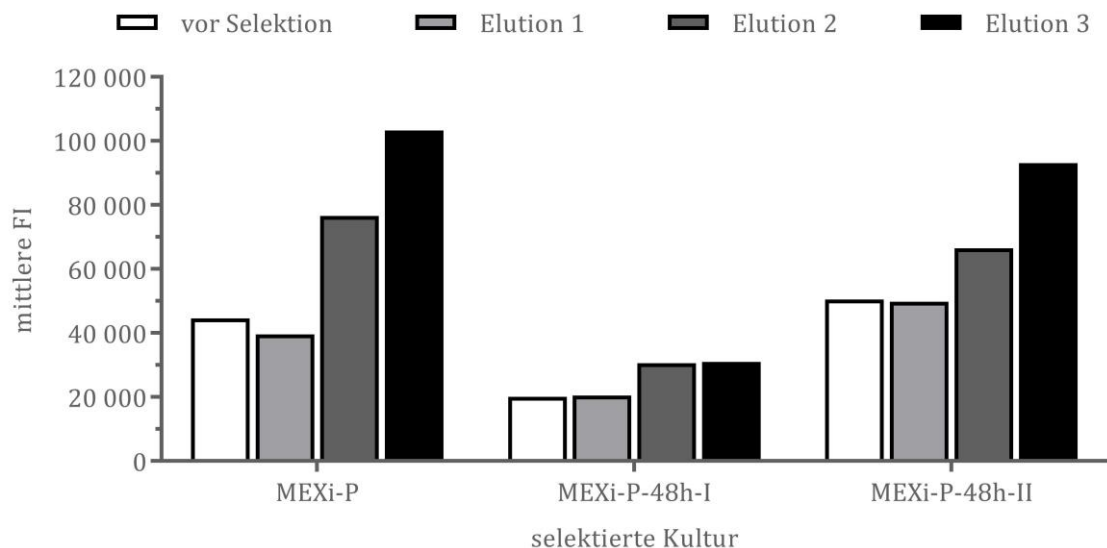
Eine Selektion der verschiedenen MEXi-293E-Kulturen führt, wie schon zuvor die Selektion der CHO-Kulturen, zu einer Anreicherung von Zellen, die die Markergenkassette exprimieren (Abbildung 25). Dabei beträgt der Anteil der positiven Zellen über 95 %, wenn die Ausgangspopulation einen Anteil von 70 % positiven Zellen aufweist. Fällt der Anteil positiver Zellen in der Ausgangspopulation geringer aus (24 %), so wird eine Anreicherung auf bis zu 79 % erreicht.



**Abbildung 25:** Anreicherung von TST-flex-CD4tm-GFP-positiven MEXi-293E-Zellen in Elution 1 bis Elution 3 mittels der STACS-Methode aus der jeweiligen Ausgangskultur. MEXi-P wurde zwei Tage nach der Transfektion selektiert, bevor die Zugabe von Puromycin erfolgte. Aus der Selektion entstand MEXi-P-48h-I, welche

(Fortsetzung Abbildung 25) 21 Tage nach der Transfektion ebenfalls selektiert wurde, wodurch MEXi-P-48h-II entstand. 39 Tage nach der Transfektion wurde MEXi-P-48h-II selektiert.

Wie zu erwarten, steigt durch die STACS-Selektion der MEXi-293E-Zellen die mittlere FI bzw. die TST-flex-CD4tm-GFP-Expression in den selektierten Populationen mit steigender Elutionszahl (Abbildung 26). Während die mittlere FI in der ersten Elution vergleichbar mit der Ausgangskultur ist, steigt die FI in den darauffolgenden Fraktionen deutlich. In der dritten Fraktion ist die mittlere FI 2,3-fach (MEXi-P), 1,5-fach (MEXi-P-48h-I) und 1,8-fach (MEXi-P-48h-II) höher als in der jeweiligen Ausgangspopulation. Eine höhere FI in der Ausgangspopulation führt, wie bei CHO-Kulturen, zu einer höheren FI in den Elutionsfraktionen.

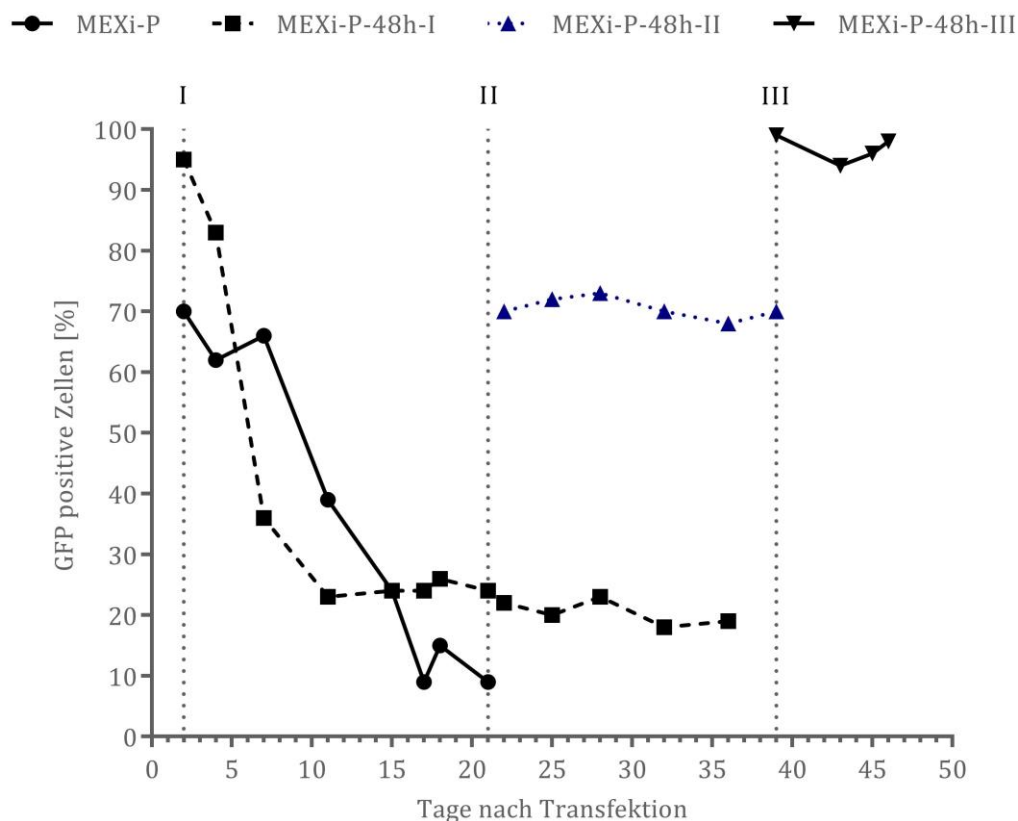


**Abbildung 26:** Mittlere Fluoreszenz (FI) der mittels STACS selektierten TST-flex-CD4tm-GFP-positiven MEXi-293E-Zellen in Elution 1 bis Elution 3 sowie der jeweiligen Ausgangskultur. MEXi-P wurde zwei Tage nach der Transfektion selektiert, bevor die Zugabe von Puromycin erfolgte. Aus der Selektion entstand MEXi-P-48h-I, welche 21 Tage nach der Transfektion ebenfalls selektiert wurde, wodurch MEXi-P-48h-II entstand. 39 Tage nach der Transfektion wurde MEXi-P-48h-II selektiert.

Abgesehen von dem unmittelbar nach der Selektion erhöhten Anteil TST-flex-CD4tm-GFP-positiver Zellen, führen STACS-Selektionen von MEXi-293E-Zellen auch im weiteren Kulturverlauf zu einem höheren Anteil positiver Zellen (Abbildung 27). Während die Kultur MEXi-P-48h-I einen Anteil positiver Zellen im Bereich von

18–26 % aufweist, ist der Anteil bei MEXi-P-48h-II dreimal höher (68–73 %). Eine weitere STACS-Selektion erhöht den Anteil der positiven Zellen auf  $\geq 94$  % (MEXi-P-48h-III). Wird keine STACS-Selektion vorgenommen, können lediglich 9 % positive Zellen am Ende der Kultivierung detektiert werden (MEXi-P).

Sowohl bei MEXi-P-48h-I als auch bei MEXi-P-48h-II bleibt der Anteil positiver Zellen während der Kultivierung ohne Puromycin konstant. MEXi-P-48h-III-Zellen werden für eine Woche kultiviert und verlieren in dieser Zeit ebenfalls keine positiven Zellen in der Kultur. Während der Kultivierung mit Puromycin in der transienten Expressionsphase bleibt der Anteil positiver Zellen in MEXi-P bis Tag 7 konstant, fällt dann aber wie auch in der Kultur MEXi-P-48h-I rapide. Während sich in der Kultur MEXi-P-48h-I an Tag 11 ein stabiler Anteil positiver Zellen einstellt, fällt der Anteil positiver Zellen in der Kultur MEXi-P weiterhin, wenn auch nur noch in geringem Maße.



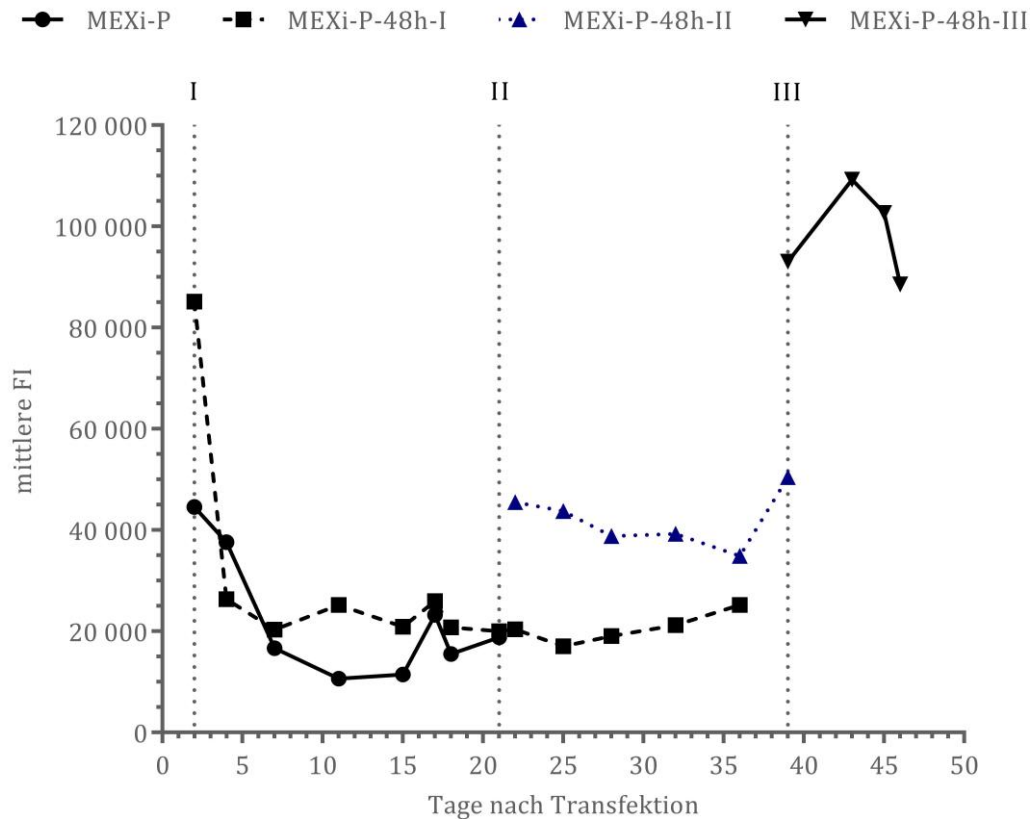
**Abbildung 27:** Verlauf der kultivierten TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP-positiven MEXi-293E-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (MEXi-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (MEXi-P-48h-I, MEXi-P-48h-II und

(Fortsetzung Abbildung 27) MEXi-P-48h-III). Der Zeitpunkt der Selektion wird durch gepunktete Linien markiert. MEXi-P-48h-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P zwei Tage nach der Transfektion generiert. MEXi-P-48h-II wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P-48h-I generiert. MEXi-P-48h-III wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P-48h-II erhalten. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

Neben der Anreicherung der positiven Zellen erlaubt die Verwendung der STACS-Methode die Gewinnung von Kulturen mit einer über die Kultivierungsdauer deutlich erhöhten Expression des Markers TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP (Abbildung 28). So ist die mittlere FI der Kultur MEXi-P-48h-II im Zeitraum der puromycinfreien Kultivierung im Mittel zweimal höher als die FI von MEXi-P-48h-I. Die letzte STACS-Selektion erhöht die im weiteren Kulturverlauf gemessene FI sogar um den Faktor 4,8 im Vergleich zu MEXi-P-48h-I. Folglich können konsekutive Selektionen mittels STACS zu einer seriellen Erhöhung des Expressionslevels der Kultur verwendet werden.

Interessant ist, dass eine dritte STACS-Selektion, bezogen auf die FI, zu einer stärkeren Erhöhung der Expression führt als die zweite STACS-Selektion. So beträgt der Unterschied der mittleren FI zwischen MEXi-P-48h-II und MEXi-P-48h-III 56.290 Einheiten, der zwischen MEXi-P-48h-I und MEXi-P-48h-II jedoch nur 21.514 Einheiten. Der relative Unterschied der FI nach Selektion zwischen MEXi-P-48h-I und MEXi-P-48h-II sowie zwischen MEXi-P-48h-II und MEXi-P-48h-III fällt dagegen ähnlich aus (Faktor 2,0 bzw. 2,3).

Die Expression von MEXi-P und MEXi-P-48h-I sind ab Tag 7 stabil. Ebenso zeigt MEXi-P-48h-II, mit Ausnahme der letzten Messung, einen stabilen Expressionsverlauf. MEXi-P-48h-III weist erst einen Anstieg der FI auf, die dann auf das Niveau nach der Selektion zurückfällt.

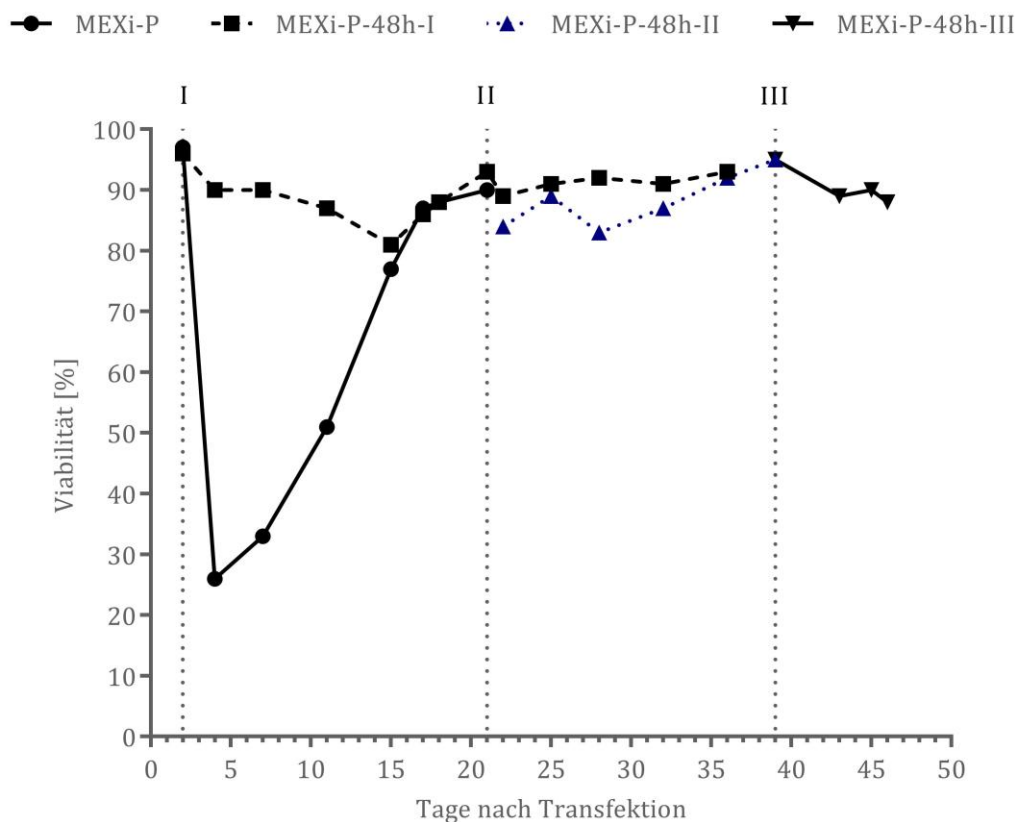


**Abbildung 28:** Verlauf der mittlere Fluoreszenzintensität (FI) der kultivierten TST-flex-CD4<sup>tm</sup>-GFP-positiven MEXi-293E-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (MEXi-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (MEXi-P-48h-I, MEXi-P-48h-II und MEXi-P-48h-III). Der Zeitpunkt der Selektion wird durch gepunktete Linien markiert. MEXi-P-48h-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P zwei Tage nach der Selektion generiert. MEXi-P-48h-II wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P-48h-I generiert. MEXi-P-48h-III wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P-48h-II erhalten. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

Der Verlauf der Viabilität der MEXi-293E-Kulturen zeigt, dass die Vorselektion mit der STACS-Methode ebenfalls die Viabilität der Kultur während der Puromycinselektion erhöht (Abbildung 29). Während die Viabilität der nicht vorselektierten Kultur MEXi-P innerhalb der ersten sieben Tage auf bis zu 26 % sinkt, fällt die Viabilität in der Kultur MEXi-P-48h-I nur auf minimal 81 %. In beiden Kulturen steigt die Viabilität nach dem Ende der transienten Expressionsphase, welche durch eine Stabilisierung der GFP-positiven Zellen (Abbildung 27) und der FI (Abbildung 28) in den Kulturen gekennzeichnet ist.



Auch bei den hier kultivierten und selektierten MEXi-293E-Zellen lässt sich anhand der Viabilität allenfalls nur ein geringfügiger Stress der STACS-Selektion auf die Zellen erkennen. Der Verlauf der Viabilität der Kultur MEXi-P-48h-I liegt während der Kultivierung ohne Puromycin oberhalb von 90 %. Im Falle der Kultur MEXi-P-48h-II schwankt die Viabilität zunächst zwischen 83 % und 89 %, bevor sie kontinuierlich auf 95 % ansteigt. In der Kultur MEXi-P-48h-III sinkt die Viabilität nach der Selektion von 95 % auf 88 %. Ein deutlich negativer Einfluss der STACS-Selektion auf die Viabilität ist somit nicht festzustellen.



**Abbildung 29:** Verlauf der Viabilität kultivierten MEXi-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (MEXi-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (MEXi-P-48h-I, MEXi-P-48h-II und MEXi-P-48h-III). Der Zeitpunkt der Selektion wird durch gepunktete Linie markiert. MEXi-P-48h-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P zwei Tage nach der Selektion generiert. MEXi-P-48h-II wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P-48h-I generiert. MEXi-P-48h-III wurde durch STACS-Selektion der Kultur MEXi-P-48h-II erhalten. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

Die in Kapitel 5.3.3 dargestellten Ergebnisse belegen, dass sich auch HEK293-Zellen mittels der STACS-Methode selektieren lassen und sich dadurch sowohl der Anteil an Zielzellen als auch das Expressionslevel der selektierten Kulturen dauerhaft erhöhen lässt.

### 5.3.4 Zusammenfassung und Diskussion zur Generierung stabiler hochexprimierender Zellen mittels STACS und Vergleich mit antibiotikabasierter Selektion

Mit den im Kapitel 5.3 beschriebenen Experimenten sollte untersucht werden, ob die Verwendung der STACS-Methode dazu führt, dass sowohl der Anteil an Zielzellen als auch die Expression der eingebrachten Gene in den selektierten Populationen erhöht werden. Die Experimente dienen somit einer Machbarkeitsanalyse, bevor die Methode im weiteren Verlauf der Arbeit optimiert und genauer untersucht wird. Vor allem soll analysiert werden, ob die STACS-Selektion einen Vorteil zu einer alleinigen Puromycinselektion bietet.

Tatsächlich kann durch die Ergebnisse ein klarer Vorteil der STACS-Methode belegt werden. So führt die Anwendung der Methode bei MEXi-293E und CHO-Zellen zu einer Anreicherung von Zellen, die das Markergen exprimieren. Auch das Expressionslevel des Markergens kann im Vergleich zu den Puromycin-Referenzkulturen deutlich erhöht werden, wenn diese in ihrer stabilen Phase noch einmal mittels STACS selektiert werden. Sowohl der höhere Anteil positiver Zellen als auch das höhere Expressionslevel nach STACS-Selektion bleiben über einen längeren Verlauf der Kultivierung beider Zelllinien (MEXi-293E und CHO) erhalten. Damit lässt sich STACS als eine Optimierung einer antibiotikabasierten Selektion verwenden.

Darüber hinaus kann eine STACS-Selektion das Resultat des Weiteren antibiotikabasierten Selektionsprozesses verbessern, wenn bereits 48 Stunden nach der Transfektion eine STACS-Selektion durchgeführt wird. So fällt auf, dass CHO-Zellen, die nicht nach zwei Tagen mittels STACS selektiert wurden, die Puromycinselektion nicht überleben, wohingegen die Viabilität der STACS-vorselektierten Zellen nicht unter 60 % fällt. Auch bei den MEXi-293E-Zellen ist die Viabilität und sogar das Zellwachstum (Daten nicht gezeigt) während der Puromycinselektion der STACS-vorselektierten Kultur deutlich höher als in der direkt mit Puromycin selektierten Kultur.

Der Grund für die höhere Viabilität der STACS-vorselektierten CHO-Kultur könnte auf die Anreicherung der positiven Zellen zurückzuführen sein. Da sich in der CHO-P Kultur nur 24 % GFP-positive Zellen befinden, werden bei einer erfolgreichen Puromycinselektion bereits 76 % der Zellen in der Kultur abgetötet, wodurch die Viabilität drastisch fällt. Außerdem ist nur ein kleiner Anteil der positiven Zellen stabil, wodurch der Anteil der toten Zellen in der CHO-P-Kultur noch steigt. Aufgrund der STACS-Vorselektion wird der Anteil der positiven und somit resistenten Zellen in der Kultur CHO-P-48h-I auf über 80 % erhöht. Folglich ist der Anteil der im Zuge der Selektion sterbenden Zellen fast ausschließlich auf den Teil der nicht stabil exprimierenden Zellen begrenzt. Weil positive Zellen erst die transiente Expression einstellen müssen, bevor sie in Folge der Puromycinselektion sterben, sinkt die Viabilität zudem langsamer als bei einer Kultur, die nach der Transfektion viele nicht transfizierte Zellen enthält.

Bei den MEXi-293E-Zellen lässt sich die höhere Viabilität der STACS-vorselektierten Kultur nicht eindeutig auf die STACS-Selektion zurückführen, da die Kultur MEXi-P zuerst bei einer höheren Puromycinkonzentration von 1,7 µg/ml statt 1 µg/ml selektiert wurde. Der hohe Anteil an nicht GFP-positiven Zellen am Ende der Selektion von MEXi-P und MEXi-P-48h-I zeigt, dass die Selektion mit 1 µg/ml nicht ausreicht, um nicht produzierende Zellen effektiv aus der Kultur zu entfernen. Somit könnte der geringere Selektionsdruck bei MEXi-P-48h-II in den ersten Tagen der Grund für die höher Viabilität der Kultur sein. Tatsächlich wurde bei der MEXi-P-48h-I Kultur bereits ab dem vierten Tag nach der Transfektion eine Verdopplungszeit von 29 Stunden gemessen, wogegen in der Kultur MEXi-P kein Nettowachstum der Kultur stattfand (Daten nicht gezeigt). Da eine Antibiotikaselektion bei hohen Zelldichten weniger stark wirkt, ist der Selektionsstress für die MEXi-P-48h-I Kultur zusätzlich vermindert.

Interessanterweise führt eine STACS-Vorselektion auch dazu, dass offenbar hochproduzierende stabile Zellen angereichert werden, obwohl die erste Selektion in einer transienten Expressionsphase erfolgte. Während in der Kultur CHO-P die mittlere FI während der Puromycinselektion in einem niedrigen Bereich bleibt (20.000–40.000), steigt sie bei CHO-P-48h-I auf über 100.000. Dies lässt den Rückschluss zu, dass sich im Zuge der STACS-Vorselektion unter den selektierten stabilen

Zellen vor allem Hochproduzenten befinden, die am Ende der Selektion in der Kultur verbleiben und so den größten Anteil der stabilen GFP-positiven Zellen darstellen. Tatsächlich liegt die jeweilige mittlere FI der Kulturen CHO-P und CHO-P-48h-I gegen Ende der Puromycinselektion auf einem vergleichbaren Niveau wie vor Beginn der Puromycinselektion.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Zellen nach der STACS-Selektion unter anderem eine höhere FI aufweisen, weil sie eine höhere Anzahl an Plasmiden aufgenommen haben und so eine höhere, zunächst transiente Expression aufweisen. Da die Integration in die chromosomale DNA zufällig geschieht, würde mit einer höheren Plasmidzahl theoretisch auch die Wahrscheinlichkeit steigen, dass die Genkassette aus den Plasmiden stabil in das Zellgenom integriert wird. Dies würde dann sowohl den Anteil an stabilen als auch an hochproduzierenden Zellen erhöhen. Folglich würden sich am Ende einer Antibiotikaselektion mehr hochproduzierende Zellen in der Kultur befinden. Dadurch würden auch weniger Zellen während der Antibiotikaselektion sterben, wodurch auch die höhere Viabilität der STACS-vorselektierten CHO-Kultur erklärt werden könnte.

Allerdings wirft dies die Frage auf, weshalb ein vergleichbarer Effekt hinsichtlich der Expressionsstärke nicht bei MEXi-293E Zellen auftritt. Bei den CHO-Zellen fällt die geringe Transfektionseffizienz zu Beginn der Selektion auf. Dagegen ist die Transfektionseffizienz bei MEXi-Zellen mit 70 % GFP-positiven Zellen und einer höheren mittleren FI vor der Selektion deutlich größer. Dadurch ist der Unterschied zwischen der STACS-vorselektierten Kultur zu der Referenzkultur geringer. Somit ist zu erwarten, dass die Vorselektion einen weniger starken Einfluss auf die STACS-selektierte Kultur im Vergleich zur Referenzkultur aufweist wie bei den CHO-Zellen. Folglich hätte die STACS-Vorselektion das Potenzial, die Effekte einer weniger effizienten Transfektion auszugleichen. Bei einer hohen Transfektionseffizienz fällt dieser Vorteil jedoch geringer aus.

Auffällig ist das deutlich sinkende Expressionslevel des Markergens in den CHO-Kulturen, nachdem die Kultivierung ohne Puromycin fortgesetzt wird. Bei den selektierten MEXi-293E-Zellen ist der quantitative Unterschied der Markerexpression vor und nach der Kultivierung mit Puromycin geringer. Allerdings ist das Expressionslevel der CHO-Zellen zu Beginn der Kultivierung ohne Puromycin deutlich höher.

Dass die Expression vermeintlich stabiler Zellen sinkt, nachdem der stetige Selektionsdruck durch ein Antibiotikum fehlt, ist in der Literatur beschrieben.<sup>26,72,90,100</sup> Weitere konsekutive STACS-Selektionen könnten die Expression der CHO-Kultur möglicherweise stabilisieren. Die Experimente mit MEXi-293E-Zellen zeigen immerhin, dass konsekutive STACS-Selektionen das Expressionslevel einer Kultur erhöhen und einen positiven Effekt haben. Inwieweit sich dieser Effekt auch auf die Expressionsstabilität der Zellen auswirkt, muss in weiteren Experimenten im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. Das Phänomen zeigt aber, dass ggf. mehrere STACS-Selektionen notwendig sind, um eine möglichst homogene Population von hochproduzierenden Zellen zu erhalten. Eine derartig konsekutive Selektionsstrategie ist auch aus dem Feld der FACS-Selektion bekannt<sup>21,26,112</sup> und wird bei der Herstellung stabiler Pools mittels MACS® eingesetzt.<sup>120</sup> Aufgrund der Heterogenität des Pools kann die Expression des POI bei zu vielen Selektionen aber wieder sinken, da die Kultur mit zunehmendem Alter an Expressionsstärke verliert.<sup>21</sup>

Anhand der Ergebnisse zeigt sich ein Nachteil der Antibiotikaselektion, welcher ebenfalls aus anderen Studien bekannt ist. Bei einer Antibiotikaselektion kann es zur Entstehung resistenter Zellen kommen, die zwar die Antibiotikaresistenz besitzen, aber die übrigen eingeschleusten Gene nicht exprimieren. Sowohl bei den CHO- als auch den MEXi-293E-Experimenten gibt es eine vergleichbare oder sogar überwiegende Population an Zellen, die keine GFP-Fluoreszenz mehr aufweist, aber dennoch die Selektion mit Puromycin überstanden hat.

Dass der Anteil der positiven Zellen am Ende der Puromycinselektion bei MEXi-293E-Zellen geringer ist als bei CHO-Zellen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Puromycin bei der Selektion von CHO-Zellen effizienter ist als bei HEK293-Zellen. Delrue et al. konnten beweisen, dass verschiedene Antibiotika bei verschiedenen Zellen unterschiedlich effektiv sind und dies vor allem mit dem Selektionsfaktor zusammenhängt.<sup>98</sup> Möglicherweise ist dieser bei Puromycin und CHO Zellen höher. Ein geringer Anteil an positiven HEK293-Zellen nach einer Puromycinselektion wird auch von Lanza et al. beschrieben.<sup>72</sup> Spidel et al. konnten ebenfalls bei HEK293-Zellen keine stabilen Zellen generieren und die Zellen zeigten ein vermindertes Wachstum, welches die Autoren auf eine hohe Sensitivität der HEK293-Zellen gegenüber

Puromycin zurückführen. Diese Beobachtung stützt das Prinzip von Delrue et al. und die Beobachtungen in dieser Arbeit.

Yeo et al. spekulieren, dass bei einer deutlichen Schwächung der Markerexpression resistente Zellen die Selektion überleben können oder die Aufnahme an Antibiotikum reduzieren, wie es bei MTX-Selektionen beobachtet wurde und so positive Zellen überwachsen.<sup>90</sup> Wie später in Kapitel 5.4.6 beschrieben wird, stellt der verwendete PGK-Promotor einen eher schwachen Promotor dar. Außerdem konnten Davies et al. feststellen, dass die Verwendung eines F2A-Elements zu einer geringeren Transkriptionsrate führen kann.<sup>146</sup> Somit könnte die F2A-Schnittstelle, die auch in den Vektoren in diesem Kapitel verwendet wird, zu einer zusätzlichen Schwächung der Puromycinresistenzgen-Expression führen und den Effekt des geringen Selektionsfaktors verstärken. In diesem Zuge ist es erwähnenswert, dass bei anderen Experimenten in der IBA zur Selektion stabiler Zellen mittels Puromycin die Generierung stabiler MEXi-293E-Zellen robuster erscheint, wenn das Resistenzgen direkt von einem Promotor kontrolliert wird.

Aufgrund der durch die STACS-Selektion erhöhten Expression und des höheren Anteils positiver Zellen, ist davon auszugehen, dass sich auch die Expression des POI (B18R) in den entsprechenden Kulturen erhöht. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse in Kapitel 5.3.2, dass die Proteinkonzentration in der Elutionsfraktion der zweifach-STACS-selektierten CHO-Kultur CHO-P-48h-II deutlich höher ist als in der Kultur CHO-P-48h-I. Allerdings kann keine gesicherte Aussage zur B18R-Expression getroffen werden, weil zahlreiche Banden im Gel zu sehen sind, die nicht dem erwarteten Molekulargewicht von B18R entsprechen. Es kann sich hierbei um Abbauprodukte handeln, wobei dies nicht die Identität einer Bande auf der Höhe zwischen 75 kDa und 85 kDa erklärt. Im Falle der MEXi-293E-Experimente konnte nach der Reinigung zu wenig Protein in der Elution nachgewiesen werden, um eine Aussage über die B18R-Expression zu treffen. Für die weiteren Experimente wird daher ein anderes POI gewählt, welches leichter zu reinigen und zu exprimieren ist.

## **5.4 Herstellung von stabilen SEAP-exprimierenden Zellkulturen mittels Puromycinselektion und STACS mit IRES- bzw. promotorkontrollierter Markergen-kassette**

Vorangegangene Kapitel haben die prinzipielle Funktionalität der STACS-Methode belegt. Ziel der Experimente in diesem Kapitel ist es, zu prüfen, welche Strategie zur Kontrolle der Markergenexpression ideal ist. Außerdem soll genauer untersucht werden, wie STACS die Expression eines POI in einer Kultur erhöhen kann.

Es wird die Herstellung von stabilen CHO- und MEXi-293E-Zellkulturen beschrieben, die als POI sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) produzieren. Die Selektion der Kulturen erfolgt mittels Puromycin, einer Kombination aus Puromycin und STACS sowie der ausschließlichen Verwendung von STACS. Des Weiteren werden zwei Möglichkeiten der Kontrolle der Markergenexpression getestet. Zum einen wird die Expression mittels einer IRES an die Expression des GOI geknüpft, zum anderen wird der schon zuvor verwendete PGK-Promotor eingesetzt.

### **5.4.1 Herstellung und Evaluierung stabiler SEAP-exprimierender CHO-Zellen mittels STACS und Puromycinselektion sowie Vergleich von IRES- und promotorbasierter Kontrolle der Markergen-kassette**

Für das Experiment wurden CHO-Zellen mittels der in Kapitel 5.1.3 beschriebenen Hochzelldichtetransfektion mit Plasmiden transfiziert, die jeweils eine der in Abbildung 30 dargestellten Genkassetten enthalten. Das IRES enthaltene Plasmid wird als pZSG4 und das PGK-Promotor enthaltene Plasmid als pZSG5 bezeichnet.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden beide CHO-Kulturen mit einer Zelldichte von  $6 \times 10^5$  Zellen/ml in CHO-TF-Kulturmedium mit  $7 \mu\text{g/ml}$  Puromycin transferiert. Alle 3–4 Tage wurde das Medium vollständig gewechselt, wobei die Puromycinkonzentration immer  $7 \mu\text{g/ml}$  betrug und die Zelldichte auf  $6 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt wurde. 21 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in puromycinfreies Kulturmedium überführt und ab diesem Zeitpunkt alle 3–4 Tage mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml subkultiviert (Kulturname: CHO-ZSG4-P und CHO-ZSG5-P). 18 Tage nach der Transfektion wurde je ein Teil beider Kulturen mit der STACS-Methode selektiert. Zellen der Elutionsfraktionen 3 und 4 wurden vereinigt und alle 3–4 Tage in Kulturmedium ohne Puromycin mit einer Zelldichte von

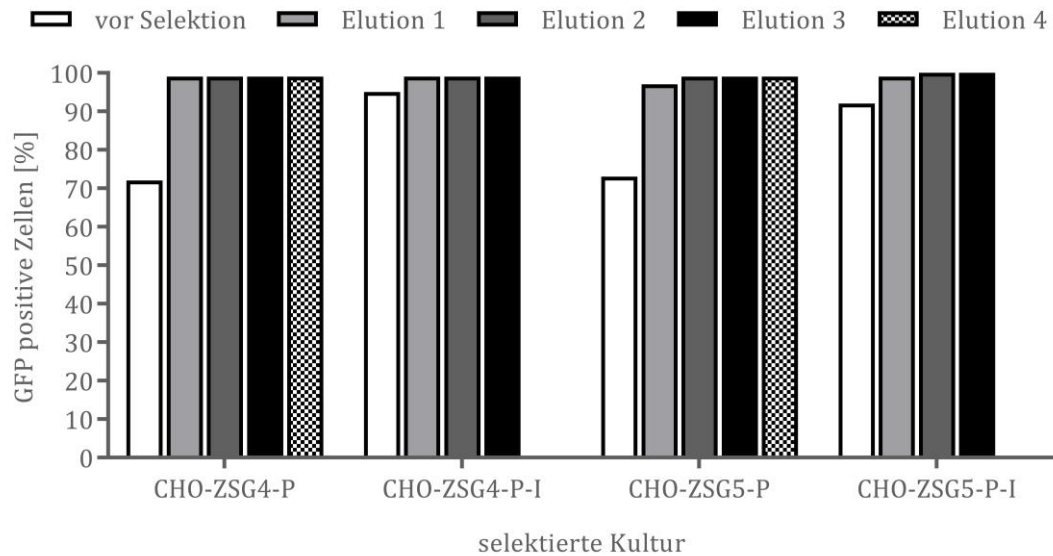
$3 \times 10^5$ – $6 \times 10^5$  Zellen/ml kultiviert (Kulturname: CHO-ZSG4-P-I und CHO-ZSG5-P-I). zehn Tage nach der ersten Selektion wurde ein Teil der jeweiligen STACS-selektierten Kulturen erneut selektiert. Die Elutionsfraktionen 2 und 3 wurden getrennt voneinander subkultiviert (Kulturname: CHO-ZSG4-P-II-E2 und CHO-ZSG4-P-II-E3 sowie CHO-ZSG5-P-II-E2 und CHO-ZSG5-P-II-E3). Eine detaillierte Aufstellung der STACS-Selektionsbedingungen findet sich in Kapitel 7.2.



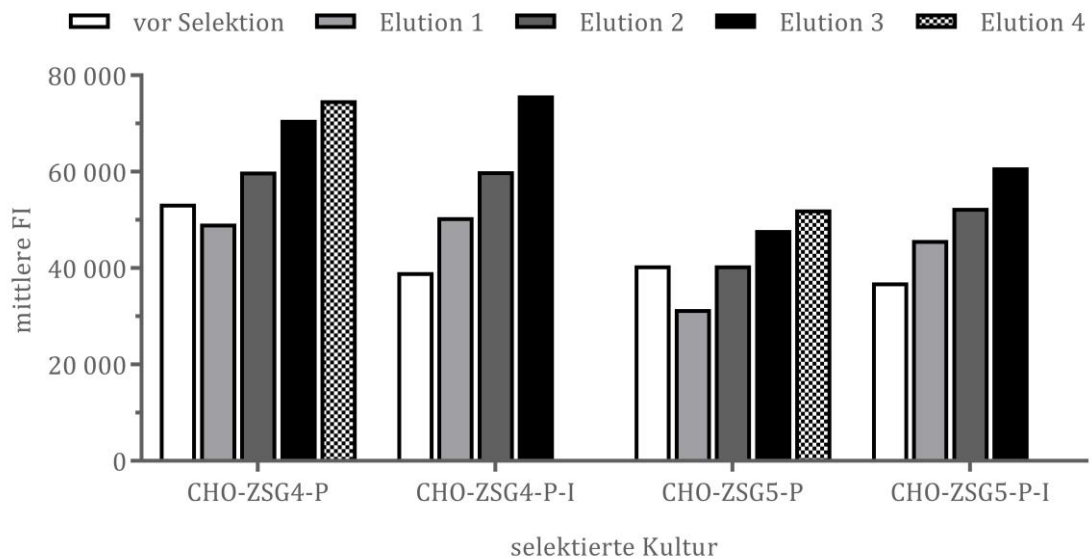
**Abbildung 30:** Expressionskassette der Vektoren pZSG4 (oben) und pZSG5 (unten). Die Vektoren enthalten folgende Elemente: EF1 $\alpha$ -Promotor (EF1 $\alpha$ ), der die Expression einer SEAP-Expressionskassette (SEAP) kontrolliert sowie eine Markergen-kassette, die von einem PGK-Promotor (PGK) oder einer IRES (IRES) kontrolliert wird. Die SEAP-Expressionskassette beinhaltet das SEAP-Gen mit C-terminalem TST und N-terminaler BM40-Signalpeptidsequenz sowie im Fall von pZSG5 einer SV40-Poly(A)-Signalsequenz. Die Markergen-kassette besteht aus einer BM40-Signalsequenz (BM40), einem Twin-Strep-tag<sup>®</sup> (TST), welcher mit einem flexiblen Linker mit einer CD4-Transmembranregion (flex-CD4tm) fusioniert ist. Außerdem ist die CD4-Transmembranregion mit einem eGFP (eGFP) fusioniert. Mittels einer selbst spaltenden F2A-Sequenz (2A) wird zudem die Expression einer Puromycin-resistenz-vermittelnden Puromycin-N-Acetyltransferase (PuroR) an die Expression des Transmembranproteins gekoppelt. Am Ende der Kassette findet sich eine bGH-Poly(A)-Signalsequenz.

Beide in diesem Experiment verwendeten Plasmide sind mit der STACS-Methode kompatibel. Der Unterschied bei der Selektion zwischen den pZSG4- und pZSG5-Kulturen ist gering. Sowohl in der mit pZSG4 transfizierten als auch der mit pZSG5 transfizierten Kultur erhöht sich der Anteil der GFP-positiven Zellen im Zuge der ersten STACS-Selektion von über 70 % auf  $\geq 97$  % (Abbildung 31). Im Vergleich zur Ausgangskultur kann die mittlere FI der selektierten Zellen bei allen Kulturen erhöht werden (Abbildung 32). Dabei ist die Zunahme der FI in der letzten Elution im Vergleich zur Ausgangskultur bei den pZSG4-Kulturen mit dem Faktor 1,4 (Selektion von CHO-ZSG4-P) und 1,9 (Selektion von CHO-ZSG4-P-I) geringfügig höher als





**Abbildung 31:** Anreicherung von pZSG4- und pZSG5-positiven CHO-Zellen in Elution 1 bis Elution 4 mittels der STACS-Methode aus der jeweiligen Ausgangskultur. CHO-ZSG4-P und CHO-ZSG5-P wurden 18 Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstand CHO-ZSG4-P-I und CHO-ZSG5-P-I welche zehn Tage später ebenfalls selektiert wurden.



**Abbildung 32:** Mittlere Fluoreszenzintensität (FI) der mittels STACS selektierten pZSG4- und pZSG5-positiven CHO-Zellen in Elution 1 bis Elution 4 sowie der jeweiligen Ausgangskultur. CHO-ZSG4-P und CHO-ZSG5-P wurden 18 Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstand CHO-ZSG4-P-I und CHO-ZSG5-P-I welche zehn Tage später ebenfalls selektiert wurden.

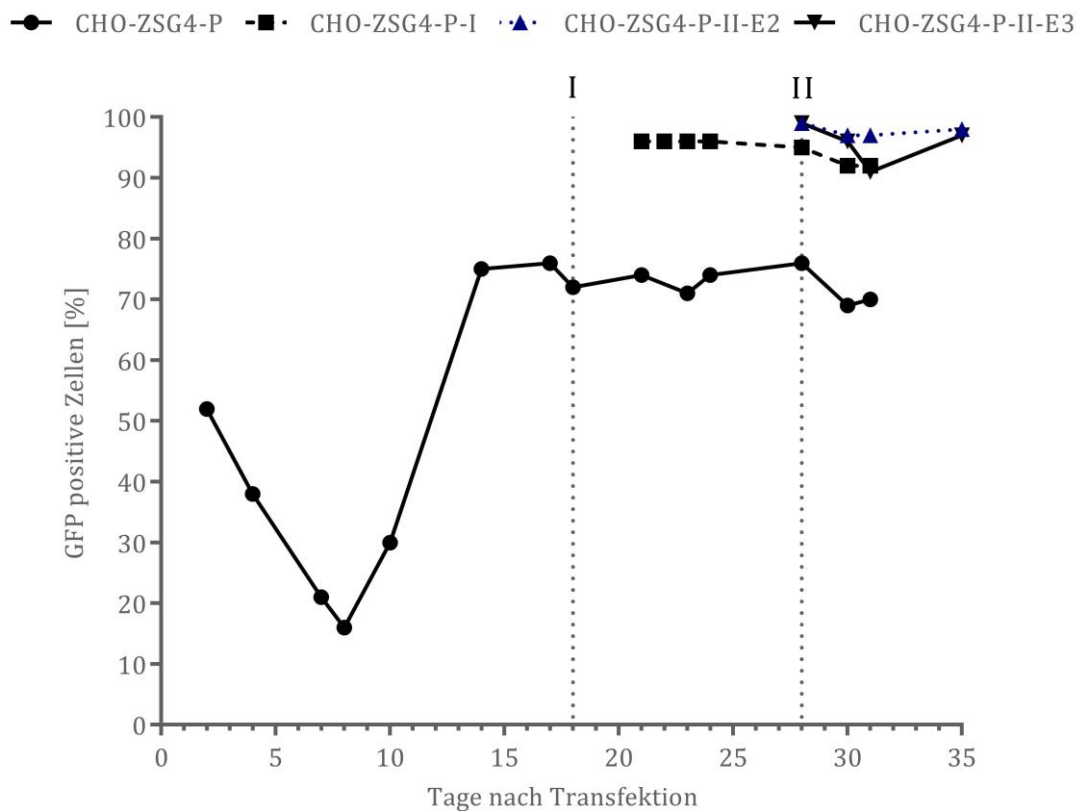
bei der Selektion der pZSG5-Kulturen mit dem Faktor 1,3 (Selektion von CHO-ZSG5-P) und 1,6 (Selektion von CHO-ZSG5-P-I).

Werden die Kulturen nur mit Puromycin selektiert, so ist der Anteil GFP-positiver Zellen während des Kulturverlaufs stabiler, wenn die Markergen-kassette von einer IRES kontrolliert wird (Abbildung 33, Abbildung 34). Zu Beginn der Kultivierung in Puromycin fällt der Anteil an GFP-positiven Zellen in der transienten Expressionsphase von 52 % bzw. 49 % (CHO-ZSG4-P bzw. CHO-ZSG5-P) auf 16 % bzw. 10 % am Tag 8. Anschließend steigt in beiden Kulturen der Anteil an GFP-positiven Zellen wieder an und erreicht nach 14 bzw. 17 Tagen einen Wert von 75 %. Während der Anteil positiver Zellen in der CHO-ZSG4-P-Kultur über den weiteren Kulturverlauf von 17 Tagen stabil bleibt, fällt er bei der CHO-ZSG5-P-Kultur in den folgenden 17 Tagen um 16 Prozentpunkte und in 26 Tagen um 27 Prozentpunkte.

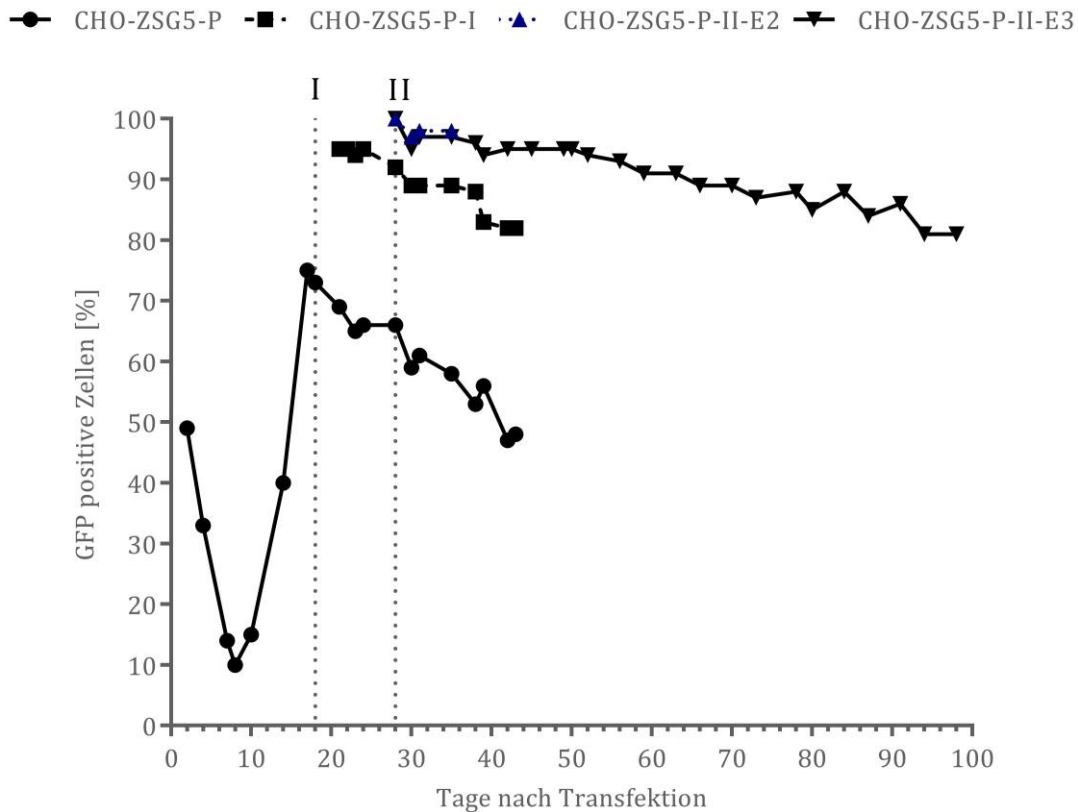
Bezüglich der GFP-positiven Zellen im Kulturverlauf der pZSG4- und pZSG5-Kulturen lässt sich ein signifikanter positiver Effekt der STACS-Selektion feststellen. So wird der Anteil an positiven Zellen in ZSG4- als auch ZSG5-Kulturen über den gesamten Kulturverlauf im Vergleich zu puromycinselektierten Kulturen durch die STACS-Selektion signifikant erhöht. Während bei STACS-selektierten CHO-ZSG4-Kulturen der Anteil GFP-positiver Zellen größer als 90 % ist, liegt der Wert in der CHO-ZSG4-P Kultur im gleichen Zeitraum zwischen 70–75 %. In CHO-ZSG5-P-I beträgt der Wert stets über 80 % und in CHO-ZSG5-P-II-E3 im gleichen Zeitraum über 90 %. Dagegen unterschreitet die Kultur CHO-ZSG5-P am Ende einen Anteil von 50 %.

Außerdem stabilisieren konsekutive STACS-Selektionen die Expression der ZSG5-positiven Zellen. Nach der ersten STACS-Selektion ist der Verlust der positiven Zellen im Zeitraum von Tag 21 bis Tag 31 nach der Transfektion in den Kulturen CHO-ZSG4-P-I und CHO-ZSG5-P-I vergleichbar (Verlust von 5 Prozentpunkten bzw. 6 Prozentpunkten). Eine über einen längeren Zeitraum stabile Expression wird in der ZSG5-Kultur erst durch die zweite STACS-Selektion erreicht. Innerhalb von 22 Tagen sinkt der Anteil positiver Zellen in CHO-ZSG5-P-I um 13 Prozentpunkte. Dagegen verringert sich während desselben Zeitraums der Anteil positiver Zellen in CHO-ZSG5-P-II-E3 um nur 5 Prozentpunkte. Insgesamt verringert sich der Anteil positiver Zellen in CHO-ZSG5-P-II-E3 in einem Zeitraum von 70 Tagen von 100 % auf 81 % um 19 Prozentpunkte. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die Verwendung der

STACS-Methode die Stabilität bzgl. der positiven Zellen in den ZSG5-Kulturen im Vergleich zur ausschließlichen Selektion mit Puromycin deutlich erhöht wird.



**Abbildung 33:** Verlauf der kultivierten pZSG4-positiven CHO-Zellen, die ausschließlich mit Puromycin (CHO-ZSG4-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-ZSG4-P-I, CHO-ZSG4-P-II-E2 und CHO-ZSG4-P-II-E3). Der Zeitpunkt der Selektionen wird durch gepunktete Linien markiert. CHO-ZSG4-P-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG4-P 18 Tage nach der Transfektion generiert. CHO-ZSG4-P-II-E2 und CHO-ZSG4-P-II-E3 wurden zehn Tage später durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG4-P-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

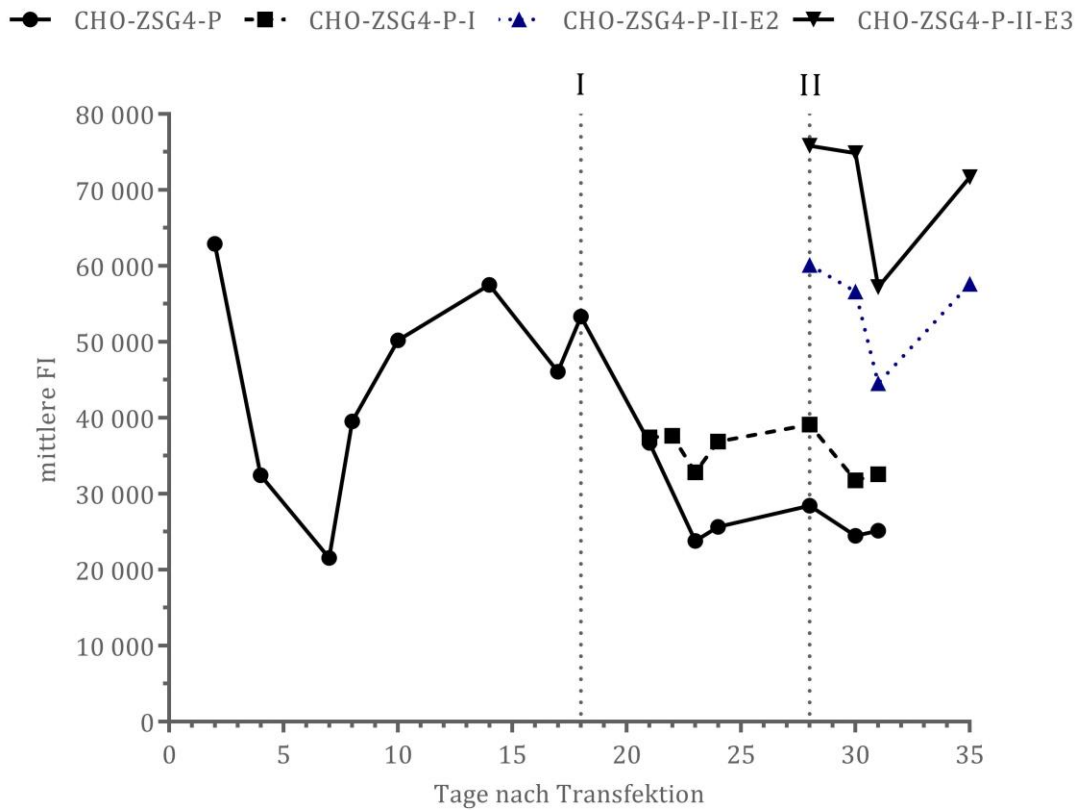


**Abbildung 34:** Verlauf der kultivierten pZSG5-positiven CHO-Zellen, die ausschließlich mit Puromycin (CHO-ZSG5-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-ZSG5-P-I, CHO-ZSG5-P-II-E2 und CHO-ZSG5-P-II-E3). Der Zeitpunkt der Selektionen wird durch gepunktete Linien markiert. CHO-ZSG5-P-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG5-P 18 Tage nach der Transfektion generiert. CHO-ZSG5-P-II-E2 und CHO-ZSG5-P-II-E3 wurden zehn Tage später durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG5-P-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

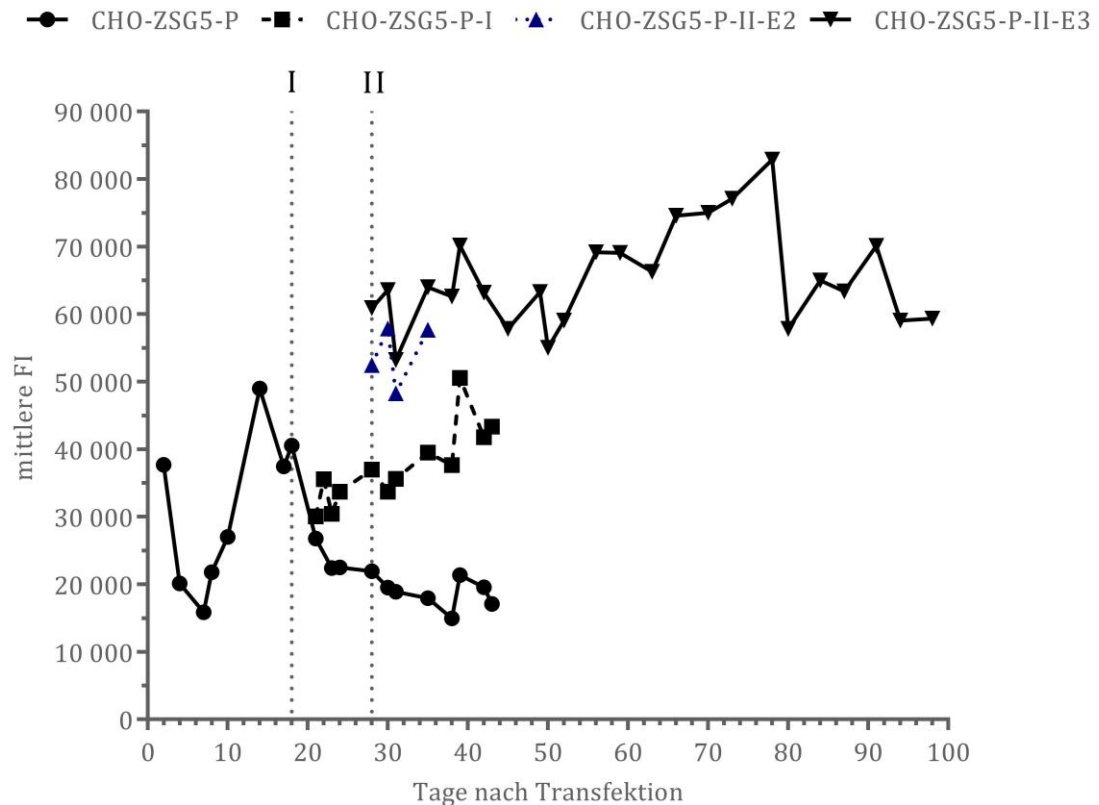
Wie der Anteil an GFP-positiven Zellen folgt auch der Verlauf der mittleren FI in CHO-ZSG4-P und CHO-ZSG5-P in den ersten 14 Tagen einer typischen Antibiotikaselektion. Aufgrund der transienten Expression sinkt die FI in den ersten sieben Tagen. Danach steigt sie bedingt durch den größer werdenden Anteil stabiler Zellen in der Kultur. Dabei ist die mittlere FI und folglich die Konzentration des Membranmarkerproteins auf der Zelloberfläche der ZSG4-Kultur höher als die der ZSG5-Kultur (Abbildung 35, Abbildung 36). Ab dem 18ten Tag sinkt die Expression des Oberflächenmarkers in beiden Kulturen bis die mittlere FI an Tag 23 41 % bzw. 46 % (CHO-ZSG4-P bzw. CHO-ZSG5-P) der mittleren FI an Tag 14 beträgt. Danach folgt die

mittlere FI in der ZSG4-Kultur einem konstanten Verlauf. In der Kultur CHO-ZSG5-P sinkt die FI im weiteren Kulturverlauf im Mittel nur noch geringfügig. Somit führt auch bzgl. der mittleren FI die Verwendung einer IRES zu einer leicht stabileren Expression, wenn nur mit Puromycin selektiert wird.

Sowohl für ZSG4- als auch ZSG5-Kulturen kann die Markerexpression im weiteren Kulturverlauf mit Hilfe der STACS-Selektionen erhöht werden. Während die mittlere FI nach der ersten STACS-Selektion in der Kultur CHO-ZSG4-P-I konstant bleibt, erhöht sich die Markerkonzentration auf der Zelloberfläche bei CHO-ZSG5-P-I im folgenden Kulturverlauf um 44 %. Beide Kulturen zeigen im Kulturverlauf eine höhere Expression als die jeweilige puromycinselektierte Kultur. Die zweite STACS-Selektion der Kulturen kann die Expression des Markerproteins im weiteren Kulturverlauf abermals erhöhen. Die für den Zeitraum von 70 Tagen kultivierte Kultur CHO-ZSG5-P-II-E3 weist hinsichtlich des Expressionslevels des Markerproteins ein im Mittel stabiles Niveau auf, wenngleich innerhalb des Kultivierungszeitraumes Schwankungen in der Expression beobachtet werden können, welche sich vor allem oberhalb der FI nach der Selektion bewegen. Verglichen mit einer ausschließlich antibiotikaselektierten Kultur ist das Markerexpressionslevel im Kulturverlauf der zweifach STACS-selektierten Kulturen um den Faktor 2,7 (CHO-ZSG4-P-II-E3) bzw. 3,3 (CHO-ZSG5-P-II-E3) erhöht.



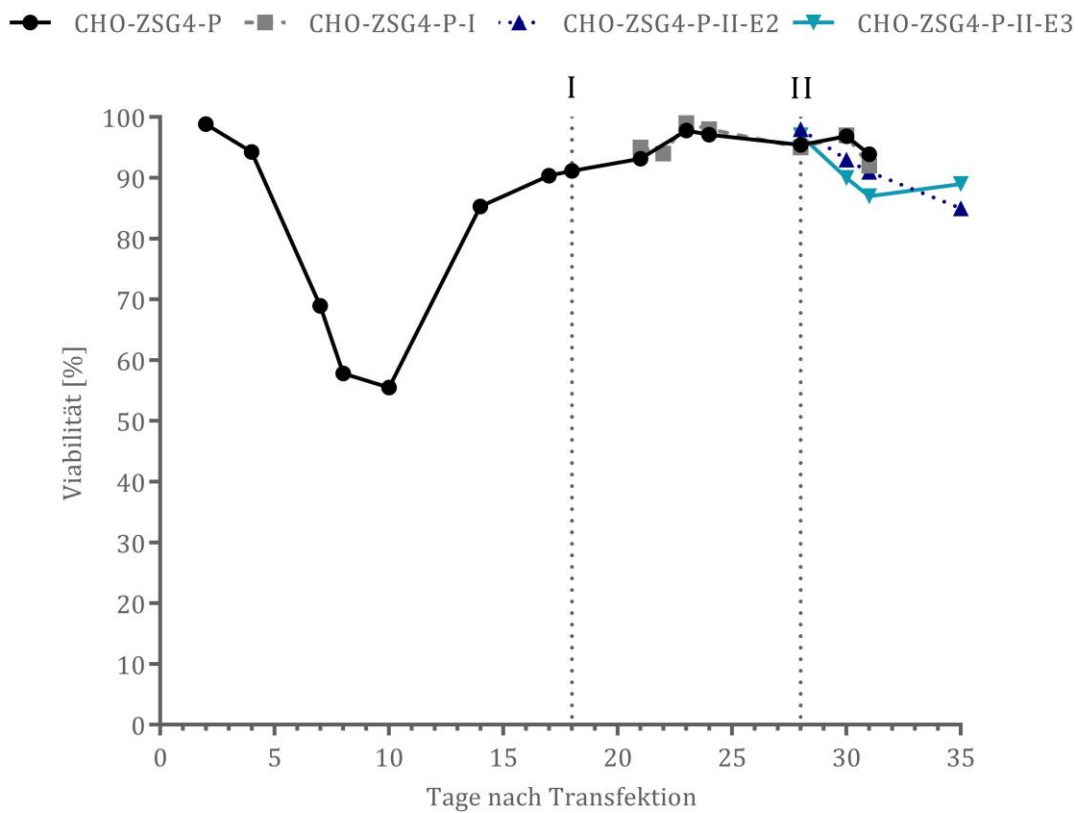
**Abbildung 35:** Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität (FI) kultivierter pZSG4-positiver CHO-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (CHO-ZSG4-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-ZSG4-P-I, CHO-ZSG4-P-II-E2 und CHO-ZSG4-P-II-E3). Der Zeitpunkt der Selektionen wird durch gepunktete Linien markiert. CHO-ZSG4-P-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG4-P 18 Tage nach der Transfektion generiert. CHO-ZSG4-P-II-E2 und CHO-ZSG4-P-II-E3 wurden zehn Tage später durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG4-P-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.



**Abbildung 36:** Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität (FI) kultivierter pZSG5-positiver CHO-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (CHO-ZSG5-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-ZSG5-P-I, CHO-ZSG5-P-II-E2 und CHO-ZSG5-P-II-E3). Der Zeitpunkt der Selektionen wird durch gepunktete Linien markiert. CHO-ZSG5-P-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG5-P 18 Tage nach der Transfektion generiert. CHO-ZSG5-P-II-E2 und CHO-ZSG5-P-II-E3 wurden zehn Tage später durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG5-P-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

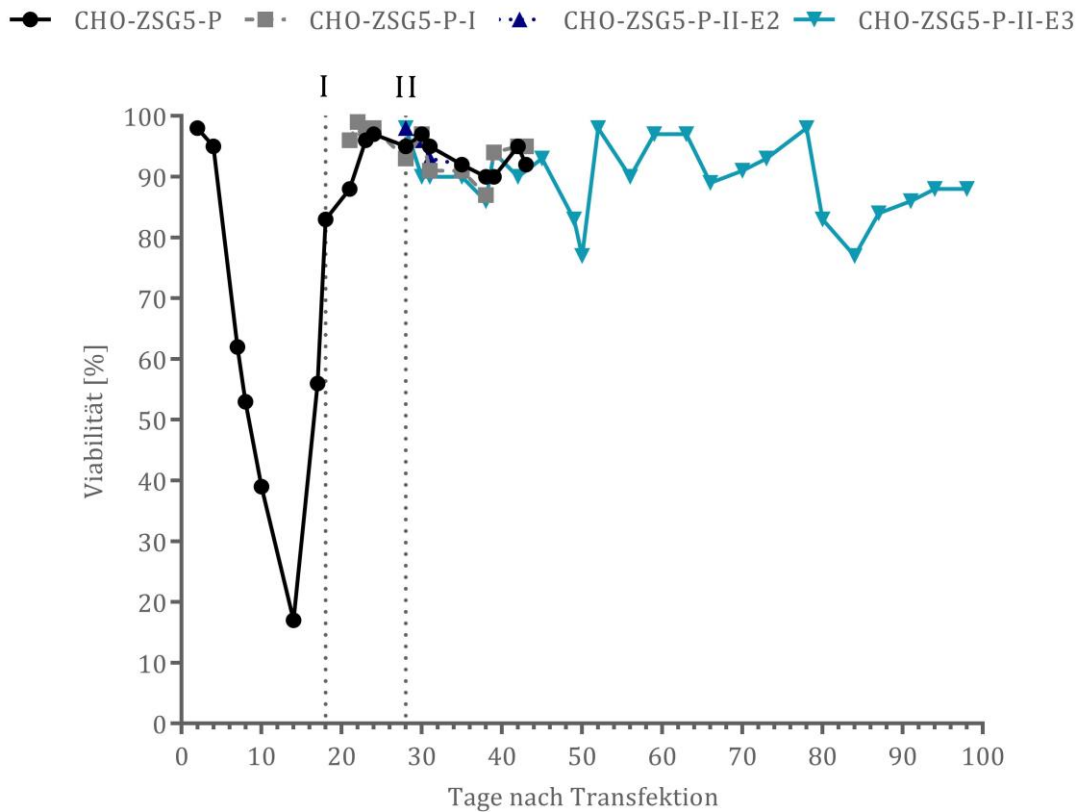
Bereits in Kapitel 5.3 zeigt der Verlauf der Viabilität der untersuchten Kulturen, dass die STACS-Selektion eine schonende Methode zur Selektion von Zellen darstellt. Auch die Kulturen, die in diesem Kapitel mittels STACS selektiert wurden, zeigen im Vergleich zu der Kultur, aus der die Zellen isoliert wurden, keine verringerte Viabilität in den Tagen nach der Selektion. Eine Beobachtung, die sowohl für ZSG4 (Abbildung 37) und ZSG5-Kulturen gilt (Abbildung 38). Im Gegensatz zur STACS-Selektion führt die erste Selektion mit Puromycin erwartungsgemäß zu einer deutlich verringerten Viabilität. So sinkt sie bei CHO-ZSG5-P auf unter 20 %. Im Fall von CHO-

ZSG4-P ist die Viabilität mit einem Mindestwert von 55 % während der transienten Expressionsphase höher.



**Abbildung 37:** Verlauf der Viabilität kultivierter pZSG4-positiver CHO-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (CHO-ZSG4-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-ZSG4-P-I, CHO-ZSG4-P-II-E2 und CHO-ZSG4-P-II-E3). Der Zeitpunkt der Selektionen wird durch gepunktete Linien markiert. CHO-ZSG4-P-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG4-P 18 Tage nach der Transfektion generiert. CHO-ZSG4-P-II-E2 und CHO-ZSG4-P-II-E3 wurden zehn Tage später durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG4-P-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.





**Abbildung 38:** Verlauf der Viabilität kultivierter pZSG5-positiver CHO-Zellen, welche ausschließlich mit Puromycin (CHO-ZSG5-P) oder zusätzlich mit der STACS-Methode selektiert wurden (CHO-ZSG5-P-I, CHO-ZSG5-P-II-E2 und CHO-ZSG5-P-II-E3). Der Zeitpunkt der Selektionen wird durch gepunktete Linien markiert. CHO-ZSG5-P-I wurde durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG5-P 18 Tage nach der Transfektion generiert. CHO-ZSG5-P-II-E2 und CHO-ZSG5-P-II-E3 wurden zehn Tage später durch STACS-Selektion der Kultur CHO-ZSG5-P-I generiert. Die Zellen wurden bis zum 21. Tag nach der Transfektion in Puromycin kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung ohne Puromycin.

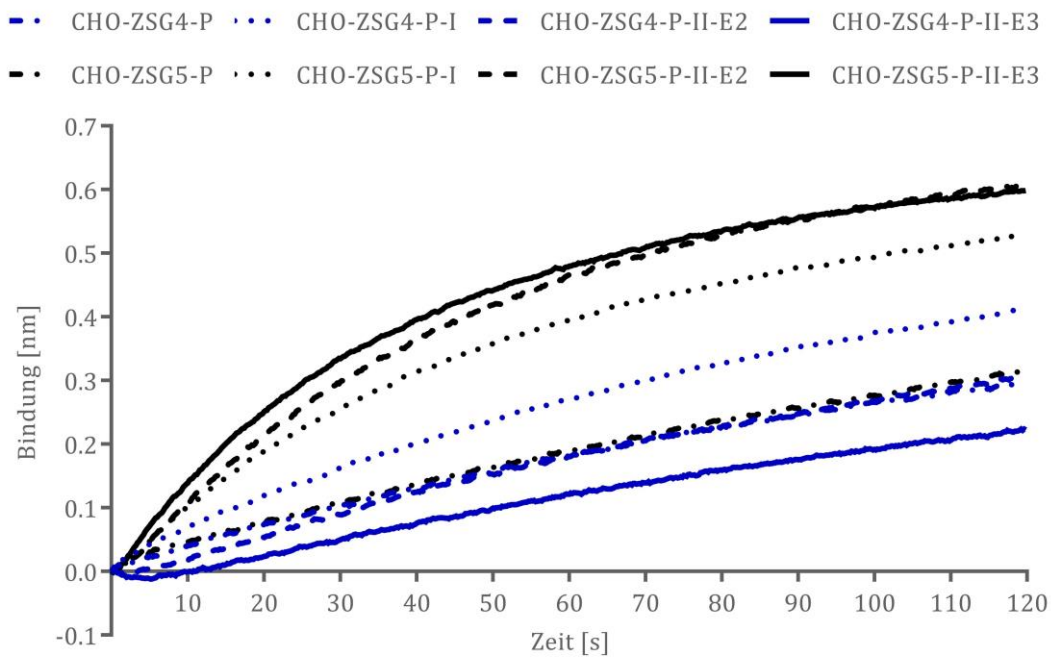
Die Ergebnisse zeigen, dass durch konsekutive STACS-Selektionen sowohl der Anteil positiver Zellen als auch deren Markerexpressionslevel im Vergleich zu einer ausschließlich puromycinbasierten Selektion signifikant erhöht und stabilisiert werden. Sowohl eine IRES als auch ein PGK-Promotor ermöglichen eine Kontrolle der Markergenexpression, die eine effiziente STACS-Selektion ermöglicht.

### 5.4.2 Bestimmung der SEAP-Expression von selektierten CHO-Zellen

Im vorherigen Kapitel konnte belegt werden, dass hinsichtlich der Expression des Membranmarkerproteins die Verwendung der STACS-Methode zu einem höheren Expressionslevel der Zellen und einem höheren Anteil produzierender Zellen in der Kultur führt. Entscheidend für den Prozess ist allerdings, ob und in welchem Maße die Expression der SEAP als POI erhöht wird. Aus diesem Grund wurde 31 Tage nach der Transfektion die SEAP-Ausbeute der in Kapitel 5.4.1 selektierten Kulturen bestimmt. Hierzu wurden die Zellen aus jeder Kultur nach einem Mediumwechsel mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml in 10 ml CHO-TF-Kulturmedium eingesät. Nur die beiden Kulturen CHO-ZSG5-P-II-E3 und CHO-ZSG4-P-II-E3 wurden bei gleicher Zelldichte in 8,3 ml bzw. 3,5 ml eingesät, da in diesen Kulturen noch nicht mehr Zellen zur Verfügung standen. Nach einer viertägigen Inkubation der Kulturen in TubeSpin® Bioreaktoren bei 37 °C, 300rpm (Hub 10 mm), 5 % CO<sub>2</sub> wurde die SEAP-Konzentration der Kulturüberstände mit einem BLItz®-System bestimmt. Außerdem wurden 8,5 ml Überstand mittels einer Strep-Tactin®XT Superflow® high capacity Säule gereinigt. Da bei den Kulturen CHO-ZSG5-P-II-E3 und CHO-ZSG4-P-II-E3 weniger Überstand zur Verfügung stand, wurde bei diesen 6,5 ml bzw. 2 ml Überstand aufgetragen. Abschließend wurden je Probe 10 µl der proteinenthaltenen zweiten Elutionsfraktion in einem SDS-PAGE-Gel analysiert.

Das Ergebnis der SEAP-Konzentrationsbestimmung im Überstand zeigt, dass die STACS-Selektionen die SEAP-Expression in den selektierten Kulturen im Vergleich zur puromycinselektierten Kultur deutlich erhöhen, wenn der PGK-Promotor verwendet wird (Abbildung 39). Bei der Verwendung der IRES waren die SEAP-Konzentrationen zu gering, um mit dem BLItz®-System bestimmt zu werden. Dies zeigt auch, dass die Verwendung eines PGK-Promotors zu einer höheren Expression des POI führt. Auch in der Probe der Kultur CHO-ZSG5-P kann aufgrund der geringen SEAP-Konzentration diese nicht genau bestimmt werden. Im Überstand der Kultur CHO-ZSG5-P-I kann eine SEAP-Konzentration von 5,6 µg/ml ermittelt werden. CHO-ZSG5-P-II-E2 weist eine SEAP-Konzentration von 6,8 µg/ml und CHO-ZSG5-P-II-E3 von 8,7 µg/ml auf (Tabelle 9). Wird der Anteil der produzierenden viablen GFP-positiven Zellen berücksichtigt, so führt eine STACS-Selektion zu einer sukzessiven Steigerung der zellspezifischen Produktivität (Tabelle 9). Das Ergebnis der

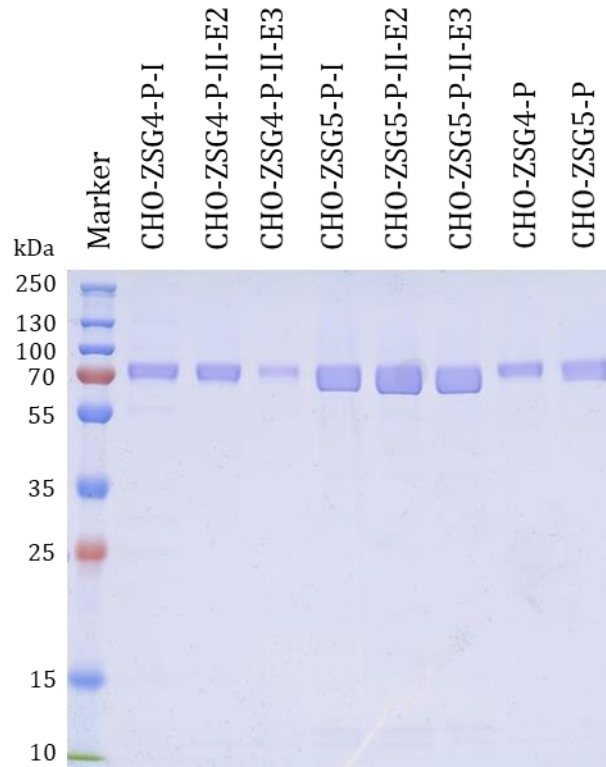
Gelanalyse zeigt, dass das Zielprotein in hoher Reinheit von der Säule eluiert wurde (Abbildung 40). Unter Berücksichtigung des geringeren Probenvolumens bei den Proben CHO-ZSG5-P-II-E3 und CHO-ZSG4-P-II-E3 stimmen die Ergebnisse der Gelanalyse gut mit denen der BLItz®-Analyse überein.



**Abbildung 39:** Analyse der SEAP-Konzentration in den Kulturüberständen der in 5.4.1 selektierten Kulturen. ZSG4-Proben (blau) stammen aus Kulturen, deren Markergenexpression von einer IRES kontrolliert wird. ZSG5-Kulturen (schwarz) kontrollieren die Markergenexpression mittels eines PGK-Promotors. Die Kulturen wurden 31 Tage nach der Transfektion der Ursprungskultur für vier Tage kultiviert.

**Tabelle 9:** SEAP-Konzentration in den ZSG5-Proben. Die Konzentration wurde mittels eines BLItz®-Systems gemessen. Aus der Konzentration wurde die zellspezifische Produktivität ( $qP$ ) berechnet. Bei Proben mit \* war die Konzentration für eine akkurate BLItz®-Quantifizierung zu gering.

Probe	SEAP-Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	$qP$ [ $\text{pg}/\text{c}/\text{d}$ ]
CHO-ZSG5-P*	0,5	-
CHO-ZSG5-P-I	5,6	0,99
CHO-ZSG5-P-II-E2	6,8	1,16
CHO-ZSG5-P-II-E3	8,7	1,72



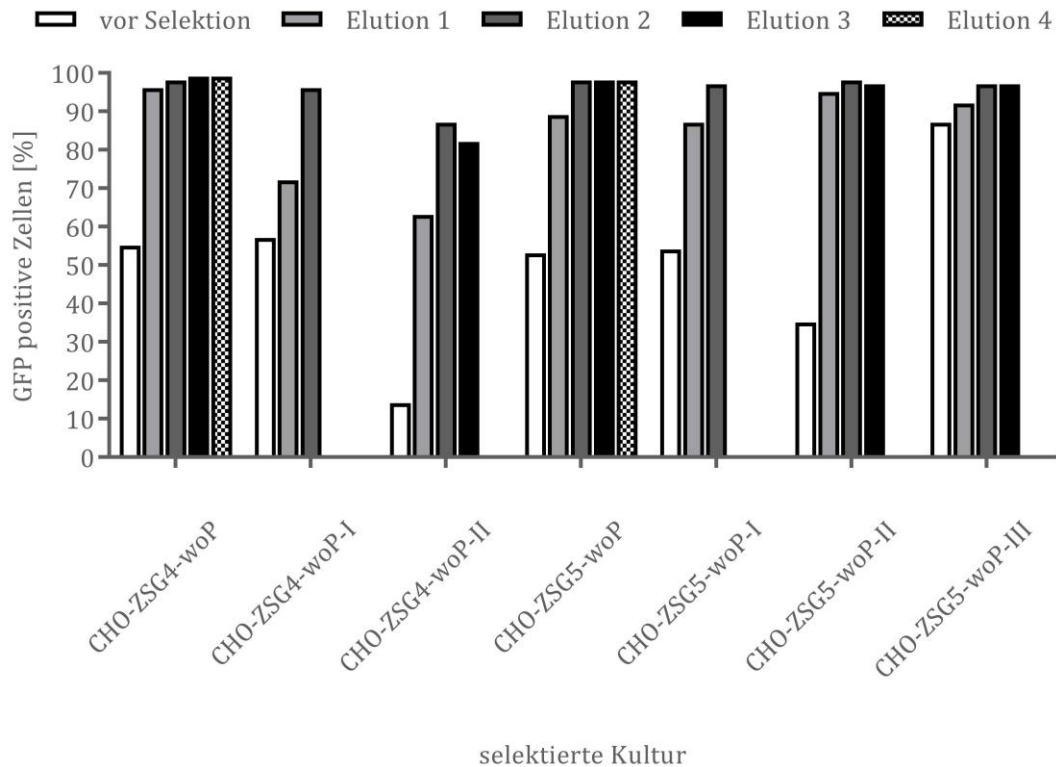
**Abbildung 40:** Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel der zweiten Elutionsfraktion nach Reinigung der Kulturüberstände verschiedener CHO-ZSG-Kulturen. In jeder Spur wurden 10  $\mu$ l der Elution aufgetragen. Da bei den Kulturen CHO-ZSG5-P-II-E3 und CHO-ZSG4-P-II-E3 nur 6,5 ml bzw. 2 ml Kulturüberstand statt 8,5 ml gereinigt wurden, fällt die Proteinmenge in der Elution geringer aus, als es bei einem Auftragsvolumen von 8,5 ml der Fall wäre. Spur 1 enthält den Marker; die übrigen Spuren die Elutionsfraktionen der jeweiligen CHO-ZSG-Kulturen. Das theoretische Molekulargewicht des SEAP-TST-Fusionsproteins beträgt 56 kDa. Die Identität des Proteins wurde im Western Blot mit Strep-Tactin<sup>®</sup>-HRP-Konjugat bestätigt.

Die in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung eines PGK-Promotors kombiniert mit der STACS-Selektion zu den höchsten SEAP-Konzentrationen im Kulturüberstand führen. Aufgrund der kurzen Kulturdauer und der damit verbundenen geringen SEAP-Konzentration in den Proben werden weitere Experimente zur Bestimmung der SEAP-Konzentrationen in den ZSG5-Kulturen durchgeführt, welche in Kapitel 5.4.4 beschrieben werden.

### 5.4.3 Herstellung einer stabilen SEAP-exprimierenden CHO-Zellkultur durch ausschließliche Verwendung von STACS

Die vorherigen Kapitel haben belegt, dass die STACS-Methode verwendet werden kann, um die Produktivität einer zuvor mit Puromycin selektierten Kultur zu erhöhen. Aufgrund der Effizienz der STACS-Methode ist es naheliegend zu überprüfen, ob eine ausschließlich auf der STACS-Methode basierende antibiotikafreie Selektion von Zellen zur Herstellung von stabilen Zellen möglich ist. Dazu wurden erneut CHO-Zellen, wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben, mit den Plasmiden pZSG4 oder pZSG5 transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die beiden Kulturen mittels der STACS-Methode selektiert. Dabei wurden die Elutionsfraktionen 2, 3 und 4 gepoolt und weiter kultiviert (Bezeichnung CHO-ZSG4-woP-I, bzw. CHO-ZSG5-woP-I). Fünf Tage nach der ersten Selektion wurden die Kulturen erneut selektiert und die jeweilige zweite Elutionsfraktion weiter kultiviert (CHO-ZSG4-woP-II, bzw. CHO-ZSG5-woP-II). Nach weiteren 14 Tagen erfolgte eine dritte STACS-Selektion, wobei die Zellen in der dritten Elutionsfraktion aus CHO-ZSG5-woP-II weiter kultiviert wurden (CHO-ZSG5-woP-III). Aus der Selektion der Kultur CHO-ZSG4-woP-II resultierten zu wenige Zellen für eine weitere Kultivierung. Abschließend wurde 35 Tage nach der dritten Selektion eine letzte STACS Selektion durchgeführt. Aus der dritten Elutionsfraktion entstand so die weiterhin kultivierte Kultur CHO-ZSG5-woP-IV. Eine detaillierte Aufstellung der STACS-Selektionsbedingungen findet sich in 7.2.

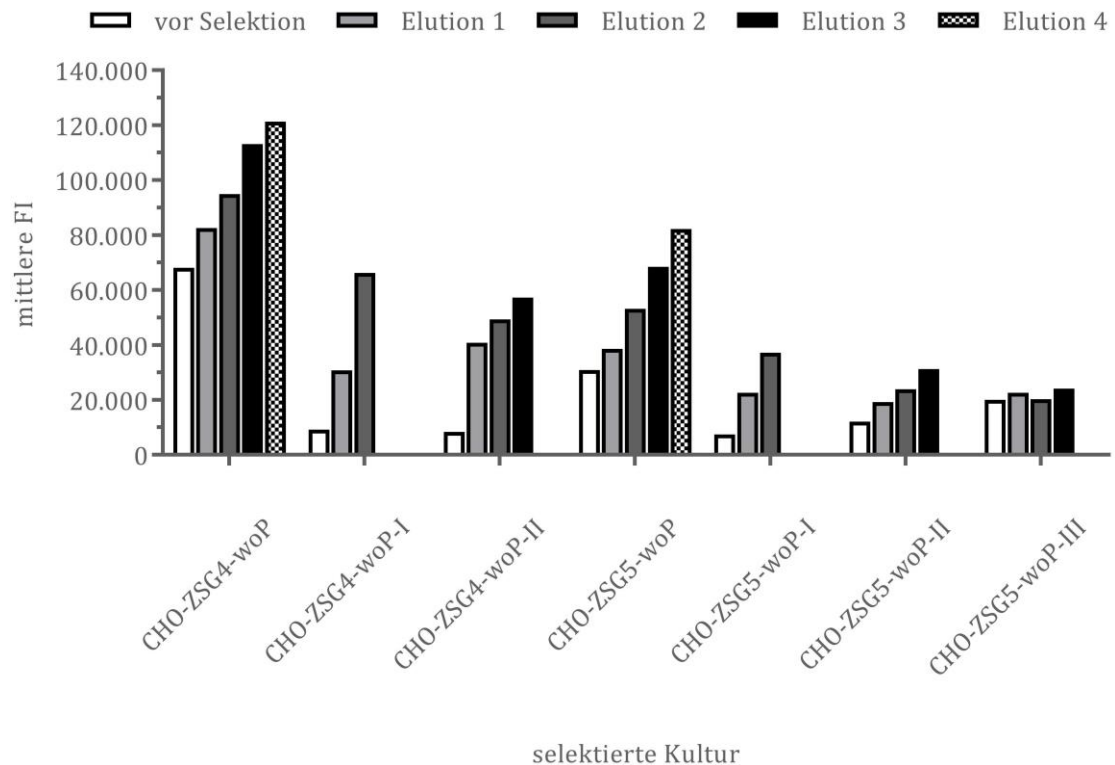
Wie bereits in den vorherigen Versuchen wird durch die STACS-Methode der Anteil an GFP-positiven Zellen im Vergleich zur Ausgangskultur erhöht (Abbildung 41). In der Regel wird der Anteil der GFP-positiven Zellen während der Elution auf über 95 % gesteigert. Während der ersten beiden Selektionen ist das Elutionsprofil bzgl. der GFP-positiven Zellen der ZSG4- und der ZSG5-Kultur vergleichbar. Zu Beginn der dritten Selektion ist dagegen der Anteil positiver Zellen in der Ausgangskultur der ZSG4-Zellen deutlich geringer (14 %) als bei den ZSG5-Zellen (35 %). Dadurch ist auch der Anteil an positiven Zellen in den Elutionsfraktionen der ZSG5-Kultur höher als bei der ZSG4-Kultur. Während der letzten Selektion der ZSG5-Kultur kann der Anteil der positiven Zellen nur noch geringfügig um maximal zehn Prozentpunkte erhöht werden, da sich die Kultur zu diesem Zeitpunkt bereits in einem stabilen Zustand befindet.



**Abbildung 41:** Anreicherung von pZSG4- und pZSG5-positiven CHO-Zellen in Elution 1 bis Elution 4 mittels der STACS-Methode aus der jeweiligen Ausgangskultur. CHO-ZSG4-woP und CHO-ZSG5-woP wurden zwei Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstanden CHO-ZSG4-woP-I und CHO-ZSG5-woP-I, welche fünf Tage später ebenfalls selektiert wurden. Die daraus resultierenden Kulturen CHO-ZSG4-woP-II und CHO-ZSG5-woP-II wurden nach weiteren 14 Tagen selektiert. 35 Tage später wurde die aus der dritten Selektion gewonnene Kultur CHO-ZSG5-woP-III selektiert.

Neben dem Anteil der GFP-positiven Zellen wird auch die Expression des Markerproteins, gemessen durch die mittlere FI, im Zuge der STACS-Selektion erhöht (Abbildung 42). Mit Ausnahme der letzten Selektion der ZSG5-Kultur steigt die mittlere FI in den eluierten Zellen im Vergleich zur Ausgangspopulation deutlich. Dabei erhöht sich die FI bei einer Selektion, wie in vorangegangenen Kapiteln, mit jeder Elutionsfraktion. Der größte relative Anstieg ist dabei sowohl bei den ZSG4- als auch bei den ZSG5-Zellen während der zweiten Selektion zu verzeichnen. In der zweiten Elution ist der mittlere FI-Wert 7,2-mal bzw. 5-mal (ZSG4, bzw. ZSG5) höher als in der Kultur vor der Selektion. In der dritten Selektion der ZSG4- und ZSG5-Kultur werden in der letzten Elution FI-Werte erreicht, die im Bereich der Ausgangskultur vor der ersten STACS-Selektion liegen. Allerdings ist die mittlere FI in CHO-ZSG4-

woP-II vor der Selektion 8,2-fach geringer als in der Ausgangskultur von CHO-ZSG4-woP. Im Falle von CHO-ZSG5-woP-II beträgt dieses Verhältnis nur 2,5. Genau wie in Kapitel 5.4.1 ist die Expression des Markerproteins bei einer Kontrolle durch den PGK-Promotor geringer als bei einer Kontrolle durch eine IRES. So ist zum Zeitpunkt der ersten Selektion die FI in der Kultur CHO-ZSG4-woP 2,7-mal so hoch wie in der Kultur CHO-ZSG5-woP.



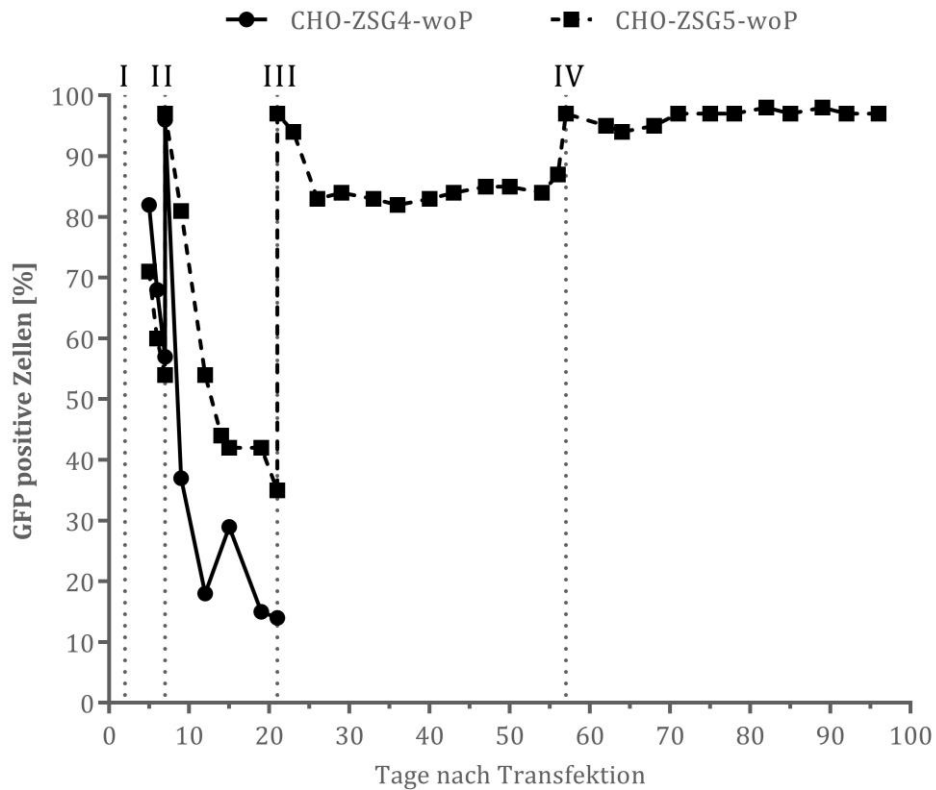
**Abbildung 42:** Mittlere Fluoreszenzintensität (FI) der mittels STACS selektierten pZSG4- und pZSG5-positiven CHO-Zellen in Elution 1 bis Elution 4 sowie der jeweiligen Ausgangskultur. CHO-ZSG4-woP und CHO-ZSG5-woP wurden zwei Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstand CHO-ZSG4-woP-I und CHO-ZSG5-woP-I, welche fünf Tage später ebenfalls selektiert wurden. Die daraus resultierenden Kulturen CHO-ZSG4-woP-II und CHO-ZSG5-woP-II wurden nach weiteren 14 Tagen selektiert. 35 Tage später wurde die aus der dritten Selektion gewonnene Kultur CHO-ZSG5-woP-III selektiert.

Wird der Anteil der GFP-positiven Zellen während des Kulturverlaufs betrachtet, ist während der ersten zwölf Tage der Kultivierung sowohl bei ZSG4- als auch bei ZSG5-Zellen eine vorwiegend transiente Expression des Markerproteins zu beobachten (Abbildung 43). Darum sinkt der Anteil an GFP-positiven Zellen in diesem Zeitraum

rapide, nachdem der Anteil zum Zeitpunkt der jeweiligen STACS-Selektionen (vertikal gepunktete Linien) durch die Selektion zunächst einen hohen Wert aufweist. Dabei erreicht die ZSG5-Kultur ein höheres Level an GFP-positiven Zellen. So fällt der Wert zwischen Tag sieben und Tag zwölf um 79 Prozentpunkte (ZSG4) bzw. 43 Prozentpunkte (ZSG5). Nach dem zwölften Tag verringert sich der Anteil positiver Zellen in der Kultur nur noch geringfügig. Die in den Kulturen verbleibenden GFP-positiven Zellen sind somit überwiegend Zellen, die das Markergen in ihr Genom integriert haben.

Folglich belegen die Ergebnisse, dass durch die ausschließliche Verwendung der STACS-Methode stabile CHO-Zellen selektiert werden können. Besonders deutlich wird dies am Kulturverlauf der CHO-ZSG5-woP-Kultur nach der dritten Selektion an Tag 21. Bis Tag 26 sinkt der Anteil der GFP-positiven Zellen nur noch um 14 Prozentpunkte und bleibt im weiteren Kulturverlauf bis Tag 56 stabil zwischen 80 % und 90 %. Nach einer letzten Selektion an Tag 56 liegt der Anteil der positiven Zellen bis zum Ende der Kultivierung 96 Tage nach der Transfektion bei konstant über 90 %.

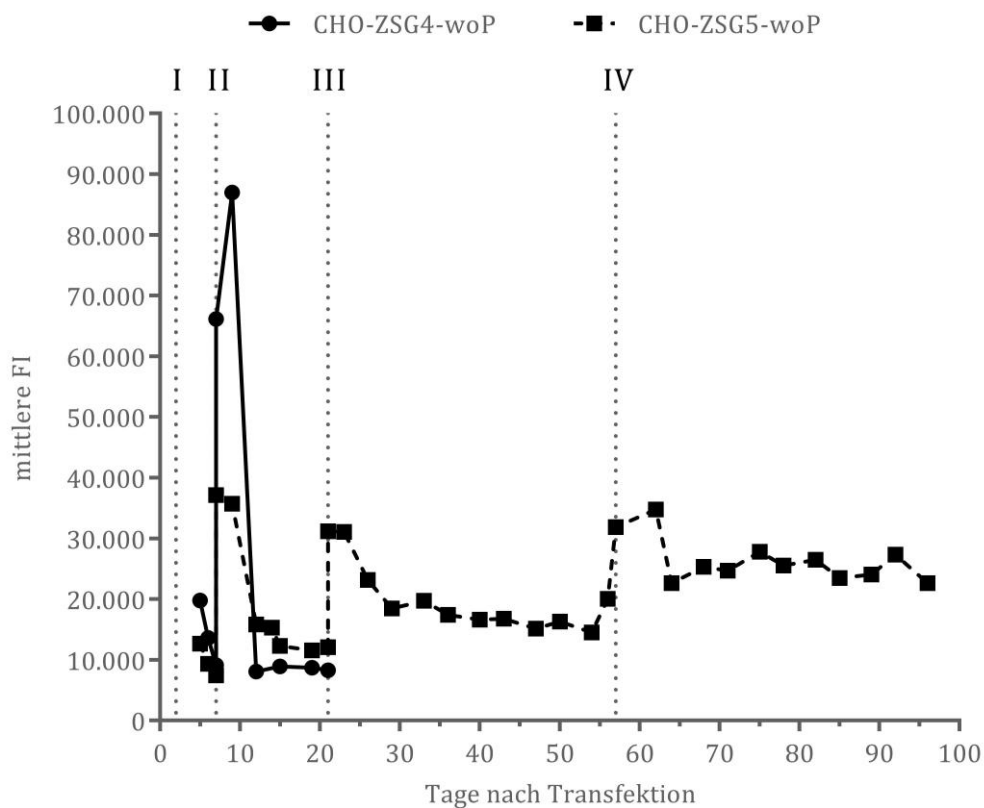




**Abbildung 43:** Verlauf des Anteils GFP-positiver CHO-Zellen nach STACS-Selektionen. Vertikale gepunktete Linien markieren den Zeitpunkt der STACS-Selektionen. CHO-ZSG4-woP und CHO-ZSG5-woP wurden zwei Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstand CHO-ZSG4-woP-I und CHO-ZSG5-woP-I, welche fünf Tage später ebenfalls selektiert wurden. Die daraus resultierenden Kulturen CHO-ZSG4-woP-II und CHO-ZSG5-woP-II wurden nach weiteren 14 Tagen selektiert. 35 Tage später wurde die aus der dritten Selektion gewonnene Kultur CHO-ZSG5-woP-III selektiert.

Der Verlauf der mittleren FI spiegelt den Verlauf der GFP-positiven Zellen in den Kulturen wider. Auch hier ist in den ersten zwölf Tagen nach der Transfektion eine transiente Expression vorherrschend, wobei die FI durch die STACS-Selektion kurzzeitig erhöht wird (Abbildung 44). Im Zuge der zweiten Selektion an Tag sieben wird die mittlere FI in der ZSG4-Kultur gegenüber der ZSG5-Kultur sehr viel stärker erhöht. So steigt die mittlere FI um 77.855 Einheiten in der ZSG4-Kultur, wohingegen sie sich in der ZSG5-Kultur um 29.703 Einheiten vergrößert. Ab dem zwölften Tag stabilisiert sich das Expressionslevel sowohl in der ZSG4- als auch in der ZSG5-Kultur mit einer mittleren FI zwischen 8000 und 9000 (ZSG4) bzw. 11000 und 16000 (ZSG5).

Somit führt eine ausschließlich STACS-basierte Selektion nicht nur zu einem stabilen Anteil GFP-positiver Zellen, sondern auch zu einer Population, deren mittleres Expressionslevel des Markergens stabil ist. Eine weitere STACS-Selektion der ZSG5-Kultur an Tag 21 stabilisiert die Expression auf einem FI-Level zwischen 14.000 und 20.000 über einen Zeitraum von 25 Tagen. Mittels der letzten STACS-Selektion wird das Expressionslevel noch einmal stabil auf ein FI-Niveau zwischen 22.600 und 28.000 über einen Zeitraum von 32 Tagen angehoben.



**Abbildung 44:** Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität (FI) GFP-positiver CHO-Zellen nach STACS-Selektionen. Vertikale gepunktete Linien markieren den Zeitpunkt der STACS-Selektionen. CHO-ZSG4-woP und CHO-ZSG5-woP wurden zwei Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstand CHO-ZSG4-woP-I und CHO-ZSG5-woP-I, welche fünf Tage später ebenfalls selektiert wurden. Die daraus resultierenden Kulturen CHO-ZSG4-woP-II und CHO-ZSG5-woP-II wurden nach weiteren 14 Tagen selektiert. 35 Tage später wurde die aus der dritten Selektion gewonnene Kultur CHO-ZSG5-woP-III selektiert.

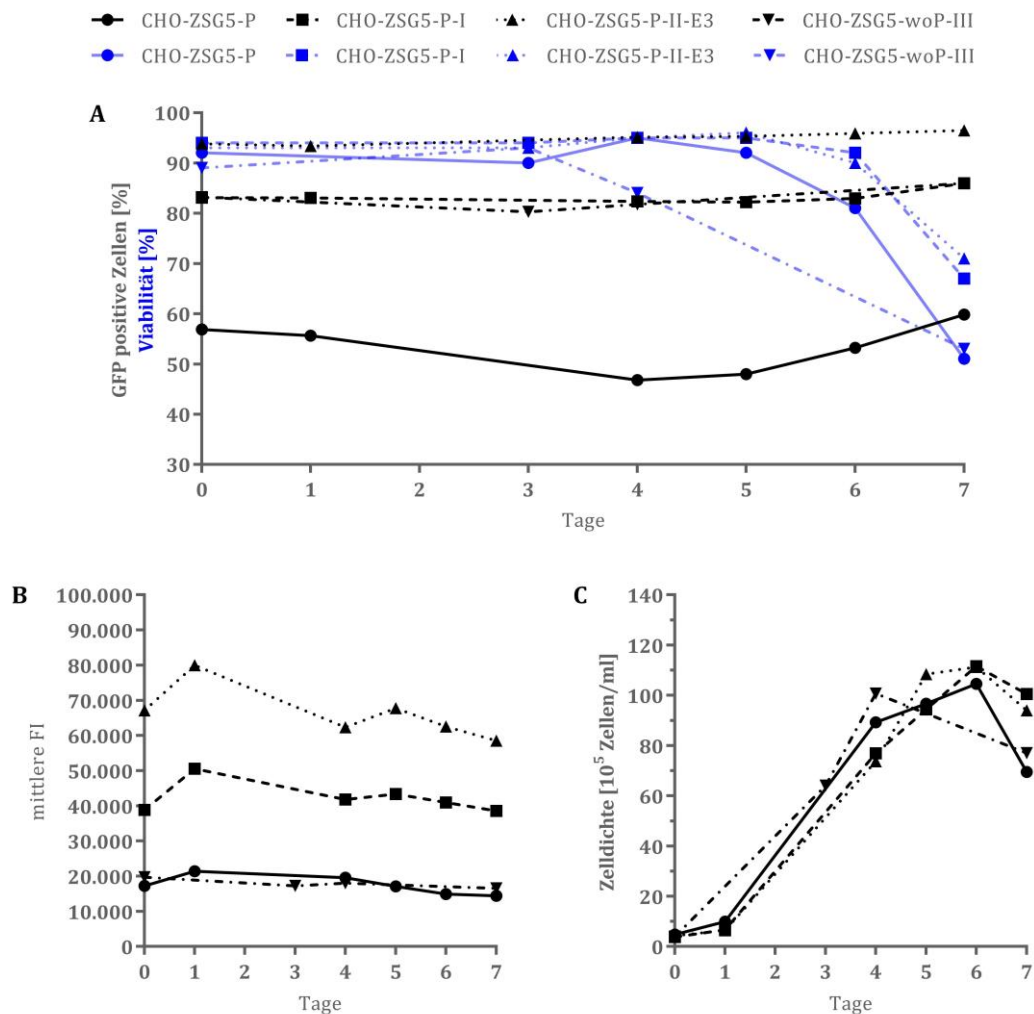
#### 5.4.4 Vergleich der SEAP-Expression von STACS-selektierten CHO-ZSG5-Kulturen

Um den Einfluss der STACS-Selektion sowie den Effekt einer Vorselektion mit Puromycin auf die SEAP-Expression zu untersuchen, wurden die in dieser Arbeit selektierten ZSG5-Kulturen für eine SEAP-Produktion ausgesät. Die Kulturen CHO-ZSG5-P, CHO-ZSG5-P-I und CHO-ZSG5-P-II-E3 wurden an Tag 38 nach der Transfektion (siehe Kapitel 5.4.1) mit  $3,8\text{--}4,8 \times 10^5$  Zellen/ml in frisches CHO-TF Medium ausgesät. Eine CHO-ZSG5-woP-III-Kultur wurde zum Vergleich zwölf Tage nach der dritten Selektion mit  $4,0 \times 10^5$  Zellen/ml in frisches Medium inokuliert. Anschließend wurden die Kulturen sieben Tage bei 125 rpm, 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C in 250 ml Enghalsflaschen kultiviert. Nach sieben Tagen wurde der Kulturüberstand über 0,2 ml Strep-Tactin®XT *Superflow*® *high capacity* Säulen gereinigt und die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen anschließend im NanoDrop™ bestimmt. Per SDS-PAGE-analyse wurde sichergestellt, dass die Reinheit des Zielproteins in den Elutionen >90 % betrug (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 45 zeigt den Verlauf der Kulturen während der SEAP-Produktion. Die während der Kultivierung erreichten maximalen Zelldichten sowie der Verlauf der Zelldichte sind zwischen den jeweiligen Kulturen ähnlich (Abbildung 45, C). Auch die Viabilität unterscheidet sich mit Ausnahme von CHO-ZSG5-woP-III zwischen den Kulturen bis Tag fünf nur geringfügig. CHO-ZSG5-woP-III hat ab Tag vier eine geringere Viabilität. An Tag sieben liegt die Viabilität der Kulturen CHO-ZSG5-P und CHO-ZSG5-woP-III bei unter 55 %, wogegen sie bei den beiden übrigen Kulturen 67–71 % beträgt (Abbildung 45, A). Es muss berücksichtigt werden, dass die Kultur CHO-ZSG5-woP-III zu einem anderen Zeitpunkt kultiviert und in einem anderen Messintervall analysiert wurde.

Erwartungsgemäß ist der Verlauf der GFP-positiven Zellen und der mittleren FI der jeweiligen Kulturen stabil. Der Anteil GFP-positiver Zellen und somit der Anteil an produzierenden Zellen ist in der ausschließlich mit Puromycin selektierten Kultur 1,6-mal geringer als in den beiden Kulturen CHO-ZSG5-P-I und CHO-ZSG5-woP-III. Im Vergleich zu der Kultur CHO-ZSG5-P-II-E3 ist er um den Faktor 1,8 geringer (Abbildung 45, A). Interessanterweise befindet sich die mittlere FI der beiden Kulturen CHO-ZSG5-P und CHO-ZSG5-woP-III im Kulturverlauf auf demselben Level. Dagegen ist sie in der Kultur CHO-ZSG5-P-I 2,4-mal höher als in CHO-ZSG5-P. CHO-

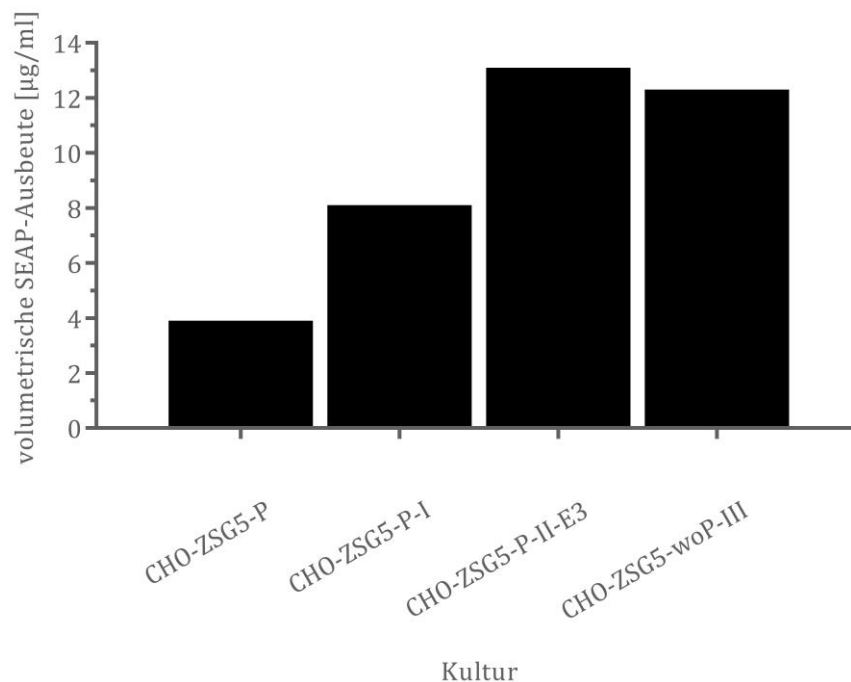
ZSG5-P-II-E3 weist sogar eine 3,8-mal höhere mittlere FI auf als CHO-ZSG5-P (Abbildung 45, B).



**Abbildung 45:** Kulturverläufe von CHO-ZSG5-P, CHO-ZSG5-P-I, CHO-ZSG5-P-II-E3 und CHO-ZSG5-woP-III während der siebentägigen Produktion von SEAP. CHO-ZSG5-P wurde ausschließlich mit Puromycin selektiert. CHO-ZSG5-P-I entstand durch STACS-Selektion von CHO-ZSG5-P und CHO-ZSG5-P-II-E3 wurde durch STACS-Selektion von CHO-ZSG5-P-I gewonnen. CHO-ZSG5-woP-III wurde durch konsekutive STACS-Selektionen und ohne Puromycins Selektion gewonnen. (A) zeigt den Anteil GFP-positiver Zellen über den Kulturverlauf (schwarz) sowie die Viabilität der Kulturen (blau). (B) zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der Kulturen. (C) zeigt den Verlauf der viablen Zelldichte während der Kultivierung.

Qualitativ folgen die erzielten Volumenausbeuten mit einer Ausnahme den Unterschieden der Kulturen hinsichtlich des Anteils produzierender GFP-positiver Zellen und des Expressionslevels an Markerprotein. Je mehr Zellen GFP-positiv sind und je

höher die mittlere FI einer Kultur ist, desto höher ist auch die SEAP-Volumenausbeute. STACS bewirkt somit eine signifikante Steigerung des SEAP-Titers (Abbildung 46). Basierend auf dem Anteil an GFP-positiven Zellen und der mittleren FI ist die Volumenausbeute der SEAP in der Kultur CHO-ZSG5-P erwartungsgemäß mit 3,9 µg/ml am geringsten. Durch die einmalige STACS-Selektion von CHO-ZSG5-P kann die Ausbeute in der Kultur CHO-ZSG5-P-I um das 2,1-fache auf 8,1 µg/ml gesteigert werden. Mit einer Ausbeute von 13,1 µg/ml erhöht sich die SEAP-Volumenausbeute in CHO-ZSG5-P-II-E3 im Vergleich zur nur mit Puromycin selektierten Kultur um den Faktor 3,3. Bemerkenswerterweise ist die SEAP-Volumenausbeute der ausschließlich mittels STACS selektierten Kultur CHO-ZSG5-woP-III mit 12,3 µg/ml vergleichbar mit der Ausbeute von CHO-ZSG5-P-II-E3 und 3,2-mal höher als die von CHO-ZSG5-P. Dabei ist die mittlere FI von CHO-ZSG5-woP-III auf demselben Niveau wie CHO-ZSG5-P.

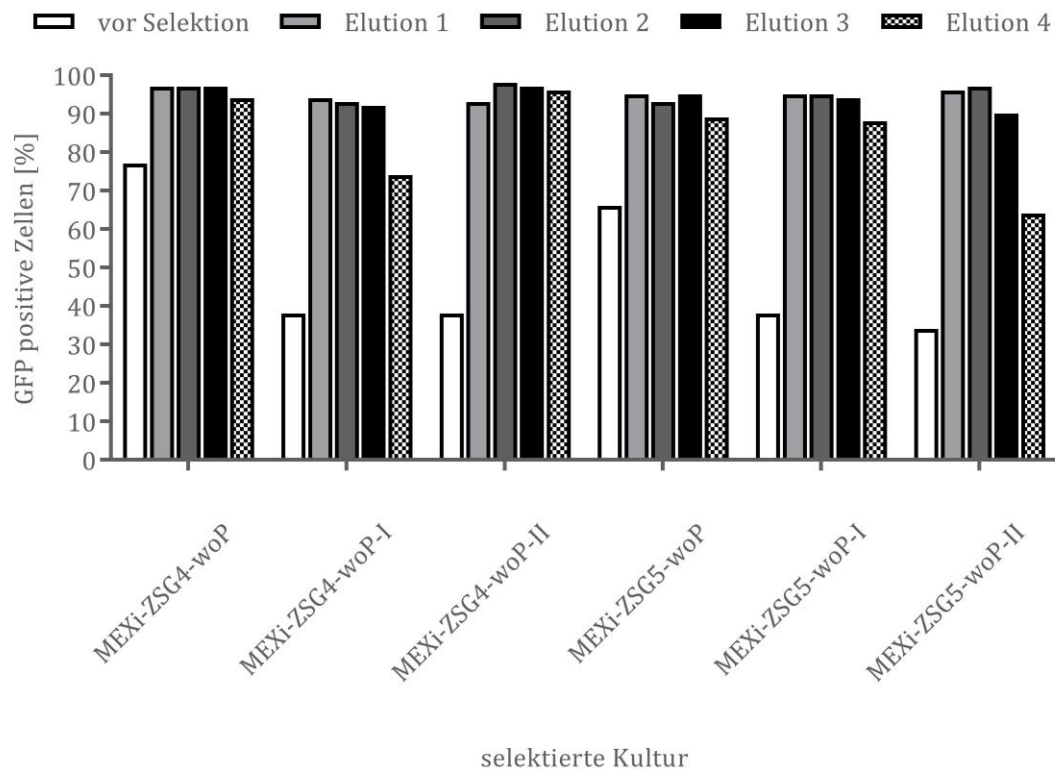


**Abbildung 46:** SEAP-Volumenausbeuten nach siebentägiger Kultivierung von verschiedenen CHO-Kulturen, deren Markergenkassette von einem PGK-Promotor kontrolliert wird. CHO-ZSG5-P wurde ausschließlich mit Puromycin selektiert. CHO-ZSG5-P-I entstand durch STACS-Selektion von CHO-ZSG5-P und CHO-ZSG5-P-II-E3 wurde durch STACS-Selektion von CHO-ZSG5-P-I gewonnen. CHO-ZSG5-woP-III wurde durch konsekutive STACS-Selektionen und ohne Puromycinselektion gewonnen.

#### 5.4.5 Herstellung einer stabilen SEAP-exprimierenden MEXi-Zellkultur durch ausschließliche Verwendung von STACS

Neben der Selektion von CHO-Zellen wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob auch MEXi-293E-Zellen ausschließlich mit STACS selektiert werden können, um eine stabil exprimierende Kultur zu erhalten. Ein vorheriger Versuch, stabile MEXi-293E-Zellen mittels Puromycinselektion zu generieren, scheiterte. Entweder waren Viabilität und Zellwachstum zu gering oder der Anteil GFP-positiver Zellen war zu niedrig (Daten nicht gezeigt). Es wurden MEXi-293E-Zellen mit pZSG4 oder pZSG5 transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Kulturen mittels STACS selektiert und die Elutionsfraktionen 1–4 vereinigt und weiter kultiviert (MEXi-ZSG4-woP-I, MEXi-ZSG5-woP-I). Drei Tage später wurden die Kulturen erneut selektiert wobei die Elutionen 1–4 gepoolt und kultiviert wurden (MEXi-ZSG4-woP-II, MEXi-ZSG5-woP-II). Weitere vier Tage danach wurden die Zellen ein letztes Mal selektiert und die Fraktionen 1–4 (MEXi-ZSG4-woP-III) bzw. 1–3 (MEXi-ZSG5-woP-III) vereinigt. In beiden Kulturen wurde eine Zelldichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und die Kulturen wurden in 50 ml TubeSpin® Bioreaktoren für vier Tage kultiviert. Am Tag vier wurde von jeder Kultur eine Probe des Kulturüberstandes entnommen und die SEAP-Konzentration im Überstand mittels eines BLItz® Systems gemessen. Eine detaillierte Aufstellung der STACS-Selektionsbedingungen findet sich in Kapitel 7.2.

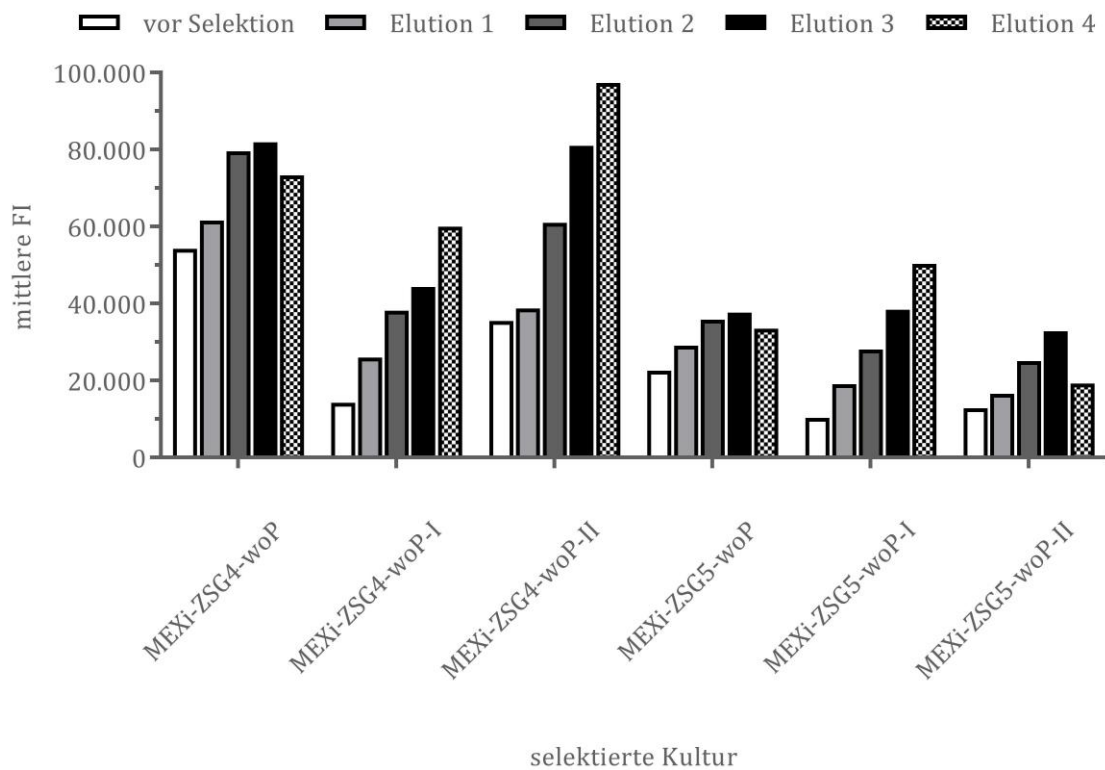
Die Ergebnisse der jeweiligen Selektionen ähneln denen der CHO-Selektion in Kapitel 5.4.3. Auch bei den MEXi-293E-Zellen kann der Anteil an GFP-positiven Zellen mittels STACS im Vergleich zur Ausgangskultur erhöht werden. In der Regel exprimieren in den Elutionsfraktionen über 90 % der selektierten Zellen das Markerprotein (Abbildung 47). Ein geringerer Anteil an GFP-positiven Zellen in einigen der vierten Elutionsfraktionen kann auf eine geringe Menge an eluierten Zellen in der Fraktion zurückgeführt werden. Da sich auch immer *Microbeads* in den Proben befanden, welche nicht fluoreszieren aber in den Gates nicht vollständig von den Zellen separiert werden können, führen geringe Zellmengen dazu, dass der relative Anteil an *Microbeads* in der Probe steigt. Dies verringert bei sehr geringen Zellausbeuten in der Fraktion den relativen Anteil GFP-positiver Zellen.



**Abbildung 47:** Anreicherung von pZSG4- und pZSG5-positiven MEXi-293E-Zellen in Elution 1 bis Elution 4 mittels der STACS-Methode aus der jeweiligen Ausgangskultur. MEXi-ZSG4-woP und MEXi-ZSG5-woP wurden zwei Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstanden MEXi-ZSG4-woP-I und MEXi-ZSG5-woP-I, welche drei Tage später ebenfalls selektiert wurden. Die daraus resultierenden Kulturen MEXi-ZSG4-woP-II und MEXi-ZSG5-woP-II wurden nach weiteren vier Tagen selektiert.

Wie erwartet, erhöht sich im Vergleich zur jeweiligen Ausgangspopulation durch die STACS-Selektion auch die Expression des Markerproteins in den Elutionsfraktionen. Dabei steigt mit zunehmender Elutionsfraktion in der Regel auch die mittlere FI (Abbildung 48). Ähnlich der Selektion von CHO-Zellen ist auch bei den MEXi-293E-Zellen der höchste relative Anstieg der Expression bei der zweiten STACS-Selektion der Zellen zu verzeichnen. Bei der Selektion der Kultur MEXi-ZSG4-woP-I wird die Markerexpression in der letzten Elution um das 4,3-fache der Expression der Kultur vor der Selektion gesteigert. Im Falle der Selektion der Kultur MEXi-ZSG5-woP-I steigt die FI um das 4,9-fache. Die höchste Markerexpression mit einer FI von 97.301 wird in der vierten Elution der STACS-Selektion von Kultur MEXi-ZSG4-woP-II erreicht.

Bei ZSG5-Kulturen wird die höchste mittlere FI mit ca. 50.000 in der vierten Elution der zweiten STACS-Selektion gemessen.

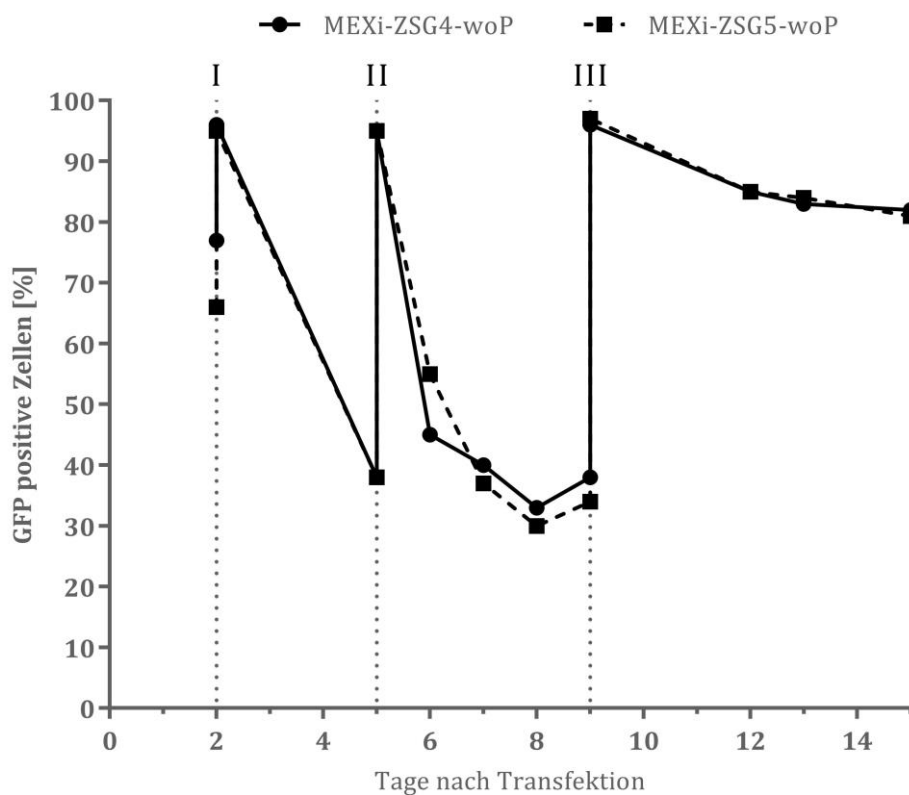


**Abbildung 48:** Mittlere Fluoreszenzintensität (FI) von pZSG4- und pZSG5-positiven MEXi-293E-Zellen in Elution 1 bis Elution 4 mittels der STACS-Methode aus der jeweiligen Ausgangskultur. MEXi-ZSG4-woP und MEXi-ZSG5-woP wurden zwei Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstanden MEXi-ZSG4-woP-I und MEXi-ZSG5-woP-I, welche drei Tage später ebenfalls selektiert wurden. Die daraus resultierenden Kulturen MEXi-ZSG4-woP-II und MEXi-ZSG5-woP-II wurden nach weiteren vier Tagen selektiert.

Der Anteil der GFP-positiven und damit Markerprotein exprimierenden Zellen in Abbildung 49 folgt in beiden Kulturen MEXi-ZSG4 und MEXi-ZSG5 einem vergleichbaren Verlauf. Bis zu sechs Tagen nach der Transfektion ist die Expression vor allem transient, wie an der schnellen Verringerung des Anteils GFP-positiver Zellen von über 90 % auf 30–60 % in den Kulturen nach einer Selektion zu erkennen ist. Nach dem sechsten Tag stabilisiert sich die Kurve zwischen 30 % und 40 %. Nach der dritten Selektionsrunde erhöht sich der Anteil GFP-positiver Zellen auf über 95 % und sinkt dann in den nächsten sechs Tagen moderat auf 81 %. Somit ist in Bezug auf



den Anteil GFP-positiver und damit Markergenexprimierender Zellen die Expressionskontrolle durch eine IRES oder einen PGK-Promotor gleichermaßen geeignet.

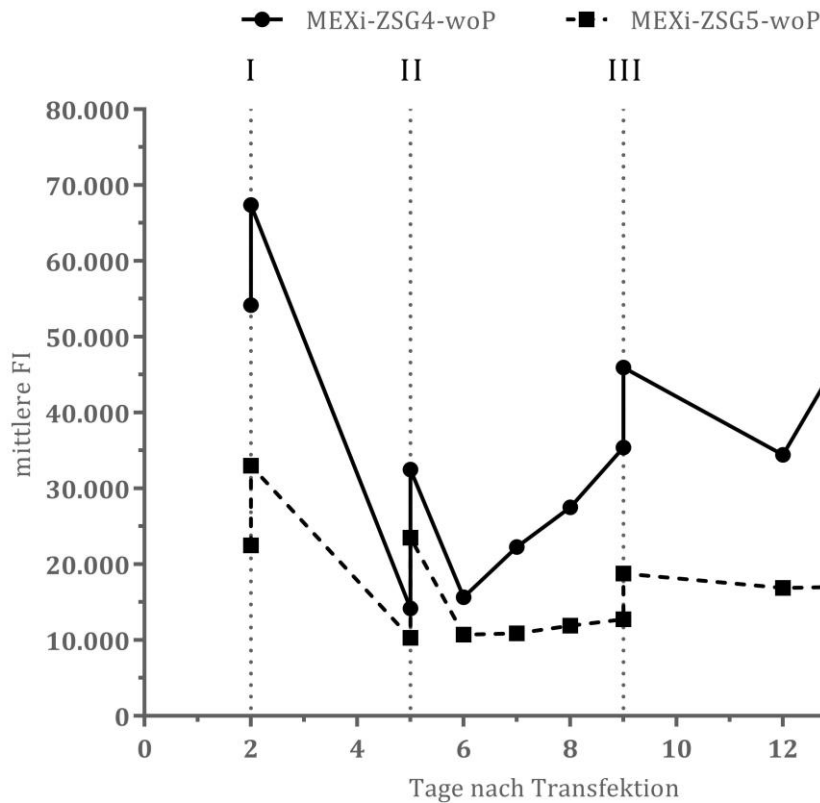


**Abbildung 49:** Verlauf des Anteils GFP-positiver MEXi-293E-Zellen nach STACS-Selektionen. Vertikale gepunktete Linien markieren den Zeitpunkt der STACS-Selektionen. MEXi-ZSG4-woP und MEXi-ZSG5-woP wurden zwei Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstand MEXi-ZSG4-woP-I und MEXi-ZSG5-woP-I, welche drei Tage später ebenfalls selektiert wurden. Die daraus resultierenden Kulturen MEXi-ZSG4-woP-II und MEXi-ZSG5-woP-II wurden nach weiteren vier Tagen selektiert.

Auch der Verlauf der Markerauspression bzw. der FI folgt in beiden Kulturen in den ersten sechs Tagen einem transienten Expressionsverlauf. Dabei ist die Markerauspression bei ZSG4-Zellen sichtbar höher als bei ZSG5-Zellen (Abbildung 50). Beispielsweise sinkt nach der ersten Selektion die mittlere FI von über 65.000 (ZSG4) bzw. über 30.000. (ZSG5) auf unter 15.000 Einheiten. Interessanterweise stabilisiert sich der Anteil der positiven Zellen in der ZSG5-Kultur an Tag sechs bei einer FI zwischen 10.738 und 12.777, wohingegen die FI in der Kultur ZSG4 von 15.660 auf 35.428 ansteigt. Diese Beobachtung lässt sich erklären, wenn stabile ZSG4-Zellen

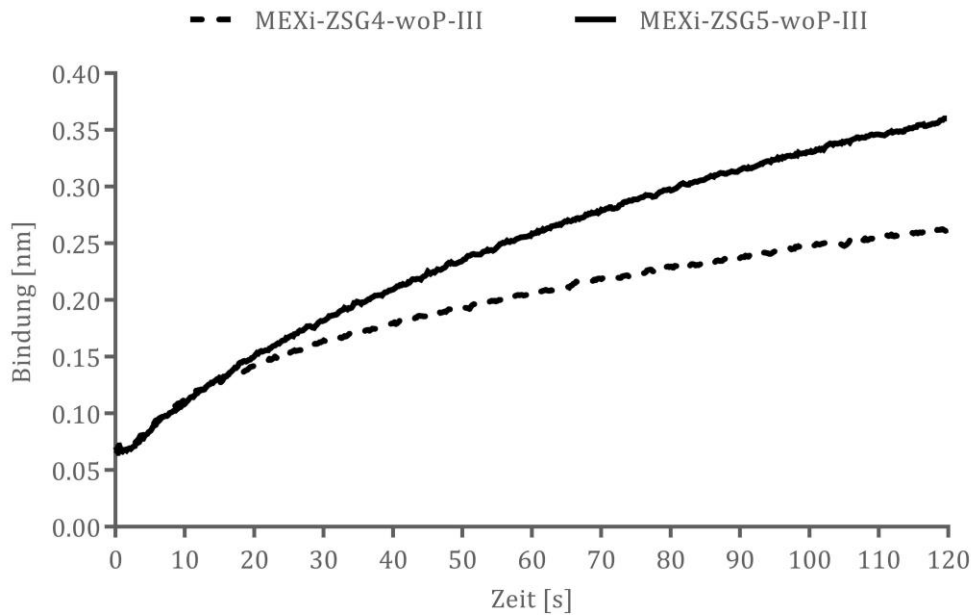
eine höhere Markerexpression aufweisen als stabile ZSG5-Zellen. Unmittelbar nach der zweiten Selektion sind der Anteil GFP-positiver Zellen und die mittlere FI in beiden Kulturen deutlich erhöht. Beide Werte fallen innerhalb der nächsten 24 Stunden, weil transiente Zellen die Expression der eingebrachten DNA verlieren. Gleichzeitig steigt der Anteil der stabilen Zellen unter den verbleibenden GFP-positiven Zellen. Weil diese stabilen Zellen in der ZSG4-Kultur eine hohe Markerexpression aufweisen, erhöht sich auch die mittlere FI. Dagegen ist die FI der stabilen ZSG5-Zellen geringer (Es war keine klare Trennung der Populationen im Gitter der Durchflusszytometeranalyse zu erkennen). Darum wirkt sich das Verschwinden der transienten Zellen aus der GFP-positiven Kultur weniger stark aus und ein Anstieg der FI bleibt bei ZSG5 aus.

Nach der dritten Selektion verläuft die FI in beiden Kulturen im Mittel stabil zwischen 30.000 und 50.000 (ZSG4) bzw. 15.000 und 20.000 (ZSG5). Mittels der abschließlichen Selektion mit STACS entstehen somit nach bereits sechs Tagen und zwei Selektionsrunden stabile Kulturen, wenngleich der Anteil an produzierenden Zellen weniger als 50 % beträgt. Nach der dritten Selektion in lediglich neun Tagen werden stabile Kulturen mit einem hohen Anteil positiver Zellen gewonnen.



**Abbildung 50:** Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität (FI) GFP-positiver MEXi-293E-Zellen nach STACS-Selektionsen. Vertikale gepunktete Linien markieren den Zeitpunkt der STACS-Selektionen. MEXi-ZSG4-woP und MEXi-ZSG5-woP wurden zwei Tage nach der Transfektion selektiert. Aus der Selektion entstand MEXi-ZSG4-woP-I und MEXi-ZSG5-woP-I, welche drei Tage später ebenfalls selektiert wurden. Die daraus resultierenden Kulturen MEXi-ZSG4-woP-II und MEXi-ZSG5-woP-II wurden nach weiteren vier Tagen selektiert.

Die Messung der SEAP-Konzentration im Überstand der beiden Kulturen MEXi-ZSG4-woP-III und MEXi-ZSG5-woP-III nach einer viertägigen Expression zeigt, dass die Expression des Zielproteins SEAP in der ZSG5-Kultur signifikant höher ist als in der Kultur ZSG4 (Abbildung 51). Folglich exprimieren Zellen, deren Markergen von einem PGK-Promotor kontrolliert wird, das POI am Ende der Selektion in höherem Maße als Zellen, deren Markergenexpression durch eine IRES kontrolliert wird.



**Abbildung 51:** Analyse der SEAP-Konzentration mittels BLItz® in den Kulturüberständen der selektierten Kulturen MEXi-ZSG4-woP-III und MEXi-ZSG5-woP-III.

#### 5.4.6 Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente in Kapitel 5.4 zur Selektion von stabilen SEAP-exprimierenden Zellen mittels STACS

Das Ziel der Arbeit ist es, eine Methode zu entwickeln, mit der Zellen selektiert werden können, die eine stabile und im Vergleich zur Antibiotikaselektion erhöhte Expression des POI aufweisen. Im Kapitel 5.4 wird daher die SEAP-Expression zwischen puromycinselektierten Zellen und Zellen, die ausschließlich oder zusätzlich mit der STACS Methode selektiert wurden, verglichen. Außerdem wird untersucht, ob die Expression der Markergene besser durch eine IRES oder einen PGK-Promotor kontrolliert wird.

Die IRES induziert eine höhere Expression des Markerproteins als der PGK-Promotor. In den CHO-Kulturen, welche zunächst mit Puromycin selektiert wurden, ist unmittelbar nach der Transfektion eine höhere mittlere FI in den IRES-kontrollierten Kulturen zu messen. Im CHO-Experiment ohne eine Puromycinselektion werden innerhalb der transienten Expressionsphase bis einschließlich der zweiten STACS-Selektion höhere FI-Werte verzeichnet, wenn eine IRES die Markerproteine kontrolliert. Auch bei MEXi-293E-Zellen führt bis zur einschließlich ersten STACS-Selektion die Verwendung einer IRES zu einer höheren mittleren FI. Die initial höhere

Markergenexpression der IRES-Kultur CHO-ZSG4-P wirkt sich auch auf die Viabilität aus, die aufgrund der an die Markergenexpression gekoppelte Puromycinresistenz höher ist als bei der PGK-kontrollierten CHO-ZSG5-P-Kultur.

Ein wichtiger Aspekt bei der Selektion ist die Stabilität der resultierenden Kultur. Nach einer ausschließlichen Selektion der CHO-Zellen mit Puromycin ist bei der Verwendung einer IRES der Anteil positiver Zellen stabiler als bei der Verwendung eines PGK-Promotors. Allerdings hat sich im Falle der PGK-kontrollierten CHO-ZSG5-P-Kultur zu diesem Zeitpunkt noch kein Plateau der GFP-positiven Zellen ausgebildet. Demnach könnte der Anteil positiver Zellen bei einer fortgeführten Selektion erhöht und ggf. stabilisiert werden. Eine relativ stabile Markergenexpression wird in beiden CHO-ZSG-Kulturen nach 23 Tagen erreicht, wenngleich CHO-ZSG5-P noch einen minimalen Abfall des Expressionslevels aufweist.

In Bezug auf die Expressionsstabilität führt die Verwendung von STACS zu einem signifikanten Vorteil gegenüber einer Antibiotikaselektion. So kann beispielsweise durch eine STACS-Selektion, der mit Puromycin selektierten Kultur CHO-ZSG5-P, die Expressionsstabilität des Markergens in der entstehenden Kultur CHO-ZSG5-P-I deutlich verbessert werden (vgl. Abbildung 36). Wie bereits im Kapitel 5.3.4 vermutet, wird durch eine konsekutive Selektion der puromycinselektierten Kultur CHO-ZSG5-P in insgesamt zwei STACS-Runden sowohl der Anteil an markergenexprimierenden Zellen als auch deren Expressionslevel erhöht und über einen Zeitraum von 70 Tagen stabilisiert. Allerdings bezieht sich die Stabilität über diesen Zeitraum hier nur auf das Membranmarkerprotein. Durch STACS ist es somit möglich, das Problem der instabilen Expression bei einer Antibiotikaselektion nach entfernen des Selektionsdruckes zu verringern. Für industrielle Prozesse sind Zellen verwendbar, die über einen Zeitraum von 70 Tagen mehr als 70 % ihrer ursprünglichen Expression aufweisen.<sup>90</sup>

Erwähnenswert ist der Anstieg der Markergenexpression in der Kultur CHO-ZSG5-P-I unmittelbar nach der Selektion und Kultivierung ohne Puromycin, zumal die GFP-Expression der Kultur CHO-ZSG5-P im Zuge der antibiotikafreien Kultivierung abnimmt. Ein Anstieg positiver Zellen nach Kultivierung ohne Antibiotika konnten auch Lanza et al. beobachten. Die Autoren gehen davon aus, dass dies ein Resultat einer höheren Zellfitness im Zuge des entfallenden Selektionsdruckes ist.<sup>72</sup>

Allerdings ist der Effekt in dieser Arbeit nur bei der Kultur CHO-ZSG5-P-I zu verzeichnen. Es wäre denkbar, dass der Fitnessvorteil in CHO-ZSG5-P durch eine instabile Expression, die durch kontinuierliche Antibiotikaselektion epigenetisch begünstigt wird, nivelliert wird.<sup>26</sup> Aufgrund der STACS-Selektion könnten dagegen Zellen selektiert werden, die die Genkassette in stabilere Loki integriert haben. Für diese These spricht auch der Umstand, dass bei einer ausschließlichen Selektion mittels STACS ein kontinuierlicher Abfall des Anteils GFP-positiver Zellen, wie er bei CHO-ZSG5-P und CHO-ZSG5-P-I ab Tag 26 auftritt, nicht zu erkennen ist. Für eine sichere Analyse müsste dieses Phänomen aber in weiteren Selektionen und Studien beobachtet und untersucht werden.

Tatsächlich stabilisieren sich der Verlauf der GFP-positiven Zellen und der Verlauf der mittleren FI, wie in Kapitel 5.4.3 für CHO-Zellen gezeigt, die nur mit STACS selektiert werden, nach zwölf Tagen. In dem Experiment kann bei der Verwendung des PGK-Promotors im Vergleich zur IRES ein höherer Anteil positiver Zellen nach zwölf Tagen beobachtet werden. Andererseits ist die mittlere FI der IRES-kontrollierten ZSG4-Kultur nach der ersten und zweiten STACS-Selektion deutlich höher. Dieses Ergebnis lässt sich mit der bereits erwähnten, erhöhten Expression der Markergenassette bei Verwendung einer IRES erklären. Eine geringere Expressionsstärke des PGK-Promotors würde dazu führen, dass transiente Zellen die nötige Konzentration des Markerproteins schneller unterschreiten, weil bereits die exprimierte Menge zu Beginn der Kultivierung geringer ist. Somit würden zu einem frühen Zeitpunkt der Selektion stabile Zellen einen größeren Anteil unter den positiven selektierten Zellen aufweisen; vor allem, wenn hochproduzierende Zellen bei der Selektion präferiert werden. Dadurch würde der Anteil positiver Zellen auf einem höheren Niveau stabilisiert werden als in einer Kultur mit mehr transienten Zellen.

Entscheidend ist, dass die SEAP-Expression sowohl in CHO- als auch in MEXI-293E-Zellen, deren Markergenexpression von einem PGK-Promotor statt einer IRES kontrolliert wird, deutlich höher ist (vgl. Kapitel 5.4.2 und 5.4.5). Ein Grund könnte die niedrigere Markergenexpression in PGK-kontrollierten Kulturen nach der Transfektion sein. Daraus resultiert eine höhere Stringenz hinsichtlich der Selektion, die dazu führen kann, dass selektierte PGK-Zellen bei gleicher Markergenexpression eine höhere POI-Expression aufweisen. Eine Schwächung der Markergenexpression

ist eine bewährte Strategie, um die Expression des POI im Zuge eines erhöhten Selektionsdruckes zu verstärken (siehe. Kapitel 2.4.2 und 2.4.3). Tatsächlich wurde in einem begleitenden Experiment während dieser Arbeit festgestellt, dass Zellen während einer Puromycinselektion eine höhere mittlere FI aufwiesen (GFP wurde hier als POI genutzt und war nicht mit einem Markerprotein fusioniert), wenn das Resistenzgen von einem PGK-Promotor statt einer IRES kontrolliert wurde (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren bedeutet eine schwache Expression des Markergens, dass die Zelle weniger Ressourcen für die Markerproteinsynthese investieren muss. Dadurch kann die Zelle mehr Ressourcen für die Expression des POI verwenden.<sup>22</sup>

Insofern wird die Nutzung des PGK-Promotors für die Verwendung der STACS-Technologie in folgenden Experimenten bevorzugt. Sollte jedoch der Anwender aus bestimmten Gründen eine IRES kontrollierte Expression bevorzugen, so ist dies möglich. Außerdem bedeuten diese Ergebnisse nicht, dass eine promotorkontrollierte Expression des Markerproteins in jedem Fall erfolgreicher ist, da keine verschiedenen Promotoren und IRES-Varianten in dieser Arbeit getestet wurden. Die Verwendung einer anderen, z.B. schwächeren IRES-Sequenz oder eines anderen Promotors kann das Selektionsergebnis verändern (siehe Kapitel 2.4.2). Es wäre daher aufschlussreich, in weiteren Studien verschiedene IRES-Sequenzen und Promotoren in Kombination mit STACS zu untersuchen. Insofern zeigen die Ergebnisse zur Kontrolle der Markergenexpression mit MEXi-293E- und CHO-Zellen im Kapitel 5.4, dass prinzipiell sowohl eine IRES als auch ein PGK-Promotor verwendet werden können. Beide Strategien führen zu Zellpopulationen, die das Markergen stabil exprimieren.

Der größte Vorteil der STACS-Technologie ist zweifelsfrei die signifikante Erhöhung der Volumenausbeute bei der Produktion des POI (SEAP) um das 3,4-fache im Vergleich zur Puromycinselektion (vgl. Abbildung 46). Hierfür können zwei Faktoren entscheidend sein. Zum einen wird durch die STACS-Selektion der Anteil an produzierenden Zellen in der Kultur erhöht, da sich nicht produzierende aber dennoch puromycinresistente Zellen in den Kulturen bilden (vgl. Kapitel 5.3.4). Zum anderen wird die Expression des Markergens in STACS-selektierten Populationen erhöht. Da das POI und die Markergene auf einem Plasmid liegen, kann angenommen werden, dass beide in dieselben Loci im Zellgenom integriert werden. Folglich wird bei einer

Integration in aktive, hochexprimierende Loki nicht nur das Markerprotein, sondern auch das POI in höherem Maße exprimiert (siehe Kapitel 2.4). Helman et al. konnten nachweisen, dass eine alleinige Puromycinselektion auch niedrig produzierende Zellen überleben<sup>112</sup>. Tatsächlich dürfte sowohl die Anreicherung der positiven Zellen als auch eine erhöhte Zellproduktivität einen Effekt haben. Vor allem beim Vergleich der beiden Kulturen CHO-ZSG5-P-I und CHO-ZSG5-P-II-E3 lässt sich der 1,6-fache Unterschied in der SEAP-Volumenausbeute nicht nur mit dem 12 % höheren Anteil GFP-positiver Zellen in CHO-ZSG5-P-II-E3 erklären. Beide Kulturen haben einen nahezu identischen Kulturverlauf in Bezug auf die viable Zelldichte. Allerdings ist der Unterschied in der Volumenausbeute zwischen den Kulturen im Kapitel 5.4.4 geringer, als er bei einer Addition der Effekte der Differenz von positiven Zellen und des unterschiedlichen Markergenexpressionslevels der Kulturen zu erwarten wäre.

Dass das Verhältnis der SEAP-Expression zwischen den Kulturen nicht absolut mit der jeweiligen CD4-GFP-Expression übereinstimmt, ist durchaus erwartbar. So können Klone aufgrund epigenetischer Prozesse die Expression des SEAP-Gens oder der Markergen-kassette einstellen, aber weiterhin das jeweils andere Gen exprimieren (siehe Kapitel 2.4.2). Da bei einer zufälligen Integration der eingebrachten DNA in das Genom in der Regel mehrere Integrationen erfolgen, muss dies nicht automatisch zu einem völligen Stopp der POI-Expression führen, sondern kann die Expression lediglich verringern. Dies würde wiederum zu einer geringeren Korrelation der Expression zwischen POI und Markergen führen. Darüber hinaus ist die Stärke eines Promotors auch von dem chromosomalen Ort abhängig, in den die Genkassette integriert wird.<sup>147</sup> Folglich kann das Verhältnis der EF1 $\alpha$ -kontrollierten SEAP-Expression und der PGK-kontrollierten Markerproteinexpression an unterschiedlichen Integrationsorten verschieden sein. Somit führt dies bei einem heterogenen Pool an stabilen Zellen zu einer Varianz der SEAP-Expression bei gegebener Markergenexpression. Zwar können diese Probleme bei Verwendung einer IRES vermieden werden, aber die geringeren SEAP-Ausbeuten in den hier beschriebenen Experimenten sprechen gegen die Verwendung einer IRES. Zu berücksichtigen ist ebenfalls, dass das Membranmarkerprotein mittels F2A-Schnittstelle an die Puromycinresistenz geknüpft ist. Davies et al. konnten eine verminderte Transkription in Zellen beobachten, in denen verschiedene Proteine mit einem F2A-Element in einem einzigen



offenen Leserahmen verbunden waren. Die verminderte mRNA-Menge betraf allerdings auch das nicht in dem Leserahmen eingebettete Markerprotein.<sup>146</sup> Wenn jedoch die Verknüpfung von verschiedenen Proteinen in einem Leserahmen dessen Transkription vermindert, so könnte die Markerproteinexpression geringer ausfallen als die SEAP-Expression.

Besonders interessant ist die Volumenausbeute in der ausschließlich mit STACS selektierten Kultur. Diese besitzt eine vergleichbare Markergenexpression wie die nur mit Puromycin selektierte Kultur und einen 1,6-fach höheren Anteil an exprimierenden Zellen. Dennoch ist die erzielte Volumenausbeute 3,2-mal höher und ähnlich der Ausbeute, die in CHO-ZSG5-P-II-E3 erzielt wird, obwohl CHO-ZSG5-P-II-E3 3,8-mal mehr Markerprotein exprimiert. Daraus lässt sich ableiten, dass die nur mit STACS selektierte Kultur wesentlich mehr SEAP pro Markerprotein produziert als Kulturen, die zuvor mit Puromycin selektiert wurden. Eine Erklärung ist, dass der ständige Selektionsdruck, der durch Puromycin entsteht, vor allem Zellen selektiert, die eine hohe Expression der Markergen-kassette besitzen.<sup>26</sup> Dadurch haben diese Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber Zellen mit einer eher höheren POI-Expression aber einer vergleichsweise geringeren Puromycinresistenz. Ein solcher Einfluss der Puromycinselektion, könnte ebenfalls zu der oben erwähnten quantitativen Abweichung zwischen SEAP-Expression und Markergenexpression in den mit Puromycin vorselektierten Kulturen beitragen.

Abschließend ist anzumerken, dass es nicht möglich war, mittels Puromycin eine stabil exprimierende MEXi-293E-Kultur zu etablieren. Entweder starben während der Selektion alle Zellen oder es wurde keine stabile Expression erzielt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen in Kapitel 5.3.4 überein. Dort kann am Ende der Puromycinselektion nur ein geringer Anteil von weniger als 20 % positiven Zellen gemessen werden. Grund ist offenbar ein in dem Kapitel diskutierter geringer Selektionsfaktor. Auch Lanza et al. konnten in ihrer Studie mittels Puromycin keine stabilen HEK293-Zellen generieren.<sup>72</sup> Ein weiterer Vorteil der STACS-Methode, mit der stabile MEXi-293E-Zellen generiert werden konnten, liegt daher in einem robusteren Selektionsprotokoll, das nicht derartigen Einflüssen unterliegt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass STACS die Expression im Vergleich zu einer Antibiotikaselektion stabilisiert und zudem die Expression der

eingebrachten Genkassetten sowie den Anteil der produzierenden Zellen erhöht. Daraus resultiert eine im Vergleich zur Antibiotikaselektion deutlich erhöhte POI-Ausbeute. Außerdem kann gänzlich auf Antibiotika verzichtet werden und so eine hohe Viabilität der Kultur während der Selektion gewährleistet werden.

## 5.5 Optimierung der STACS-Methode

Der positive Effekt der STACS-Selektion ist in den vorherigen Kapiteln belegt. In diesem Kapitel sollen die Einflussfaktoren auf die STACS-Selektion näher untersucht und optimiert werden. Neben der nötigen Zelldichte während der Bindung mit den magnetischen Beads wird auch die Elution hinsichtlich der Inkubationszeit, der nötigen Biotinkonzentration und weitere Einflussgrößen analysiert.

### 5.5.1 Bestimmung der idealen Zellkonzentration zur Bindung von Zellen an magnetische Microbeads

Die Experimente in den vorangegangenen Kapiteln haben gezeigt, dass die STACS-Methode dazu geeignet ist, stabile hochproduzierende Zellen zu selektieren. In den Experimenten wurden deutlich mehr Zellen eingesetzt, als maximal an den Beads gebunden werden können. Da bei der STACS-Methode die Kosten für die magnetischen Beads den größten ökonomischen Faktor darstellen, kann mit einem deutlichen Überschuss an Zellen gearbeitet werden. Anhand der vorangegangenen Experimente kann die durchschnittliche maximale Bindungskapazität auf  $4 \times 10^5$ – $7 \times 10^5$  Zellen pro  $10 \mu\text{l}$  Bead-Lösung beziffert werden. Im folgenden Experiment wird untersucht, welche Zelldichte nötig ist, um ideale Bindungsbedingungen der Zellen an die Beads zu erzielen.

Hierzu wird ein zweifaktorieller Versuchsplan verwendet, bei dem die Faktoren Inkubationszeit (10 min und 30 min) von Zellen und Beads sowie die Zellkonzentration ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml und  $1 \times 10^7$  Zellen/ml) im Ansatz untersucht werden. Zusätzlich wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml für 20 min mit *Microbeads* inkubiert (

Tabelle 10). Es wurden  $8 \times 10^5$  Zellen der Kultur CHO-ZSG5-P-II-E3 (95 % GFP-positive Zellen) wie in Kapitel 7.1 beschrieben in *Buffer IS* gewaschen und am Ende in  $80 \mu\text{l}$  *Buffer IS* suspendiert. Ausgehend von dieser Zellsuspension wurden die Zellen in den beiden unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten mit

jeweils 10  $\mu\text{l}$  *Microbeads* inkubiert. In allen Ansätzen betrug die gesamte Zellzahl in jedem Ansatz  $1 \times 10^5$  Zellen (bzw.  $9,5 \times 10^4$  GFP-positive Zellen). Die Zell-*Microbead*-Gemische wurden in 0,5 oder 1,5 ml Mikro-Schraubröhren inkubiert. Nach der Inkubation der Ansätze auf dem Rollermixer wurden die Reaktionsgefäße in einen *Magnetic Separator* gestellt und die *Microbeads* vom Überstand separiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellkonzentration im Durchflusszytometer bestimmt. Aus der Analyse wurde der Anteil an nicht gebundenen Zellen im Überstand ermittelt.

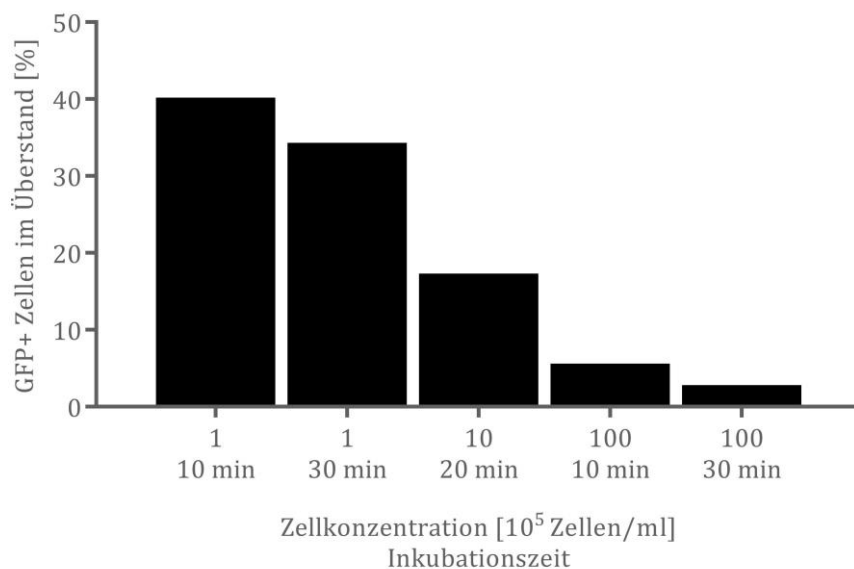
**Tabelle 10:** Darstellung des zweifaktoriellen Designs. Es werden die Faktoren Zelldichte und Inkubationszeit untersucht. Die für jeden Faktor gewählten Stufen sind aufgeführt. Das Volumen aus Beads und Probe ist ebenfalls gelistet. Nach der Inkubation der Zellen mit den Beads werden die Überstände im Durchflusszytometer analysiert und die Anzahl nicht gebundener GFP-positiver (GFP+) Zellen sowie deren prozentualer Anteil von allen ursprünglich mit den Beads inkubierten Zellen bestimmt.

Zelldichte	Inkubationszeit	Gesamtvolumen im Ansatz	GFP+ Zellen im Überstand	GFP+ Zellen im Überstand
[ $10^5$ Zellen/ml]	[min]	[ $\mu\text{l}$ ]	[ $10^4$ Zellen/ml]	[%]
100	30 min	20	0,2632	2,8
100	10 min	20	0,5351	5,6
1	10 min	1000	3,8198	40,2
1	30 min	1000	3,2613	34,3
10	20 min	100	1,6464	17,3

Die Auswertung der Zellen im Überstand (Abbildung 52) sowie die Tabelle 10 zeigen, dass der Anteil an nicht gebundenen Zellen durch die Zellkonzentration beeinflusst wird. Während bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml 34–40 % der eingesetzten Zellen nicht an die *Microbeads* binden, sind es im Fall der hohen Zellkonzentration im Ansatz nur 2,8–5,6 %. Bei dem zum DoE zusätzlich durchgeführte Experiment mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml befinden sich 17 % der eingesetzten Zellen im Überstand. Somit sollte die Zelldichte im Ansatz mindestens  $1 \times 10^7$  Zellen/ml betragen. Im

Gegensatz zur Zellkonzentration hat die Inkubationszeit keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung der Zellen an die Beads. Folglich ist eine zehnminütige Inkubation ausreichend, um Zellen effizient an die *Microbeads* zu binden.

Da bei einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml mehr als 94 % der Zellen an *Microbeads* immobilisiert sind, ist die maximale Kapazität der *Microbeads* mit den hier eingesetzten  $1 \times 10^5$  Zellen nicht erreicht. Eine Betrachtung der Beads unter dem Mikroskop zeigt, dass die Zellen sehr viele Beads gebunden haben und sich noch einige freie Beads in der Lösung befinden. Dies stimmt mit vorherigen Experimenten überein, bei denen die Kapazität zwischen  $4 \times 10^5$ – $7 \times 10^5$  Zellen pro  $10 \mu\text{l}$  Bead-Suspension liegt.



**Abbildung 52:** Anteil GFP-positiver Zellen, die sich nach einer Inkubation von CHO-ZSG5-P-II-E3 Zellen mit *Microbeads* im Überstand befinden. Eine gleiche Anzahl von Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen mit  $10 \mu\text{l}$  *Microbeads* und unterschiedlichen Inkubationszeiten gemischt und anschließend der Überstand in einem Durchflusszytometer analysiert.

#### 5.5.2 Einfluss der Biotinkonzentration von 0,1–7 mM sowie der Inkubationszeit von 3–20 min auf das Elutionsverhalten der Zellen

Die bisher beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass mittels der STACS-Methode hochproduzierende Zellen von gering exprimierenden Zellen separiert werden können. In einem zweifaktoriellen Versuchsplan mit *center point* sollte der

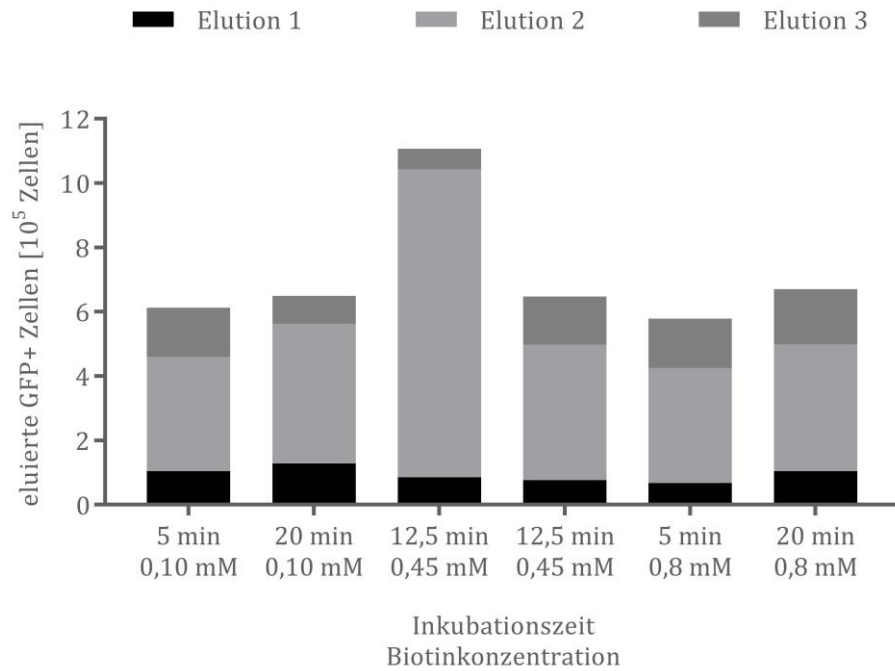
Einfluss der Biotinkonzentration (2 mM, 4,5 mM und 7 mM), der Inkubationszeit während der Elution (3 min, 9 min und 15 min) sowie das Volumen des Elutionspuffers (400 µl, 600 µl und 800 µl) auf die Zellausbeute in der ersten Elution einer STACS-Selektion bestimmt werden. Tatsächlich war nur der Faktor Inkubationszeit bei einem Vertrauensniveau von 95 % signifikant, wobei die Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen nur gering waren (Experiment nicht gezeigt). Zudem wies das Modell nur ein adjustiertes Bestimmtheitsmaß von 0,57 auf, womit das Modell keine verlässliche Aussagekraft hatte. Offensichtlich waren die gewählten Biotinkonzentrationen zu hoch, um einen Unterschied bei der Elution der Zellen in der ersten Elutionsfraktion zu erzielen. Aus diesem Grund wird ein weiteres Experiment mit geringeren Biotinkonzentrationen durchgeführt.

Erneut wurde hierzu ein Versuch mittels statistischer Versuchsplanung durchgeführt. Bei dem zweifaktoriellen Design mit *center point* wurden die Faktoren Biotinkonzentration und Inkubationszeit untersucht (siehe Tabelle 11). Für das Experiment wurden  $1 \times 10^7$  Zellen der stabilen Kultur CHO-ZSG5-P-II-E3 (enthielten 90 % positive Zellen) mit 70 µl *Microbeads* entsprechend der STACS-Methode selektiert. Am Ende der STACS-Waschprozedur wurde das Zell-*Microbead*-Gemisch in 700 µl *Buffer IS* suspendiert und die Suspension auf sechs Ansätze mit jeweils 100 µl in 2 ml Mirko-Schraubröhren verteilt, denen noch 200 µl *Buffer IS* zugefügt wurden. Nach der Inkubation auf einem *Magnetic Separator* wurde der Überstand entfernt und die *Microbeads* in 500 µl Elutionspuffer (*Buffer IS* mit zugesetztem Biotin) suspendiert. Die Elution erfolgte entsprechend des DoE in Tabelle 11. Für die zweite Elution wurden die Zellen abermals in 500 µl des jeweiligen Elutionspuffers inkubiert. Allerdings betrug die Inkubationszeit dieses Mal bei allen Ansätzen 60 min. Im Anschluss an die zweite Elution wurden die Beads in 200 µl CHO-TF-Medium suspendiert, 20 µl entnommen und unter dem Mikroskop betrachtet. Weil sich noch zahlreiche Zellen in den Proben befanden, die jedoch nicht mehr an *Microbeads* gebunden waren, wurden weitere 200 µl Medium zur Probe gegeben und der Überstand dieser Proben als dritte Elutionsfraktion analysiert. Die Analyse der Elutionen erfolgte mittels eines CytoFLEX-Durchflusszytometers.

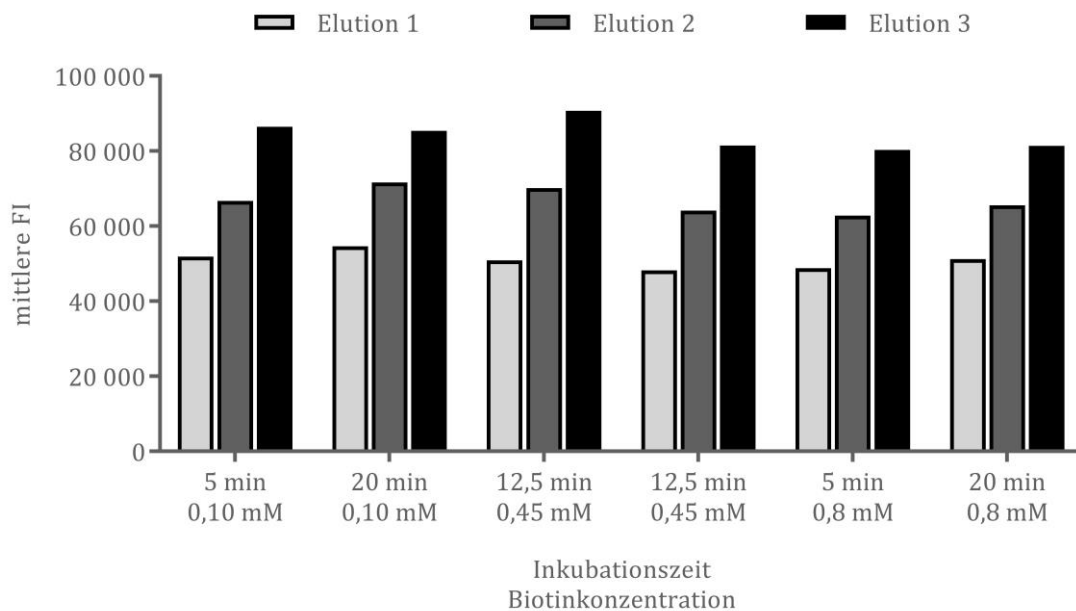
**Tabelle 11:** Darstellung des zweifaktoriellen Designs mit *center point*. Es werden die Faktoren Biotinkonzentration und Inkubationszeit während der Elution untersucht. Die für jeden Faktor gewählten Stufen sind aufgeführt.

Nr.	Biotinkonzentration [mM]	Inkubationszeit [min]
1	0,45	12,5
2	0,10	20,0
3	0,80	5,0
4	0,10	5,0
5	0,80	20,0
6	0,45	12,5

Die Analyse der Daten und die statistische Auswertung des DoE ergibt, dass weder die Biotinkonzentration noch die Inkubationszeit einen signifikanten Einfluss auf die Zahl der in Elution 1 eluierten Zellen haben. Auch auf die Anzahl der eluierten Zellen in Elution 2 hat die Biotinkonzentration keinen signifikanten Einfluss. Beide Faktoren wirkten sich darüber hinaus auch nicht auf die mittlere Fluoreszenzintensität der eluierten Zellen in den Elutionsfraktionen aus. Diese Ergebnisse werden durch die Darstellung der eluierten Zellen in den jeweiligen Fraktionen in Abbildung 53 belegt. Zwar werden bei einer Inkubationszeit von 20 min und 0,8 mM Biotin 1,5-mal mehr Zellen in Elution 1 eluiert als bei einer Inkubation von 5 min, dafür ist der Anteil an eluierten Zellen in der ersten Elution bei einer Inkubation von 12,5 min und einer Biotinkonzentration von 0,45 mM geringer als bei einer Elution mit 0,1 mM Biotin und fünfminütiger Inkubation. Zudem werden bei einer Biotinkonzentration von 0,1 mM Biotin nur 1,2-mal mehr Zellen bei einer längeren Inkubationszeit eluiert. Bei einem der beiden Ansätze mit einer Biotinkonzentration von 0,45 mM wird eine auffällig hohe Anzahl von Zellen in Elution 2 eluiert. Überhaupt fällt auf, dass bei allen Ansätzen der Großteil der Zellen in der zweiten Elutionsfraktion eluiert. Wird die mittlere FI analysiert, so zeigt sich, wie schon in vorherigen Experimenten, dass die FI mit Zunahme der Elutionsfraktion in der eluierten Population ansteigt. Jedoch ist dieser Verlauf in allen Ansätzen vergleichbar (Abbildung 54).



**Abbildung 53:** Anzahl der in den jeweiligen Fraktionen eluierten GFP-positiven CHO-Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit während der ersten Elution und der Biotinkonzentration im Elutionspuffer. Nach der ersten Elution wurden alle Proben 60 min inkubiert. Der Anteil GFP-positiver Zellen betrug in den Elutionsfraktionen über 99 %.



**Abbildung 54:** Mittlere Fluoreszenzintensität (FI) der eluierten GFP-positiven CHO-Zellen in den jeweiligen Elutionsfraktionen in Abhängigkeit der Inkubationszeit während der ersten Elution und der Biotinkonzentration im Elutionspuffer.

### 5.5.3 Einfluss der Biotinkonzentration von 10–100 $\mu\text{M}$ sowie der Inkubationszeit von 30–90 min auf das Elutionsverhalten der Zellen

Im vorangegangenen Kapitel kann weder ein signifikanter Einfluss der Biotinkonzentration noch der Inkubationszeit ermittelt werden. Ein Grund könnte darin liegen, dass die gewählten Biotinkonzentrationen hoch genug waren, um die Zellen effizient von den Beads zu eluieren. Daher könnte eine mögliche kritische Biotinkonzentration erreicht sein, bei der eine höhere Biotinkonzentration nicht zu einer stärkeren Elution führt. Des Weiteren könnten die untersuchten Inkubationszeiten möglicherweise zu gering gewesen sein. Aus diesem Grund wird ein weiteres zweistufiges vollfaktorielles DoE mit *center point* durchgeführt (Tabelle 12). Wieder werden die beiden Faktoren Biotinkonzentration (10  $\mu\text{M}$ , 55  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ) und die Inkubationszeit (30 min, 60 min und 90 min) analysiert. Das Experiment wurde wie in Kapitel 5.5.2 beschrieben durchgeführt. Nach der ersten Elution betrug die gesamte Zeit vom Beginn der Inkubation vor Elution 1 bis zur zweiten Elution in allen Ansätzen 120 min und bis zur dritten Elution 180 min.

**Tabelle 12:** Darstellung des zweifaktoriellen Designs mit *center point*. Es werden die Faktoren Biotinkonzentration und Inkubationszeit während der ersten Elution (E1) untersucht. Die für jeden Faktor gewählten Stufen sind aufgeführt. Außerdem wird die Anzahl eluierter Zellen sowie die mittlere FI in der für die DoE-Auswertung relevanten ersten Elution gelistet.

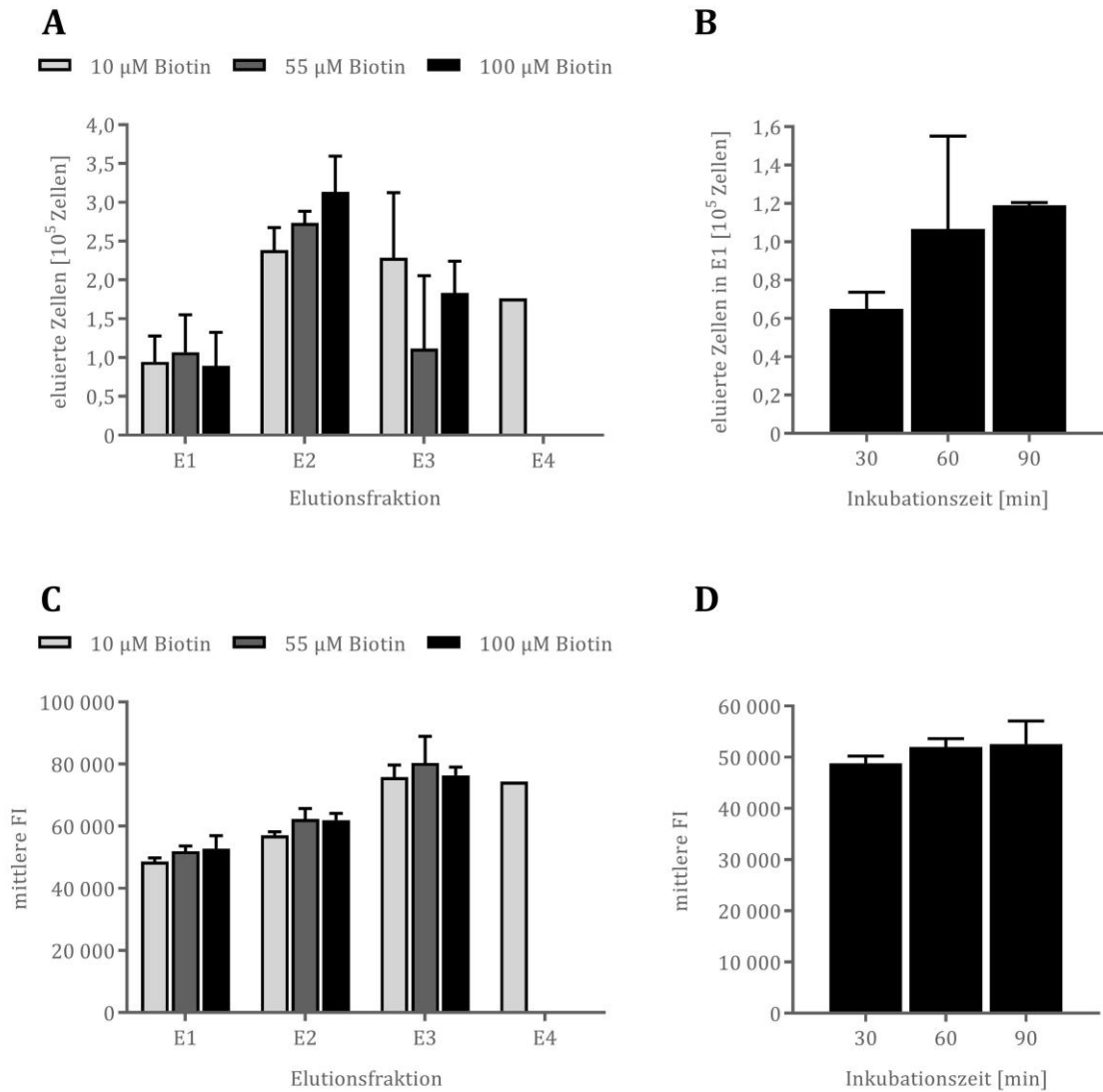
Nr.	Biotinkonzentration [mM]	Inkubationszeit [min]	eluierete Zellen in E1 [ $10^4$ Zellen/ml]	mittlere FI in E1
2	10	90	11,8	49435
3	10	30	7,11	47785
4	100	90	12,0	55762
5	100	30	5,89	49821
1	55	60	14,1	53139
6	55	60	7,26	53139



Die Auswertung des DoE ergibt abermals, dass weder die Biotinkonzentration noch die Inkubationszeit einen signifikanten Effekt auf die eluierte Zellzahl in Elution 1 hat. Allerdings ist die Varianz im *center point* (55  $\mu\text{M}$  Biotin, 60 min Inkubationszeit) sehr hoch, wodurch ein großer Unterschied zwischen einer Inkubation von 30 min und 90 min nötig wäre, um signifikant zu sein (s. Tabelle 12). Wird die Zellausbeute in der ersten Elution in Abhängigkeit der Inkubationszeit betrachtet, so werden bei einer Inkubationszeit von 90 min im Mittel 1,8-mal mehr Zellen eluiert als bei einer Inkubationszeit von 30 min (Abbildung 55 B). Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine längere Inkubationszeit zu einer höheren Zellausbeute führt. Interessanterweise ist der Effekt der Biotinkonzentration auf die Zellausbeute in Elution 2 signifikant, wenngleich der Anstieg der Zellzahl von 10  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$  mit einem Faktor von 1,3 gering ist. Die Fluoreszenzintensität wird nicht durch einen der untersuchten Faktoren signifikant beeinflusst. Auch in der Darstellung der mittleren FI in Abbildung 55 (C, D) ist kein Einfluss der beiden Faktoren zu erkennen. Wenngleich die beiden untersuchten Faktoren keinen oder möglicherweise nur geringen Einfluss auf die Zellausbeute und die mittlere FI haben, so ist deutlich zu erkennen, dass sich sowohl der Anteil an eluierten Zellen als auch die mittlere FI zwischen den Elutionsfraktionen unterscheiden. So eluieren die meisten Zellen in der zweiten Elutionsfraktion und die mittlere FI steigt mit jeder weiteren Fraktion.

Eine Besonderheit bei dem Versuch mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin und 90 min Inkubationszeit besteht darin, dass die Elutionsfraktion 2 versehentlich mit 55  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert wurde. Zwar wurden die Beads sofort nach der Zugabe der 55  $\mu\text{M}$ -Biotinlösung wieder in 10  $\mu\text{M}$  Biotinlösung überführt (Beginn der Inkubation von Elution 3), dennoch wurden vergleichsweise ebenso viele Zellen in Elution 2 eluiert wie in den *Center-Point*-Ansätzen Nr. 1 und Nr. 6 (55  $\mu\text{M}$  Biotin) und nur 19 % mehr Zellen als im Ansatz Nr. 3 (10  $\mu\text{M}$  Biotin) (Tabelle 12). Auch die mittlere FI in der Elution 2 in Ansatz 2 ist auf einem vergleichbaren Niveau wie in den anderen Ansätzen. Aus diesem Ergebnis lässt sich die Vermutung ableiten, dass keine Inkubationszeit nach der ersten Elution nötig ist, um die Zellen effektiv von den Beads zu eluieren. Außerdem entsteht durch die beschriebene zusätzliche Elution im Ansatz Nr. 2 eine vierte Elution. In dieser werden noch einmal ähnlich viele Zellen wie in Elution 3 mit einer vergleichbaren mittleren FI eluiert.

Anhand der Ergebnisse lässt sich resümieren, dass auch die in diesem Experiment gewählten Biotinkonzentrationen von 10–100  $\mu\text{M}$  und Inkubationszeiten von 30–90 min keinen großen Einfluss auf die Elution hinsichtlich der Zellausbeute und der mittleren FI und somit des Expressionslevels der isolierten Zellen in den Elutionsfraktionen haben.

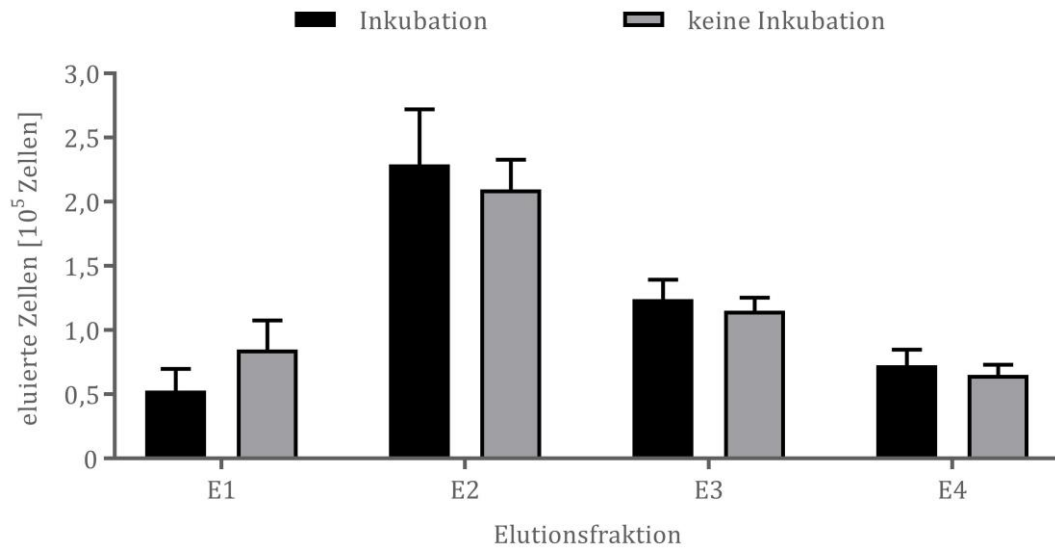


**Abbildung 55:** Elutionsprofil und mittlere FI in Abhängigkeit der Faktoren Biotinkonzentration und Inkubationszeit. Beide Faktoren wurden in einem zweifaktoriellen DoE mit *center point* untersucht. Der Anteil GFP-positiver Zellen in den Elutionsfraktionen lag bei über 97 %. (A) Anzahl der eluierten GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E4 in Abhängigkeit unterschiedlicher Biotinkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 55  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ . (B) Anzahl der eluierten GFP-positiven Zellen in der ersten Elutionsfraktion E1 in Abhängigkeit verschiedener Inkubationszeiten von 30 min, 60 min und 90 min. (C) Mittlere FI GFP-positiver Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E4 in Abhängigkeit unterschiedlicher Biotinkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 55  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ . (D) Mittlere FI GFP-positiver Zellen in der ersten Elutionsfraktion E1 in Abhängigkeit verschiedener Inkubationszeiten von 30 min, 60 min und 90 min.

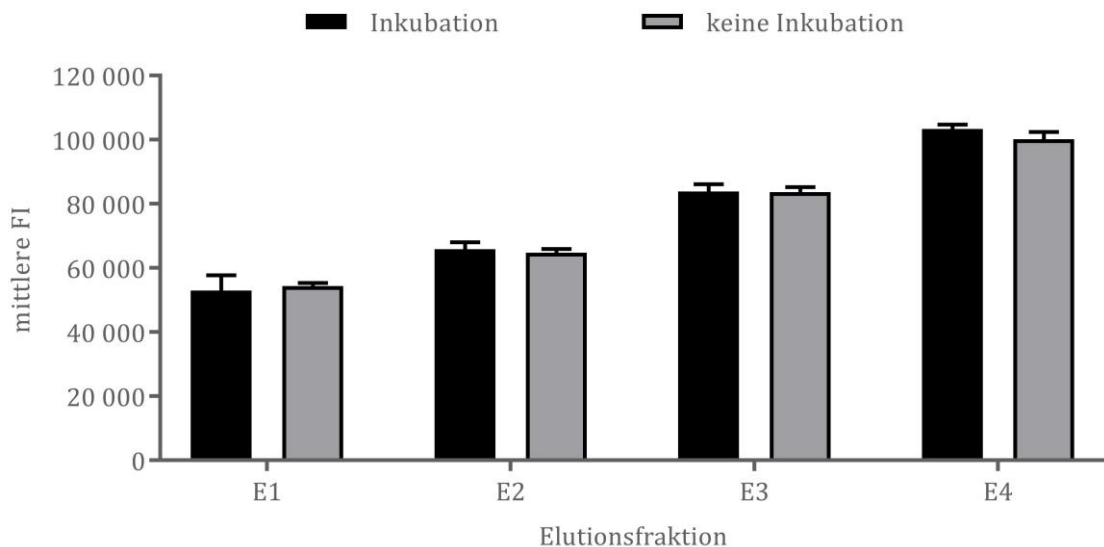
### 5.5.4 Einfluss der Inkubationszeit während der Elution auf die Ausbeute in den Elutionsfraktionen

Im Kapitel 5.5.3 lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine Inkubation zwischen den Elutionsschritten nicht nötig ist und dadurch das Protokoll zeitlich verkürzt werden kann. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Zellen mittels der STACS-Methode selektiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 3,5 ml CHO-TF Medium, welches zusätzlich 10  $\mu$ M Biotin enthielt, resuspendiert und sechs 2 ml Mikroschraubröhren mit jeweils 0,5 ml der Suspension befüllt. Alle Ansätze wurden 30 min inkubiert und anschließend der Überstand als Elution 1 abgenommen. Drei der Ansätze wurden danach drei weitere Male mit jeweils 0,5 ml Elutionsmedium eluiert, wobei zwischen den Elutionen keine Inkubation stattfand und der Überstand sofort nach dem Resuspendieren abgenommen wurde. In den übrigen drei Ansätzen wurden die Zellen nach dem Resuspendieren für 10 min inkubiert, bevor Elution 2 entnommen wurde. Bei Elution 3 wurde erneut für 40 min im Elutionsmedium inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 10 min vor der Abnahme des Überstandes der Elution 4.

Wie aus Abbildung 56 und Abbildung 57 zu erkennen ist, führt eine Inkubation zwischen den Elutionsfraktionen nicht zu einer Veränderung der Zellausbeute des Elutionsprofils der Zellen oder der mittleren FI in den jeweiligen Elutionsfraktionen. Somit kann bei der STACS-Methode auf eine Inkubation zwischen den Elutionsschritten verzichtet werden.



**Abbildung 56:** Anzahl der eluierten GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E4. Vor der ersten Elution wurden alle Zell-Bead-Gemische für 30 min im Elutionspuffer inkubiert. Somit sind die Versuchbedingungen in E1 in allen Ansätzen identisch. Anschließend wurden die Ansätze ohne Inkubation zwischen den weiteren Elutionsschritten eluiert (keine Inkubation) oder 10 min, 40 min und 10 min nach Elution 1, 2 und 3 inkubiert (Inkubation). Der Anteil der GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen lag bei über 99 %.



**Abbildung 57:** Mittlere FI der eluierten GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E4. Vor der ersten Elution wurden alle Zell-Bead-Gemische für 30 min im Elutionspuffer inkubiert. Somit sind die Versuchbedingungen in E1 in allen Ansätzen identisch. Anschließend wurden die Ansätze ohne Inkubation zwischen den weiteren Elutionsschritten eluiert (keine Inkubation) oder 10 min, 40 min und 10 min nach Elution 1, 2 und 3 inkubiert (Inkubation).

### 5.5.5 Einfluss von Scherkräften und Biotinkonzentrationen von 1–10 $\mu\text{M}$ auf die Elution

Da Biotinkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  bis 7 mM nach den bisherigen Untersuchungen keinen nachweisbaren Einfluss auf das Elutionsverhalten der Zellen haben, wird geprüft, ob auch eine sehr geringe Biotinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  zur Elution von Zellen ausreichend ist. Außerdem ist es erstaunlich, dass sich in vorangegangenen Kapiteln die mittlere FI während der Elution mit steigender Fraktionszahl erhöht, obwohl weder die getesteten Biotinkonzentrationen noch die Inkubationszeiten einen deutlichen Einfluss auf die Elution haben. Es wäre zu erwarten, dass nahezu alle Zellen in der ersten Elution eluieren, wenn die eingesetzten Biotinkonzentrationen und Inkubationszeiten ausreichend sind. Daher ist zu vermuten, dass ein weiterer Faktor Einfluss auf die Elution hat. Aus diesem Grund wird die These überprüft, dass Scherkräfte zur Elution der Zellen beitragen, da nach jeder Elution die Zellen resuspendiert und somit weiterem Scherstress ausgesetzt werden.

Für das Experiment wurden CHO- Zellen einen Tag nach der Transfektion mit einem pZSG5-Vektor mittels STACS selektiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden  $2 \times 10^7$  Zellen in 500  $\mu\text{l}$  *Buffer IS* resuspendiert und vier 2 ml Mirko-Schraubröhren mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  des Zell-Bead-Mix sowie 200  $\mu\text{l}$  *Buffer IS* befüllt. Anschließend wurde der Überstand nach Inkubation auf einem Magneten abgenommen und die Magnet-Beads mit 500  $\mu\text{l}$  *Buffer IS* mit einer Biotinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  resuspendiert (jeweils zwei Ansätze pro Biotinkonzentration). Nach 10 min Inkubation wurden die Zellen von den Beads getrennt. Es folgte die sofortige Resuspension der Magnet-Beads mit dem entsprechenden Elutionspuffer und die unmittelbare Trennung der eluierten Zellen von den Beads. Die Prozedur wurde viermal wiederholt. Für jede Biotinkonzentration wurden die Ansätze entweder mittels Pipettieren resuspendiert oder mittels eines Vortexmischers ( $2 \times 5$  Sekunden, Stufe 7). Im Anschluss an die vierte Elution wurden alle Ansätze noch einmal mit 1 mM Biotin eluiert. Der Versuch ist in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13:** Übersicht zu dem in diesem Kapitel beschriebenen Experiment. Es wird der Einfluss der Biotinkonzentration und der Resuspensionsmethode während der Elution untersucht. Proben wurden bei zwei verschiedenen Biotinkonzentrationen eluiert und entweder mittels Vortexmischer oder Auf- und Abpipettieren suspendiert.

Biotinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Resuspensionsmethode
1	Vortexmischer
1	Pipette
10	Vortexmischer
10	Pipette

Anders als in den vorherigen Experimenten, ist in diesem Versuch ein eindeutiger Einfluss der Biotinkonzentration auf die Elution der Zellen festzustellen. Wird eine geringe Biotinkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  eingesetzt, können offenbar nur gering exprimierende Zellen eluiert werden. Dagegen führt der Einsatz von  $10 \mu\text{M}$  Biotin dazu, dass auch hochproduzierende Zellen von den Beads dissoziieren, wodurch sich die mittlere FI im Laufe der Elution erhöht. So werden vor allem ab der zweiten Elution mehr Zellen bei einer Biotinkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  in den Elutionsfraktionen eluiert als bei einer Biotinkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  (Abbildung 58). Während die Anzahl eluierter Zellen bei einer Biotinkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  ab der zweiten Elution eine Menge von  $2,7 \times 10^4$  Zellen nicht überschreitet, liegt die Zahl eluierter Zellen bei  $10 \mu\text{M}$  Biotin in allen Elutionsfraktionen bei über  $4 \times 10^4$  Zellen. In Elution 3 überschreitet sie  $6 \times 10^4$  Zellen und in Elution 2  $1 \times 10^5$  Zellen.

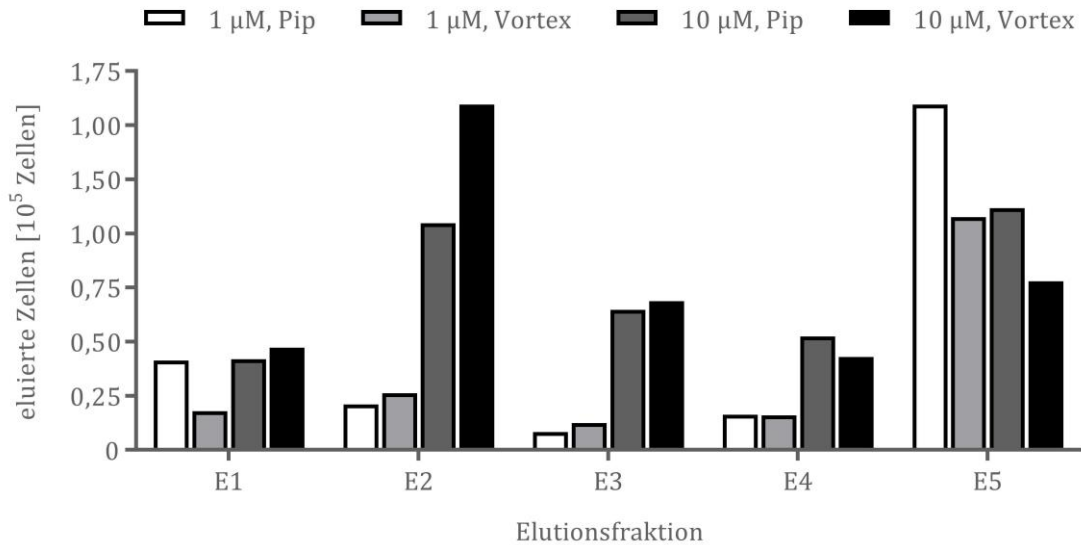
Die Ursache für den Unterschied der Elutionsverläufe wird aus der mittleren FI in Abbildung 59 ersichtlich. Die mittlere FI der mit  $1 \mu\text{M}$  Biotin eluierten Zellen liegt in allen Fraktionen (mit Ausnahme von Elution 5) zwischen 26.439 und 33.848, so dass keine Zunahme des Anteils von hochproduzierenden Zellen zu verzeichnen ist, der in einem Anstieg der mittleren FI resultieren würde. Weil Zellen und vor allem hochproduzierende Zellen bei  $1 \mu\text{M}$  Biotin nicht effektiv eluiert werden können, ist der Anteil an eluierten Zellen bei  $1 \mu\text{M}$  Biotin insgesamt und über die Fraktionen verteilt gering. Auch die Ergebnisse der Elution 5 untermauern diese Erkenntnis. Sobald mit  $1 \text{ mM}$  Biotin eluiert wird, steigt die mittlere FI. Außerdem ist die Menge

eluierten Zellen allein in Elutionsfraktion 5 höher als die Summe aller zuvor in Elution 1 bis Elution 4 eluierten Zellen.

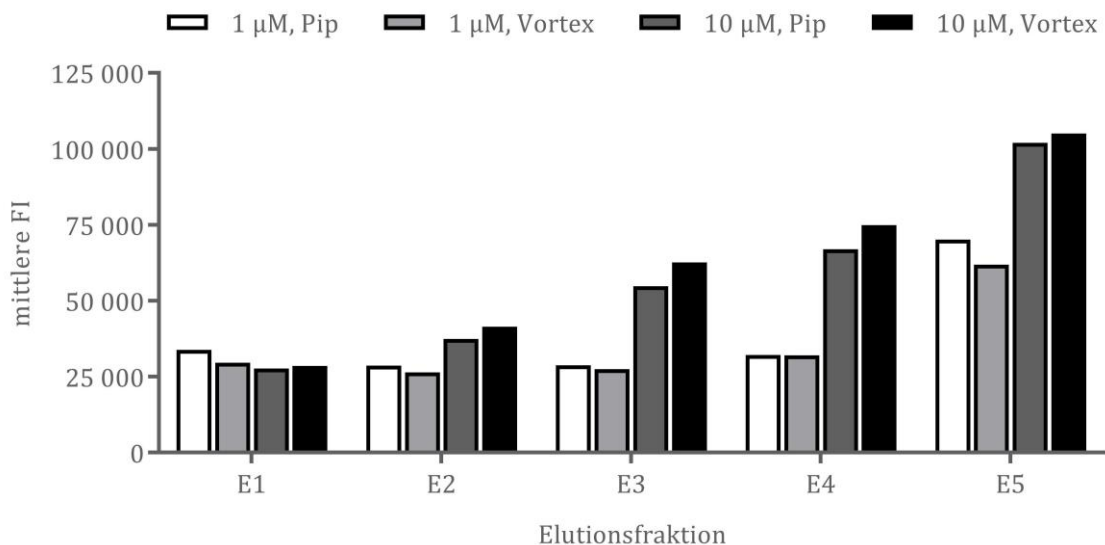
Wird dagegen mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert, können auch höher produzierende Zellen eluiert werden. In der ersten Elution befindet sich die mittlere FI noch auf einem vergleichbaren Niveau wie bei einer Elution mit 1  $\mu\text{M}$  Biotin. Ab der zweiten Elution nimmt dann bei einer Elution mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin die mittlere FI mit jeder weiteren Fraktion zu und liegt am Ende in der vierten Elution über dem zweifachen Wert der Elution 4 bei 1  $\mu\text{M}$  Biotin. Allerdings wird auch nach einer Elution mit 10  $\mu\text{M}$  die Menge an eluierten Zellen noch einmal deutlich gesteigert, wenn in Elution 5 mit 1 mM Biotin eluiert wird. Auch die mittlere FI in Elution 5 erhöht sich noch einmal im Vergleich zu Elution 4. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Experiment eine Elution mit 1 mM Biotin zu einer schärferen Elution führen könnte.

Zu Beginn des Kapitels wird die Überlegung angestellt, dass der beobachtete Anstieg von eluierten, hochproduzierenden Zellen in den Fraktionen auf das mehrfache Suspendieren der Zellen im Zuge der Elutionen zurückzuführen sein könnte. Tatsächlich lässt sich diese These aus den Ergebnissen nicht bestätigen. Weder bei einer Elution mit 1  $\mu\text{M}$  Biotin noch bei einer Elution mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin ist ein konsistenter Unterschied der mittleren FI zwischen pipettierten Proben und Proben, die auf einem Vortexmischer suspendiert wurden, zu verzeichnen. Zwar werden in der zweiten Elution in den Ansätzen mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin 1,5-mal mehr Zellen eluiert, wenn mittels eines Vortexmischers suspendiert wird, dafür werden in der ersten Elution im Experiment mit 1  $\mu\text{M}$  Biotin 2,3-mal mehr Zellen eluiert, wenn die Resuspension mit einer Pipette erfolgt. Auch in der Elution 5 werden im 1  $\mu\text{M}$  Biotin-Ansatz mittels Pipettieren 1,5-mal mehr Zellen eluiert. In den anderen Fraktionen ist der Anteil der eluierten Zellen zwischen den beiden Suspensionstechniken vergleichbar. Es wäre denkbar, dass Scherkräfte nur bei einer höheren Biotinkonzentration einen Effekt haben und deshalb mehr Zellen in Elution 2 nach dem Mischen auf einem Vortexmischer eluieren. Allerdings müsste dieser Effekt dann schon in Elution 1 auftreten. Da angenommen werden kann, dass die Scherkräfte bei vorsichtigem Pipettieren und der Durchmischung mittels eines Vortexmischers unterschiedlich sind, ist es unwahrscheinlich, dass Scherkräfte einen starken Einfluss auf das Elutionsprofil haben.





**Abbildung 58:** Anzahl der eluierten GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E5. Elution 1–4 wurden mit 1  $\mu\text{M}$  Biotin oder 10  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert. Elution 5 wurde in allen Experimenten mit 1 mM Biotin eluiert. In jeweils einem Ansatz pro Biotinkonzentration wurde der Zell-Bead-Mix nach Abnahme des Überstandes entweder mittels Pipettierens (Pip) oder auf einem Vortexmischer (Vortex) resuspendiert. Der Anteil der GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen lag bei über 95 % und in den meisten Fällen bei über 98 %.



**Abbildung 59:** Mittlere FI der eluierten GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E5. Elution 1–4 wurden mit 1  $\mu\text{M}$  Biotin oder 10  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert. Elution 5 wurde in allen Experimenten mit 1 mM Biotin eluiert. In jeweils einem Ansatz pro Biotinkonzentration wurden der Zell-Bead-Mix nach Abnahme des Überstandes entweder mittels Pipettierens (Pip) oder auf einem Vortexmischer (Vortex) resuspendiert.

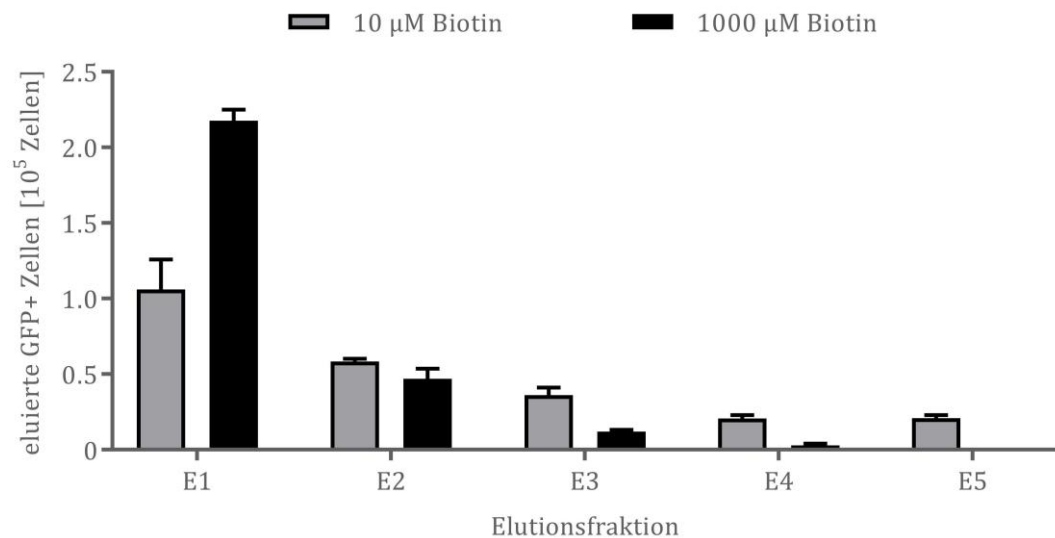
Zusammenfassend wird in diesem Experiment bei sehr geringen Biotinkonzentrationen ein Effekt der Biotinkonzentration auf die Elution nachgewiesen, wobei bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Biotin Zellen nicht effizient eluiert werden. Neben den gewählten Biotinkonzentrationen ist ein weiterer wichtiger Unterschied zu den vorherigen Optimierungsexperimenten, dass hier keine stabile, sondern eine transient exprimierende Kultur verwendet wurde. Transiente Kulturen weisen 1–3 Tage nach der Transfektion eine heterogenere Expression auf als bereits mehrfach selektierte Kulturen. Es ist daher möglich, dass sich der Effekt der Biotinkonzentration eher bei einer höheren Heterogenität der Expression nachweisen lässt. Eine Zunahme an Scherkräften als Ursache für die fraktionierte Elution der Zellen kann jedoch nach den Ergebnissen in diesem Kapitel weitestgehend ausgeschlossen werden.

### 5.5.6 Einfluss der Biotinkonzentration von 1,5 $\mu\text{M}$ –1 mM auf die Selektion von transient exprimierenden MEXi-293E- und CHO-Kulturen

Aufgrund der Ergebnisse im vorherigen Kapitel und einem möglichen Unterschied zwischen der Selektion von bereits selektierten und transienten Kulturen wird anhand von transient exprimierenden Kulturen untersucht, ob sich Biotinkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  bis 1 mM auf das Selektionsergebnis auswirken. Da im vorherigen Kapitel nur CHO-Zellen verwendet wurden, wird im Falle von MEXi-293E-Zellen zusätzlich die Selektion mit 1  $\mu\text{M}$  Biotin durchgeführt.

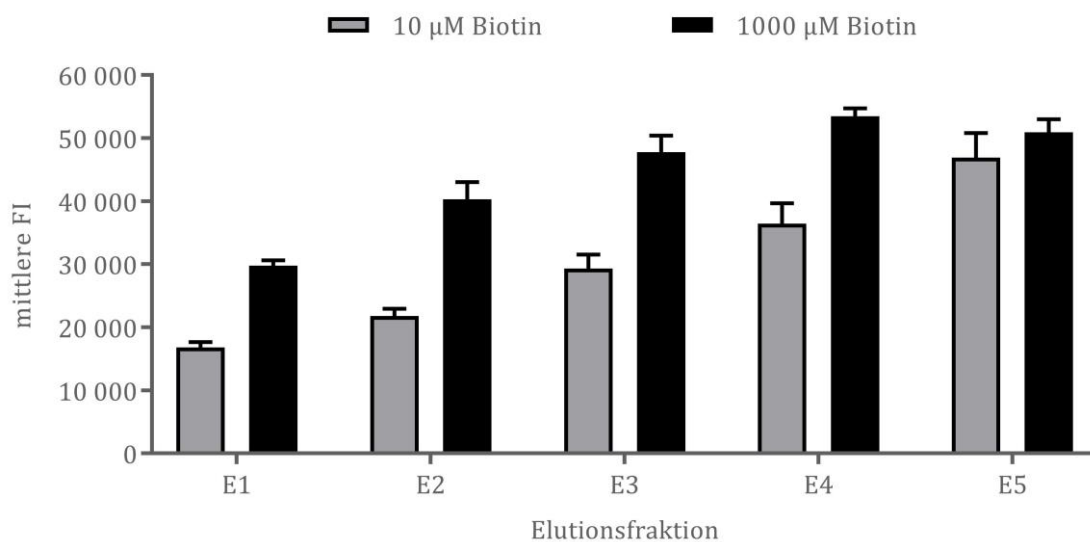
Für das Experiment wurden CHO-Zellen zwei Tage nach der Transfektion mittels STACS, wie in Kapitel 5.5.5 beschrieben, selektiert, wobei die Zellen nur auf einem Vortexmischer resuspendiert wurden. Zwei Ansätze wurden mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin und zwei weitere mit 1 mM Biotin eluiert. MEXi-293E-Zellen wurden ebenfalls zwei Tage nach der Transfektion mittels STACS selektiert. Dazu wurden nach dem letzten Waschschrift  $1,1 \times 10^7$  Zellen in 700  $\mu\text{l}$  MEXi-TM resuspendiert und in sechs Ansätze mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  verteilt. Eluiert wurden immer zwei Ansätze mit jeweils 0,5 ml MEXi-CM-Medium und einer Biotinkonzentration von 1,5  $\mu\text{M}$ , 10,5  $\mu\text{M}$  oder 1 mM (MEXi-CM-Medium enthält bereits 0,5  $\mu\text{M}$  Biotin, welches zu dem zugesetzten Biotin hinzugerechnet werden muss). Sowohl in den Experimenten mit CHO-Zellen als auch MEXi-293E-Zellen wurden nach der vierten Elution noch einmal alle Ansätze mit 1 mM Biotin eluiert.

Bei der Selektion der CHO-Zellen ist ein Einfluss der Biotinkonzentration anhand der Ergebnisse in Abbildung 60 und Abbildung 61 zu verzeichnen. So unterscheidet sich die Anzahl der eluierten Zellen in den Fraktionen zwischen den beiden Biotinkonzentrationen (Abbildung 60). Die Grafik zeigt, dass bei einer hohen Biotinkonzentration von 1 mM 78 % der Zellen in der ersten Elution eluieren. Bei 10  $\mu\text{M}$  Biotin sind es nur 48 % der Zellen, die in Elution 1 eluiert werden. Damit werden bei einer Biotinkonzentration von 1 mM  $1,12 \times 10^5$  mehr Zellen in der ersten Elution isoliert. Aufgrund der großen Menge an in Elution 1 eluierten Zellen, werden in den weiteren Elutionen bei einer Biotinkonzentration von 1 mM weniger Zellen eluiert als bei 10  $\mu\text{M}$ . Insgesamt werden bei einer Biotinkonzentration von 1 mM 26 % mehr Zellen in Elution 1 bis Elution 4 eluiert als bei 10  $\mu\text{M}$  Biotin.



**Abbildung 60:** Anzahl der eluierten GFP-positiven CHO-Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E5. Elution 1–4 wurden mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin oder 1000  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert. Elution 5 wurde in allen Experimenten mit 1000  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert. In den Experimenten mit 1000  $\mu\text{M}$  ist die Menge eluierter Zellen in E5 mit < 1000 Zellen zu gering, um in der Grafik noch angezeigt zu werden. Der Anteil der GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen bei einer Elution mit 10  $\mu\text{M}$  lag bei über 92 %. In den Fraktionen E1 und E2 betrug der Anteil GFP-positiver Zellen bei einer Elution mit 1000  $\mu\text{M}$  mehr als 95 %. Aufgrund geringer Zellzahlen und der verbliebenen nicht fluoreszierenden *Microbeads*, die sich zum Teil in der vermessenen Population der eluierten Zellen befanden, sank dieser Anteil bei einer Elution mit 1000  $\mu\text{M}$  auf 87 % in E3 und auf unter 77 % in den folgenden Elutionen E4 und E5.

Auch auf die mittlere FI der Zellpopulation in den Fraktionen hat die Biotinkonzentration einen nachweisbaren Einfluss (Abbildung 61). In allen Fraktionen sind die mittleren FI-Werte bei einer Elution mit 1 mM Biotin höher als in den jeweiligen Elutionsfraktionen, die mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert wurden. Da die mittlere FI in der fünften Elution bei den 1 mM Biotin-Experimenten nicht mehr steigt und auch die Zahl eluierter Zellen gering ist, können hochproduzierende Zellen in den vorherigen Elutionen effizient von den *Microbeads* dissoziiert werden. Dagegen steigt in den Ansätzen mit einer Elution bei 10  $\mu\text{M}$  Biotin die mittlere FI in Elution 5 noch einmal und es können ähnlich viele Zellen wie in Elution 4 gewonnen werden. Daraus lässt sich folgern, dass nicht alle hochproduzierenden Zellen in den vorherigen Elutionen mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert werden können, bzw. weitere Elutionen mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin nötig wären, um sämtliche hochproduzierenden Zellen zu eluieren.

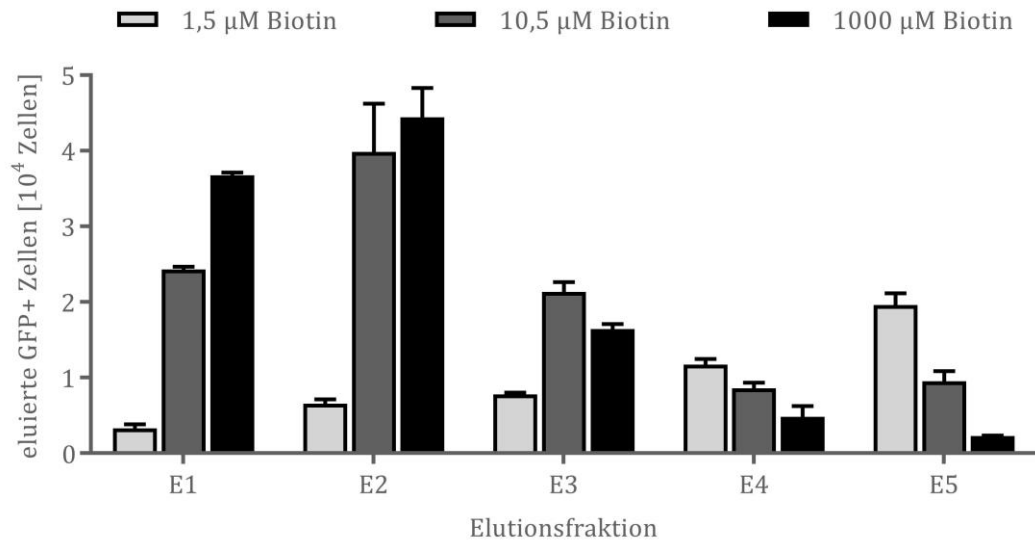


**Abbildung 61:** Mittlere FI der eluierten GFP-positiven CHO-Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E5. Elution 1–4 wurden mit 10  $\mu\text{M}$  Biotin oder 1000  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert. Elution 5 wurde in allen Experimenten mit 1000  $\mu\text{M}$  Biotin eluiert. Die mittlere FI der Ursprungskultur vor der Selektion betrug 25.493.

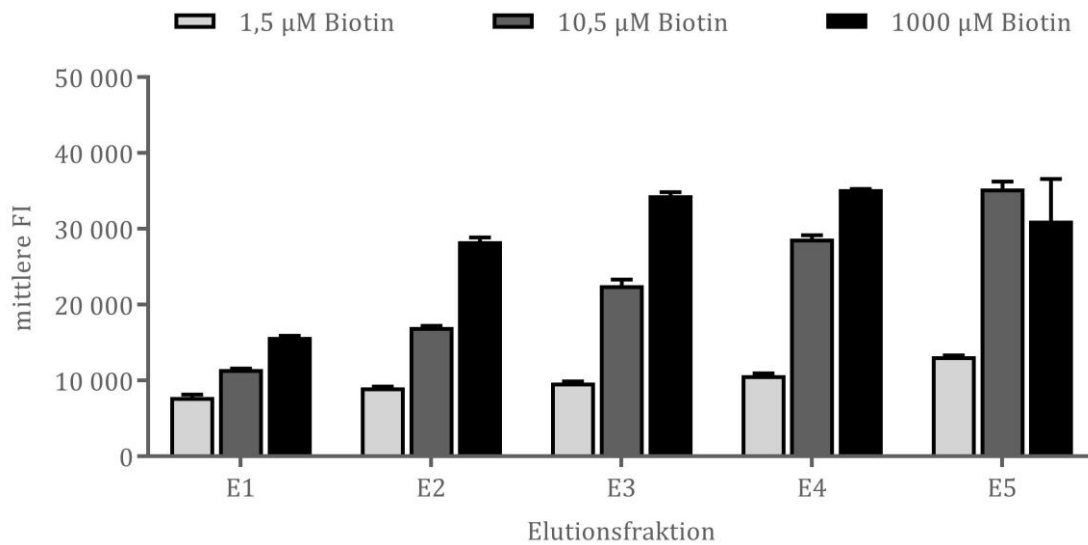
Bei der Elution von MEXi-293E-Zellen beeinflusst die Biotinkonzentration im Elutionsmedium ebenfalls die Elution der Zellen. Während eine sehr geringe Konzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  wie schon im vorherigen Kapitel bei CHO-Zellen unzureichend ist, um Zellen effektiv zu eluieren, sind Biotinkonzentrationen ab 10,5  $\mu\text{M}$  hierzu ausreichend (Abbildung 62 und Abbildung 63). Die Menge der eluierten Zellen steigt

bei einer Elution mit  $1,5 \mu\text{M}$  Biotin von  $0,3 \times 10^4$  Zellen in Elution 1 auf  $1,17 \times 10^4$  Zellen in Elution 4. Es werden jedoch in den Elutionen 1–4 insgesamt nur 31 % der Zellen eluiert, die mit einer Biotinkonzentration von  $10,5 \mu\text{M}$  eluiert werden (Abbildung 62). Wie schon bei den CHO-Zellen in Kapitel 5.5.5 ist die mittlere FI der dissoziierten MEXi-293E-Zellen bei einer Konzentration von  $1,5 \mu\text{M}$  Biotin gering (Abbildung 63). In Elution 1 beträgt die mittlere FI 7.799 und steigt bis Elution 4 nur leicht auf einen Wert von 10.700. Damit bleibt die mittlere FI bei einer Elution mit  $1,5 \mu\text{M}$  Biotin unter dem Niveau der nicht selektierten Ausgangskultur (18.408). Somit lassen sich auch im Falle der MEXi-293E-Zellen lediglich gering exprimierende Zellen mit einer Biotinkonzentration von  $1,5 \mu\text{M}$  eluieren.

Hinsichtlich der Anzahl der eluierten Zellen bei Biotinkonzentrationen von  $10,5 \mu\text{M}$  und  $1 \text{ mM}$  werden auch bei den MEXi-293E-Zellen in Elution 1 mehr Zellen eluiert (Faktor 1,5), wenn mit der höheren Biotinkonzentration eluiert wird. Anders als bei den CHO-Zellen eluieren im MEXi-293E-Experiment die meisten Zellen in Elution 2 (außer bei  $1,5 \mu\text{M}$  Biotin) und nach vier Elutionen beträgt der Unterschied der insgesamt eluierten Zellen zwischen den beiden Biotinkonzentrationen 9 %. Im Vergleich der mittleren FI in den selektierten Fraktionen ist der Verlauf der mittleren FI zwischen Experimenten mit  $10,5 \mu\text{M}$  und  $1 \text{ mM}$  vergleichbar mit den Ergebnissen der CHO-Selektion. So ist die mittlere FI in den Fraktionen bei einer Elution mit  $1 \text{ mM}$  höher als bei einer Elution mit  $10,5 \mu\text{M}$ . Bei beiden Konzentrationen nimmt die mittlere FI aber mit steigender Fraktionszahl zu. Wie bei den CHO-Zellen können bei einer Biotinkonzentration von  $10,5 \mu\text{M}$  noch ebenso viele Zellen in Elution 5 eluiert werden, wie in Elution 4. Folglich werden auch bei den MEXi-293E-Zellen nicht alle hochproduzierenden Zellen bei einer Biotinkonzentration von  $10,5 \mu\text{M}$  in vier Elutionen eluiert.



**Abbildung 62:** Anzahl der eluierten GFP-positiven MEXi-293E-Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E5. Elution 1–4 wurde mit 1,5 µM, 10,5 µM oder 1000 µM Biotin eluiert. Elution 5 wurde in allen Experimenten mit 1000 µM Biotin eluiert. Der Anteil der GFP-positiven Zellen in den Elutionsfraktionen bei einer Elution mit 1 µM lag bei > 58 % in E1, > 86 % in E2 und > 92 % in den übrigen Fraktionen. Bei einer Elution mit 10 µM Biotin waren 91–98 % der eluierten Zellen GFP-positiv und 90–99 %, wenn mit 1000 µM Biotin eluiert wurde.



**Abbildung 63:** Mittlere FI der eluierten GFP-positiven MEXi-293E-Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E5. Elution 1–4 wurde mit 1,5 µM, 10,5 µM oder 1000 µM Biotin eluiert. Elution 5 wurde in allen Experimenten mit 1000 µM Biotin eluiert. Die mittlere FI vor der Ursprungskultur vor der Selektion betrug 18.408.

Die Ergebnisse in diesem Kapitel zeigen, dass bei Populationen mit einer sehr heterogenen Expression, wie bei einer transient exprimierenden Kultur, und großen

Unterschieden der Biotinkonzentrationen zur Elution der Faktor Biotin einen Einfluss auf die Anzahl der eluierten Zellen in den Elutionsfraktionen und auf die mittlere FI hat. Um zu überprüfen, ob bei einer transient exprimierenden Kultur Biotinkonzentrationen von 1 mM, 3 mM oder 5 mM ebenfalls zu Unterschieden hinsichtlich des Elutionsprofils und der mittleren FI der isolierten Populationen führen, wurde das hier beschriebene Experiment mit diesen Biotinkonzentrationen wiederholt. Dabei konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Elutionsbedingungen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich festhalten, dass eine Biotinkonzentration von 1 mM ausreichend ist, um eine möglichst effiziente Elution von MEXi-293E- und CHO-Zellen zu erzielen.

#### 5.5.7 Einfluss der Inkubation auf einem Magneten auf das Elutionsprofil der Microbead-Zell-Ansätze

In den STACS-Selektionen der vorherigen Kapitel ist der größte Anteil der eluierten Zellen häufig in der zweiten Elutionsfraktion zu finden. Diese Beobachtung ist unerwartet, da weder hohe Biotinkonzentrationen noch lange Inkubationszeiten dazu führen, dass nahezu alle Zellen in der ersten Elution von den *Microbeads* dissoziieren. Genau dieser Effekt wäre aber bei ausreichenden Elutionsbedingungen zu erwarten. Daher muss noch ein weiterer Faktor einen Einfluss auf die Elution der Zellen haben. Scherkräfte aufgrund wiederholter Resuspension im Zuge der Elution sind nach den Ergebnissen in Kapitel 5.5.5 als Ursache auszuschließen. Aus diesem Grund wird untersucht, ob die Inkubation auf dem Magneten einen Einfluss auf das Elutionsverhalten der Zellen hat.

Hierzu wurden  $4,6 \times 10^7$  MEXi-293E-Zellen ( $1,4 \times 10^7$  GFP-positive Zellen) einen Tag nach der Transfektion mittels STACS selektiert. Nach dem Waschschrift wurde der Zell-Bead-Mix in 3,1 ml MEXi-TM resuspendiert und auf sechs 2 ml Mikroschraubröhren zu je 100  $\mu$ l verteilt. Der Überstand wurde nach Inkubation auf einem Magneten abgenommen. Jeweils zwei Ansätze wurden mit je 500  $\mu$ l MEXi-TM und Biotinkonzentrationen von 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M oder 1 mM eluiert. Nach fünf Elutionen wurden die Ansätze, die mit 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M eluiert wurden, noch einmal mit 1 mM Biotin eluiert. Bei allen Proben erfolgte die Resuspension des Zell-Bead-Mix auf einem Vortexmischer.

Zur Elution wurden die Ansätze in zwei Gruppen geteilt, wobei in jeder Gruppe ein Ansatz mit 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  oder 1 mM eluiert wurde. In der ersten Gruppe erfolgte die erste Elution nach 20 min Inkubation auf dem Rollermixer nach dem STACS-Protokoll und ohne weitere Inkubationsschritte zwischen den weiteren Elutionen. Im Ansatz mit 1  $\mu\text{M}$  Biotin wurden versehentlich die Überstände von Elution 3 und Elution 4 in einem Reaktionsgefäß gesammelt.

In der zweiten Gruppe wurden die Zellen erstmals nach 9 min Inkubation auf einem Magneten inkubiert, ohne jedoch den Überstand abzunehmen. Es folgte die Resuspension des Ansatzes. Der Wechsel aus Inkubation auf dem Magneten und Resuspension wurde drei weitere Male wiederholt. Danach wurden die Ansätze weitere 2 min auf dem Roller inkubiert. Abermals folgte eine viermalige Inkubation auf dem Magneten inklusive Resuspension. Anschließend wurden die Ansätze noch einmal 4 min auf dem Rollermixer inkubiert. Nun wurden die Ansätze wieder auf dem Magneten inkubiert und der Überstand als Elution abgenommen. Alle Ansätze wurden in dem entsprechenden Elutionsmedium resuspendiert. Vor jeder weiteren Elution wurde die viermalige Inkubation auf dem Magneten mit darauffolgender Suspension durchgeführt, bevor der Überstand als nächste Elutionsfraktion entnommen wurde. Auf diese Weise wurde ein möglicher Einfluss der Inkubation auf dem Magneten nicht wie in Gruppe 1 auf die verschiedenen Elutionsfraktionen verteilt.

Zur Auswertung wurden die eluierten Zellen in jeder Elutionsfraktion entsprechend der mittleren FI in drei verschiedene Gitter eingeteilt. In das erste Gitter fallen alle GFP-positiven Zellen, die eine mittlere FI bis 20.000 besitzen (GFP+), im zweiten Gitter werden alle Zellen mit einer mittleren FI von 20.000 bis 40.000 erfasst (GFP++) und im dritten Gitter befinden sich alle Zellen mit einer mittleren FI von > 40.000 (GFP+++).

Tatsächlich führt die mehrmalige Inkubation auf dem Magneten vor der Abnahme des Überstandes dazu, dass wesentlich mehr Zellen eluiert werden oder sich das Elutionsprofil der Zellen deutlich verändert (Abbildung 64). Darüber hinaus steigt bei mehrmaliger Inkubation auf dem Magneten auch die mittlere FI in den Elutionsfraktionen (Abbildung 65).

Bei einer Elution mit 1  $\mu\text{M}$  Biotin werden in den ersten zwei Elutionen 2,2-mal mehr Zellen eluiert, wenn eine mehrfache Inkubation auf dem Magneten erfolgt



(Abbildung 64 A, B). Auch bei der sechsten Elution mit 1 mM Biotin können in diesem Experiment bei einer mehrmaligen Inkubation auf dem Magneten 1,7-mal mehr Zellen eluiert werden. Wird die Biotinkonzentration erhöht, so ist festzustellen, dass durch die mehrfache Inkubation auf dem Magneten in den ersten Fraktionen eine hohe Menge an Zellen eluiert. Während bei einer einfachen Inkubation auf dem Magneten die meisten Zellen bei einer Elution mit 10  $\mu$ M bzw. 1 mM Biotin in der dritten Elutionsfraktion eluieren (Abbildung 64 C, D), kann bei einer mehrfachen Inkubation auf dem Magneten der größte Teil der eluierten Zellen in der ersten Elution wiedergefunden werden (Abbildung 64 E, F). Im Mittel werden in der ersten Elution 4,5-mal mehr Zellen eluiert als bei einer einfachen Inkubation auf dem Magneten. Danach sinkt die Menge eluierter Zellen mit jeder weiteren Elutionsfraktion, wobei sie in Elution 2 noch deutlich über der Zellzahl ohne mehrfache Inkubation auf dem Magneten liegt (im Mittel Faktor 1,5).

Ohne eine mehrfache Inkubation auf dem Magneten werden im 10  $\mu$ M Biotin-Experiment in der sechsten Elution bei einer Elution mit 1 mM Biotin 2,2-mal mehr Zellen eluiert als bei einer mehrfachen Inkubation auf dem Magneten. Daran wird deutlich, dass nach fünf Elutionen mehr Zellen auf den Beads verbleiben, wenn keine mehrfache Inkubation auf dem Magneten erfolgt. Folglich ist auch die Zahl der in den ersten fünf Elutionen insgesamt eluierten Zellen bei mehrfacher Inkubation auf dem Magneten höher. Sie ist bei der Elution mit 1  $\mu$ M Biotin 1,8-fach, bei 10  $\mu$ M Biotin 1,4-fach und bei 1 mM 1,3-fach erhöht.

Neben der höheren Zellausbeute in den ersten beiden Elutionen wird die effizientere Elution durch eine mehrfache Inkubation auf dem Magneten auch dadurch belegt, dass die mittlere FI in den Elutionsfraktionen bei intensiver Inkubation auf dem Magneten und Biotinkonzentrationen von 10  $\mu$ M und 1 mM im Mittel um den Faktor 1,3 höher ist (Abbildung 65). Das bei einer Biotinkonzentration von 1  $\mu$ M kein derartig hoher Unterschied der mittleren FI in den isolierten Fraktionen zu messen ist, verdeutlicht, dass Zellen mit einer höheren Markerproteinkonzentration bei 1  $\mu$ M Biotin nicht nennenswert eluiert werden können.

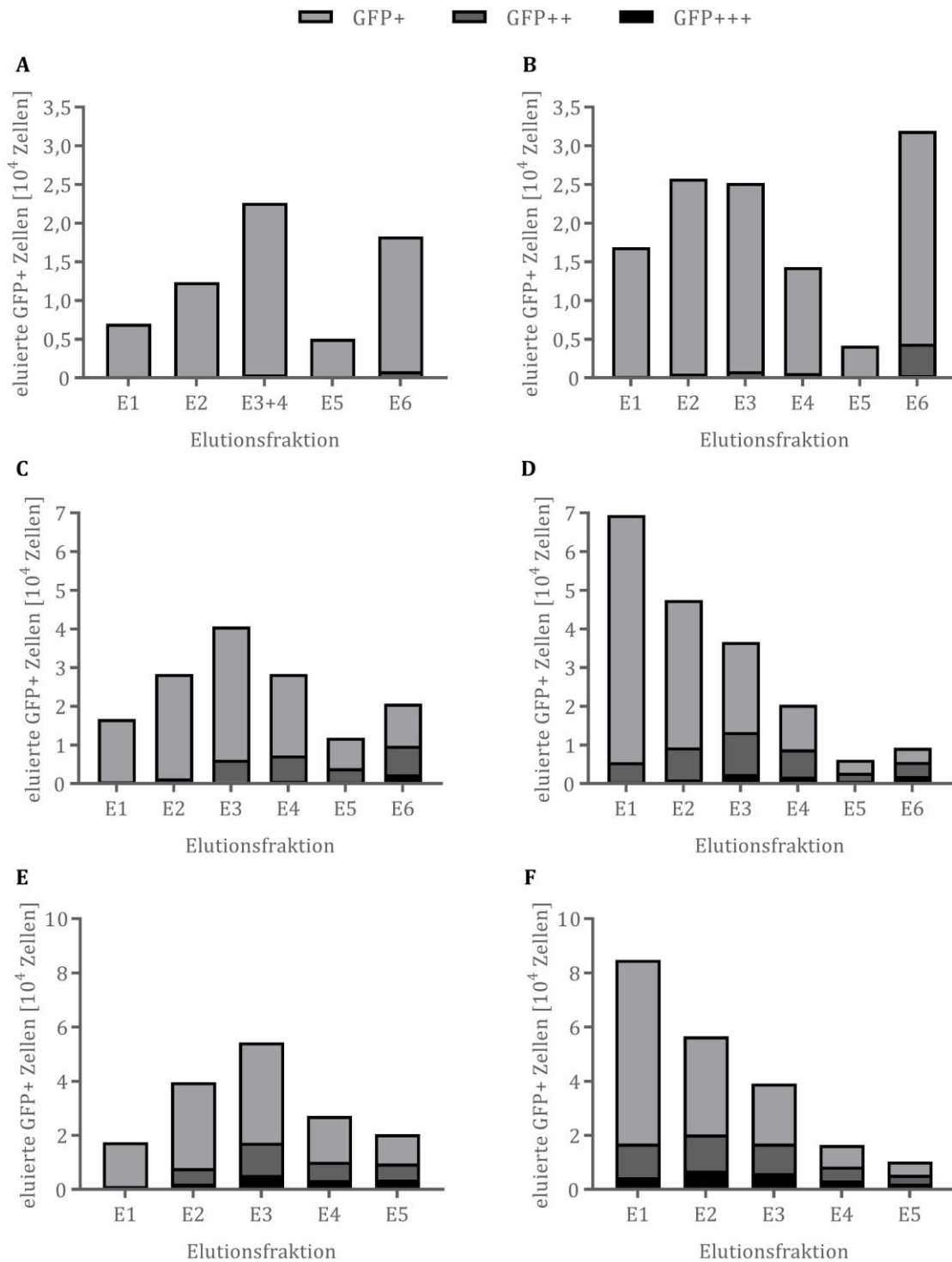
Zusammenfassend belegen die Ergebnisse in diesem Experiment, dass die Inkubation auf dem Magneten einen großen Einfluss auf die Effizienz der STACS-Elution hat. Offensichtlich ist die mit steigender Elutionsfraktion steigende Anzahl der

Inkubationen der Ansätze auf dem Magneten der Grund, weshalb in vergangenen Experimenten häufig der Großteil der Zellen nicht in der ersten Elutionsfraktion eluiert wurde, obwohl die Biotinkonzentration und die Inkubationszeit ausreichend für eine vollständige Elution gewesen wären.

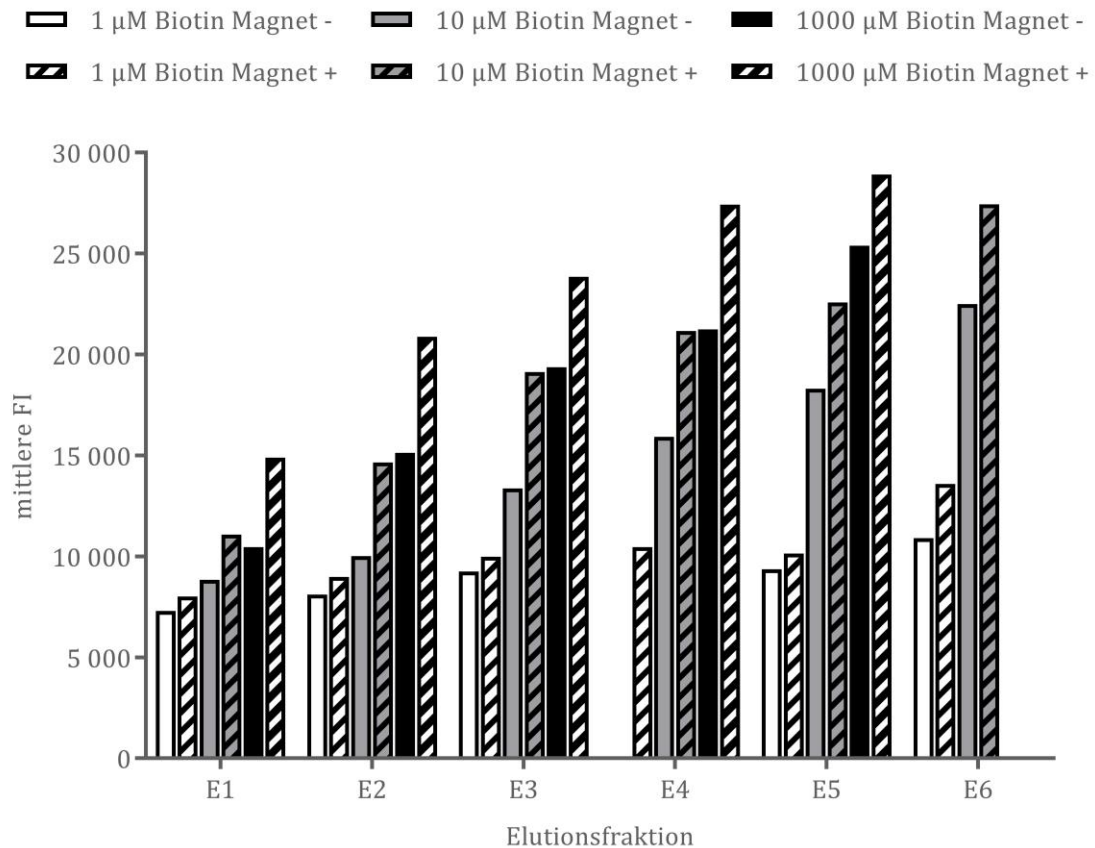
Eine wiederholte Magnet-Inkubation wirkt sich nicht nur auf die eluierte Zellzahl in den Fraktionen aus, sondern beeinflusst auch das Elutionsverhalten von gering-, mittel- und hochproduzierenden Zellen. Werden die Ansätze nicht mehrmals auf dem Magneten inkubiert, so basiert der Anstieg der mittleren FI in den ersten drei Fraktionen vor allem auf einer steigenden Anzahl an eluierten mittel- und hochproduzierenden Zellen (GFP<sup>++</sup> und GFP<sup>+++</sup>, Abbildung 64 C, E). Er verzehnfacht sich bei 10  $\mu$ M Biotin und erhöht sich um den Faktor 13,8 bei 1 mM innerhalb der ersten drei Fraktionen. Zwar erhöht sich auch die Zahl der eluierten GFP<sup>+</sup> Zellen, doch kompensiert dieser Anstieg nicht den Anstieg der eluierten GFP<sup>++</sup> und GFP<sup>+++</sup> Zellen. Nach der dritten Elution steigt die mittlere FI hauptsächlich dadurch, dass gering exprimierende Zellen (GFP<sup>+</sup>) zu einem großen Teil aus den Ansätzen entfernt wurden und sich ihr relativer Anteil gegenüber GFP<sup>++</sup> und GFP<sup>+++</sup> Zellen verringert, ohne dass mehr Zellen aus den Gruppen GFP<sup>++</sup> und GFP<sup>+++</sup> eluiert werden.

Werden die Ansätze mehrmals auf einem Magneten inkubiert, basiert der Anstieg der mittleren FI in den Fraktionen stark auf der frühen Entfernung der GFP<sup>+</sup> Zellen in der ersten Elution und dem sich dadurch schnell verringernden Anteil dieser Zellpopulation in den weiteren Fraktionen (Abbildung 64 D, F). So werden bei einer Biotinkonzentration von 10  $\mu$ M ohne Mehrfachinkubation auf dem Magneten 34.520 GFP<sup>+</sup> Zellen in der dritten Elution isoliert, während es bei einem mehrfachen Einsatz des Magneten lediglich 23.260 Zellen sind. Wird mit 1 mM Biotin eluiert, sind es 37.035 GFP<sup>+</sup> Zellen in der dritten Elution im Standardprotokoll versus 22.250 Zellen im Experiment mit intensiver Magnetnutzung. Zusätzlich steigt bei einer Mehrfachinkubation und 10  $\mu$ M Biotin die Summe von GFP<sup>++</sup> und GFP<sup>+++</sup> Zellen bis zur dritten Elution um den Faktor 2,4. Beträgt die Biotinkonzentration 1 mM, werden bereits ab der ersten Elution zusammen 16.900 GFP<sup>++</sup> und GFP<sup>+++</sup> Zellen eluiert, deren Anzahl sich bis zur dritten Elution nur minimal ändert. Hier basiert die hohe mittlere FI somit im besonderen Maße auf der Reduktion der GFP<sup>+</sup> Zellen in jeder weiteren Elution.

Dass die mittlere FI in den Fraktionen in dem Experiment mit 1 mM Biotin und mehrfacher Magnetnutzung am höchsten ist (Abbildung 65), zeigt, dass es effektiver ist, geringproduzierende Zellen frühzeitig aus dem Ansatz zu entfernen. Andernfalls reduziert ihr Anteil in späteren Fraktionen die mittlere FI. Aus dem Anteil der drei Gruppen in den Elutionsfraktionen wird auch noch einmal deutlich, dass bei 1  $\mu$ M Biotin nahezu keine Zellen der Gruppe GFP++ und GFP+++ eluiert werden können.



**Abbildung 64:** Anzahl der eluierten GFP-positiven MEXi-293E-Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E6. Zellen werden in drei FI-Kategorien gruppiert: < 20.000 (GFP+), 20.000–40.000 (GFP++) und > 40.000 (GFP+++). Elution 1–5 wurden mit 1  $\mu$ M (A, B), 10  $\mu$ M (C, D) oder 1000  $\mu$ M Biotin (E, F) eluiert. Elution 6 wurde immer mit 1000  $\mu$ M Biotin eluiert. Bei jedem Elutionsschritt wurden die Zellen entweder einmal (A, C, E) oder mehrfach (B, D, F) auf dem Magneten inkubiert.



**Abbildung 65:** Mittlere FI der eluierten GFP-positiven MEXi-Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E6. Elution 1–5 wurden mit 1 µM, 10 µM oder 1000 µM Biotin eluiert. Elution 6 wurde immer mit 1000 µM Biotin eluiert. Bei jedem Elutionsschritt wurden die Zellen entweder einmal (Magnet -) oder mehrfach auf dem Magneten inkubiert (Magnet +).

### 5.5.8 Selektion von Zellen mit unterschiedlichem Expressionslevel durch Verwendung eines Biotingradienten und mehrfachen Inkubationen auf einem Magneten

Bisherige Kapitel zur Optimierung der STACS-Methode haben gezeigt, dass die Inkubation auf einem Magneten die Elution beeinflusst. Außerdem änderte sich das Elutionsprofil der Zellen bei einer Biotinkonzentration von weniger als 10 µM. In den Experimenten wurde die Biotinkonzentration in jedem Ansatz konstant gehalten. In dem hier abschließenden Experiment wird untersucht, wie sich Zellen entsprechend ihres Markerepressionslevels und unter Verwendung eines Biotingradienten fraktionieren lassen. Außerdem wird untersucht, ob durch eine stufenweise Isolierung von gering exprimierenden Zellen die Expression in den letzten

Elutionsfraktionen im Vergleich zu einer Elution mit einer hohen Biotinkonzentration von 1 mM erhöht werden kann.

Dazu wurden  $1,3 \times 10^7$  MEXi-293E-Zellen (davon  $6,5 \times 10^6$  GFP-positive Zellen) zwei Tage nach der Transfektion wie in Kapitel 5.5.7 beschrieben mit einer viermaligen Inkubation auf dem Magneten während jedes Elutionsschrittes mittels STACS selektiert. Die Zellen wurden nach dem letzten Waschschrift in 1,3 ml MEXi-TM resuspendiert und auf vier Ansätze mit jeweils 300  $\mu$ l verteilt. Zwei Ansätze wurden mit einer Biotinkonzentration von 1 mM Biotin eluiert. Die übrigen beiden Ansätze wurden stufenweise mit fünf verschiedenen Biotinkonzentrationen eluiert (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 1 mM). Während der Inkubation auf dem Rollermixer wurden alle Ansätze nach 11 min, weiteren 2 min und weiteren 10 min einmal auf dem Magneten inkubiert und resuspendiert. Nach Ende der Inkubation auf dem Rollermixer erfolgte erneut die Inkubation auf dem Magneten und die Abnahme der ersten Elutionsfraktion. Für jede Biotinkonzentration wurden vier Elutionen durchgeführt. Vor der Abnahme des Überstandes einer jeden Elutionsfraktion wurden die Ansätze viermal auf dem Magneten inkubiert und resuspendiert.

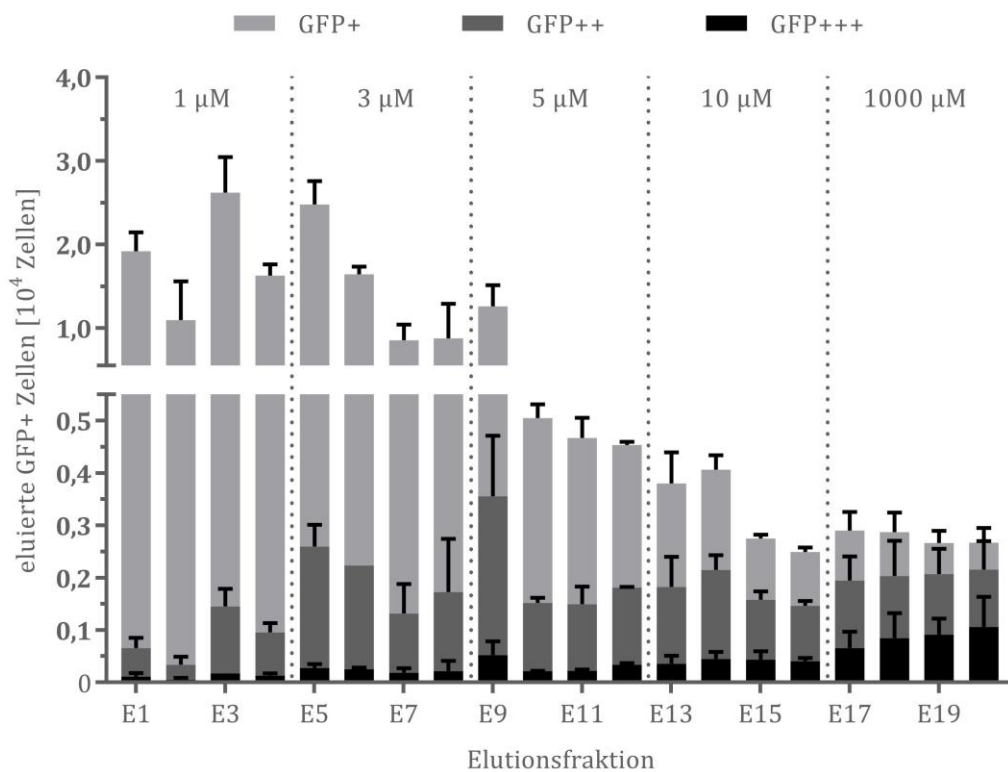
Für die Analyse werden die eluierten Zellen in jeder Elutionsfraktion entsprechend der mittleren FI in drei verschiedene Gitter eingeteilt. In das erste Gitter fallen alle GFP-positiven Zellen, die eine mittlere FI bis 38.000 besitzen (GFP+), im zweiten Gitter werden alle Zellen mit einer mittleren FI von 38.000 bis 70.000 (GFP++) und im dritten Gitter alle Zellen mit einer mittlere FI von > 70.000 (GFP+++)

erfasst. Indem die Zellen mit steigenden Biotinkonzentrationen im geringen Konzentrationsbereich stufenweise eluiert werden (Abbildung 66), ergibt sich eine sehr viel präzisere Fraktionierung der Zellen als bei einer einheitlichen Elution mit 1 mM Biotin (Abbildung 67). Wird direkt mit 1 mM Biotin eluiert, ist die isolierte Zellzahl in Elution 1 mit der Menge der Zellen in den Elutionen 1–9 aus der Stufenelution vergleichbar. Außerdem beträgt die mittlere FI in der ersten Elution der mit 1 mM Biotin eluierten Zellen 26.675. Eine vergleichbare mittlere FI wird in der Stufenelution erst nach sieben Elutionen erreicht (Abbildung 68). Insgesamt ist der lineare Anstieg der mittleren FI in der Stufenelution um den Faktor 5,9 geringer als in der Elution mit 1 mM ( $R^2 = 0,98$  bzw.  $0,99$ ).

Folglich können bei geringen Biotinkonzentrationen in der Mehrzahl gering exprimierende Zellen isoliert werden, wohingegen höher exprimierende Zellen bei höheren Biotinkonzentrationen angereichert werden. Aus Abbildung 66 geht hervor, dass in den ersten acht Elutionen der Stufenelution vor allem die Zellen der GFP+ Gruppe eluieren und die Menge an Zellen der Gruppe GFP+++ mit unter 278 Zellen pro Elution bis Elution 11 äußerst gering ist (Ausnahme Fraktion 9). Ab der fünften Elution werden im Mittel in allen Fraktionen zwischen 1.320 und 2.595 Zellen der Gruppe GFP++ eluiert (Ausnahme Fraktion 9 mit 3.555 Zellen). Die Menge an GFP+++ Zellen steigt ab Elution 12 auf über 342 Zellen und erreicht in den letzten vier Elutionen mit 1 mM Biotin Werte von über 657 Zellen pro Elution. Vor allem sinkt die Menge der GFP+ Zellen deutlich ab der siebten Elution. Weil die Menge an GFP++ Zellen aber weiterhin im Mittel relativ konstant bleibt bzw. die Menge an GFP+++ sogar in den letzten vier Elutionen noch zunimmt, erhöht sich die mittlere FI der Population in den letzten vier Fraktionen noch einmal (Abbildung 68).

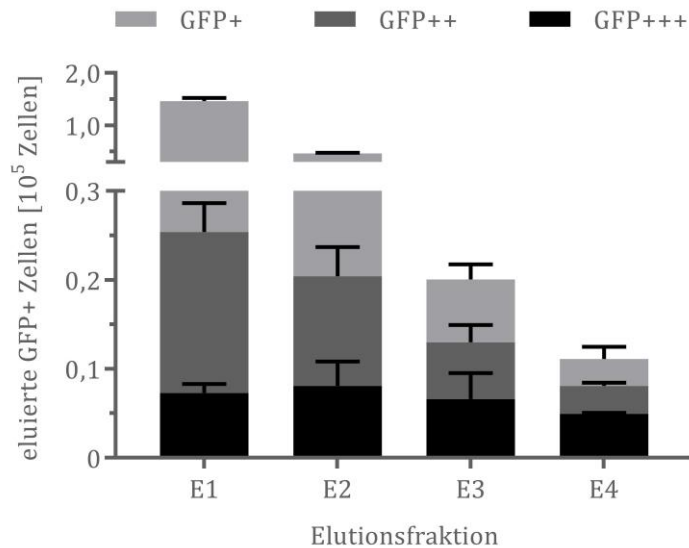
Werden die Ansätze bei einer konstanten hohen Biotinkonzentration von 1 mM eluiert, so wird ebenfalls der größte Anteil der Zellen in der ersten Elution erhalten (65 %). Nach der ersten Elution mit 1 mM Biotin nimmt die Menge der isolierten Zellen ebenfalls in den folgenden Fraktionen immer weiter ab. Gleichzeitig steigt die mittlere FI weiter an. Die am Ende der Elution erreichte mittlere FI der selektierten Population ist zwischen der Stufenelution und der Elution mit 1 mM Biotin vergleichbar. Anhand der Daten des 1 mM-Experiments wird deutlich, dass der Anstieg der mittleren FI in der Elution ausschließlich auf dem stark verringerten Anteil gering und mittel exprimierender Zellen (GFP+ und GFP++) und nicht auf einer erhöhten Menge hochproduzierender Zellen beruht (Abbildung 67). Die Zahl der eluierten GFP+++ Zellen ist über den Verlauf der Elution konstant. Folglich zeigen diese Zellen eine weniger scharfe Elution, weshalb ihr relativer Anteil in den letzten Elutionsfraktionen zunimmt. So schwankt die Menge an eluierten GFP+++ Zellen in den ersten drei Fraktionen zwischen 6.627 (Elution 3) und 8.113 Zellen (Elution 2). Im Zuge der vierten Elution verringert sich die Menge an GFP+++ Zellen im Vergleich zur ersten Elution um den Faktor 1,5 auf 4.943. Dagegen reduziert sich die Menge an eluierten GFP++ Zellen um den Faktor 3,1 und die der GFP+ Zellen um den Faktor 13,2. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse in Kapitel 5.5.7.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, weshalb die Elution bei einer konstanten hohen Biotinkonzentration zu einer vergleichbaren mittleren FI in den letzten Elutionsfraktionen führt, wie die Stufenelution. Der entscheidende Effekt der Reduktion von gering exprimierenden Zellen wird durch eine hohe Biotinkonzentration ebenfalls erzielt. Dass der Verlauf der mittleren FI in den Fraktionen auf dem Anteil der in den drei Gruppen eluierten Zellen basiert und nicht auf einem Anstieg der mittleren FI innerhalb dieser Gruppen, wird aus den konstanten Verläufen der mittleren FI in Abbildung 69 und Abbildung 70 ersichtlich.

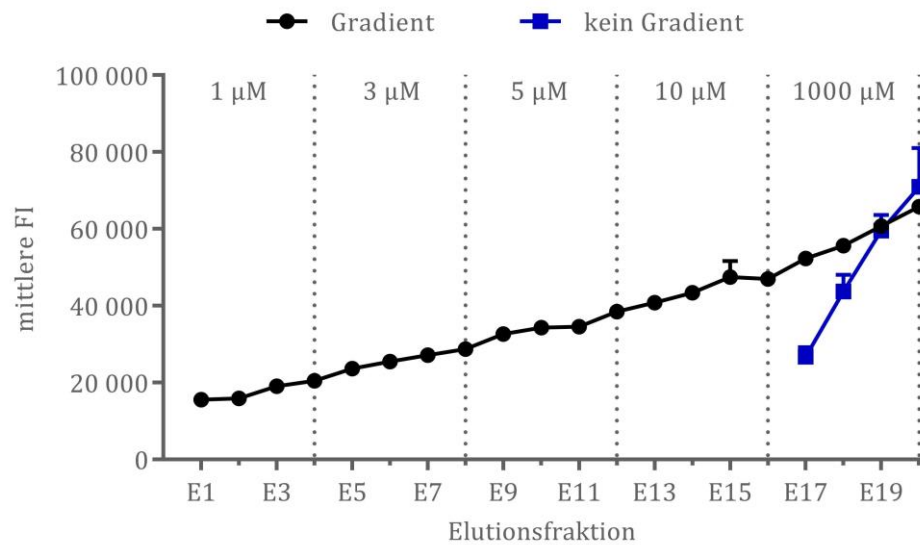


**Abbildung 66:** Anzahl der eluierten GFP-positiven MEXi-Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E20. Zellen werden in drei FI-Kategorien gruppiert: < 38.000 (GFP+), 38.000–70.000 (GFP++) und > 70.000 (GFP+++). Die Zellen wurden stufenweise mit 1 µM (E1–E4), 3 µM (E5–E8), 5 µM (E9–E12), 10 µM (E13–E16) und 1000 µM Biotin (E17–E20) eluiert.

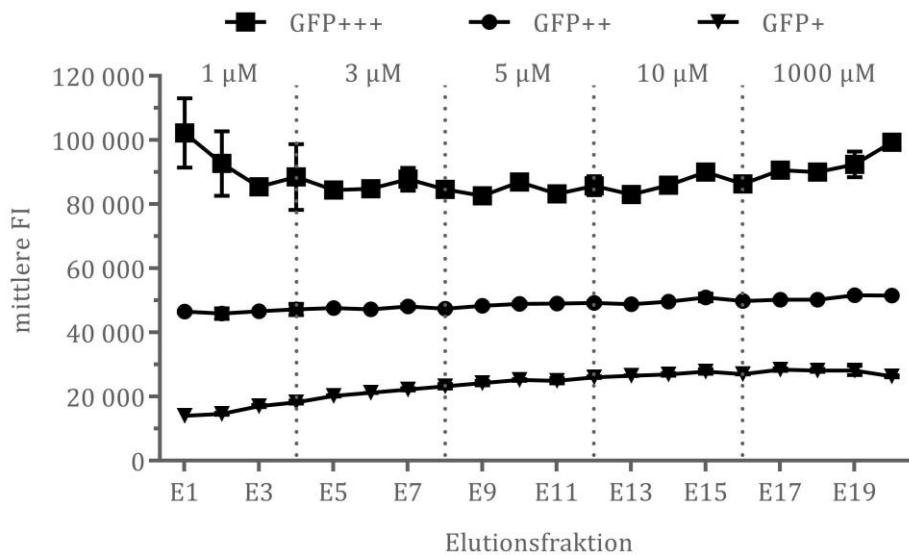




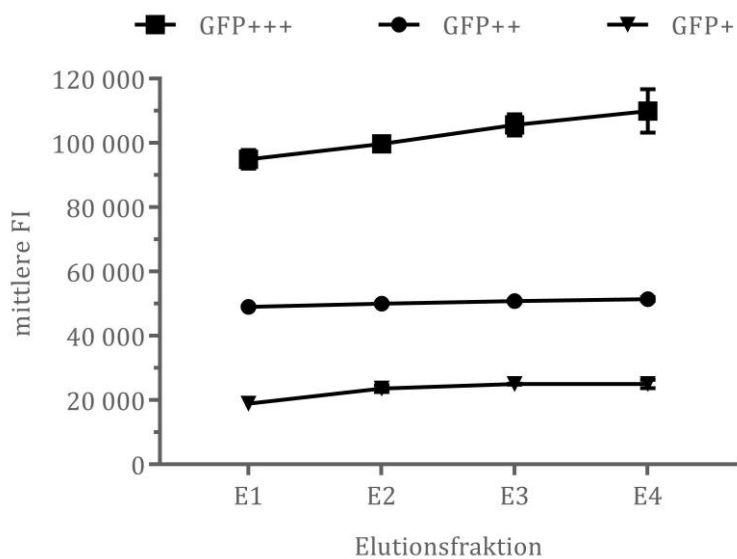
**Abbildung 67:** Anzahl der eluierten GFP-positiven MEXi-Zellen in den Elutionsfraktionen E1–E4. Zellen werden in drei FI-Kategorien gruppiert:  $< 38.000$  (GFP+),  $38.000–70.000$  (GFP++) und  $> 70.000$  (GFP+++). Die Zellen wurden mit  $1000 \mu\text{M}$  Biotin eluiert.



**Abbildung 68:** Mittlere FI der eluierten GFP-positiven MEXi-Zellen. Die Zellen in den Ansätzen wurden entweder stufenweise mit  $1 \mu\text{M}$  (E1–E4),  $3 \mu\text{M}$  (E5–E8),  $5 \mu\text{M}$  (E9–E12),  $10 \mu\text{M}$  (E13–E16) und  $1000 \mu\text{M}$  Biotin (E17–E20) eluiert (Gradient) oder in vier Elutionen mit  $1000 \mu\text{M}$  Biotin (kein Gradient).



**Abbildung 69:** Verlauf der mittleren FI der eluierten GFP-positiven MEXi-Zellen aus der Elution mit einer stufenweisen Erhöhung der Biotinkonzentration. Zellen werden in drei FI-Kategorien gruppiert: < 38.000 (GFP+), 38.000–70.000 (GFP++) und > 70.000 (GFP+++). In der Abbildung wird die mittlere FI der Zellen innerhalb jeder Gruppe dargestellt.



**Abbildung 70:** Verlauf der mittleren FI der eluierten GFP-positiven MEXi-Zellen aus der Elution mit einer konstanten Biotinkonzentration von 1000  $\mu\text{M}$ . Zellen werden in drei FI-Kategorien gruppiert: < 38.000 (GFP+), 38.000–70.000 (GFP++) und > 70.000 (GFP+++). In der Abbildung wird die mittlere FI der Zellen innerhalb jeder Gruppe dargestellt.

### 5.5.9 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse zur Optimierung der STACS-Methode des Kapitels 5.5

Für einen möglichst effizienten Einsatz der STACS-Technologie, wurden optimale Bedingungen für die Bindung der Zellen an die magnetischen *Microbeads* untersucht. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Faktoren während der Elutionsphase wie Biotinkonzentration, Inkubationszeit, Scherkräfte und der Einfluss einer Inkubation auf dem Magneten während der Elution untersucht.

Das Standardprotokoll der TACS®-Technologie, von welcher die in dieser Arbeit entwickelte Methode abgeleitet wird, beschreibt eine 20-minütige Inkubation der Zellen mit den Beads während der Phase der Bindung der Zellen an die Beads.<sup>148</sup> Tatsächlich haben die hier untersuchten Inkubationszeiten von 10–30 min keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil gebundener Zellen. Somit kann das Protokoll auf eine Inkubationszeit von 10 min verkürzt werden. Eine weitere Reduktion der Inkubationszeit ist denkbar, da geringere Inkubationszeiten nicht getestet wurden. Damit ist die Inkubation im STACS-Protokoll auch kürzer als manch andere Protokolle zur Selektion mittels magnetischer Beads, die ebenfalls 20–30 min Inkubation vorsehen.<sup>122,124</sup>

Der geringste Anteil an nicht gebundenen Zellen wird bei einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml ermittelt. Aus diesem Grund sollte diese Zelldichte im Ansatz während der Zellbindung an die Beads nicht unterschritten werden. Es muss berücksichtigt werden, dass in diesem Experiment die Zellkonzentration variiert und die absolute Zellzahl im Ansatz konstant gehalten wurde. Dies führt automatisch dazu, dass sich das Gesamtvolumen zwischen den Ansätzen mit verschiedenen Zellkonzentrationen unterscheidet. Weil auch die Menge der *Microbeads* in allen Ansätzen gleich war, um ein identisches Zell-Bead-Verhältnis zu gewährleisten, unterscheiden sich die *Microbead*-Konzentrationen zwischen den Ansätzen ebenfalls. Insofern kann nicht bestimmt werden, ob am Ende die höhere Zellkonzentration oder die höhere *Microbead*-Konzentration für die effiziente Bindung bei  $1 \times 10^7$  Zellen/ml entscheidend ist. Es liegt nahe, dass beide Konzentrationen einen großen Einfluss haben und dass eine hohe Konzentration sowohl von Zellen als auch Beads von Vorteil ist. Für den Einsatz der Methode ist diese Frage weniger von Bedeutung.

Die Beads stellen nur ein kleines Volumen dar, so dass bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml die Bead-Konzentration automatisch hoch ausfällt, wenn für die Bindung von  $4 \times 10^5 - 7 \times 10^5$  Zellen die dazu nötigen 10  $\mu$ l Beads verwendet werden. Dass bei Zelldichten unter  $1 \times 10^7$  Zellen/ml viele Zellen nicht an die Beads gebunden werden, legt den Schluss nahe, dass die Beads während der Bindungsphase auch wieder von Zellen dissoziieren. Bei geringen Zelldichten können so immer Zellen ohne Beads vorhanden sein, weil freie Beads nicht wieder unmittelbar an Zellen binden. Ohne eine Dissoziation von Beads und Zellen, wäre ein Effekt der Inkubationszeit zu erwarten, weil Zellen zwar langsamer Beads binden, aber über die Zeit alle Beads gebunden werden müssten.

Zur Optimierung der Elution wurden verschiedene Inkubationszeiten sowie Biotinkonzentrationen vor der ersten Elution und auch zwischen den Elutionen untersucht. Bei Inkubationszeiten bis zu 20 min konnte kein nennenswerter Einfluss dieses Faktors auf die Elution identifiziert werden, so dass bereits eine Inkubation von 5 min vor der Isolierung der ersten Elutionsfraktion ausreichend ist. Dieses Erkenntnis wird durch ein weiteres Experiment bestätigt, welches beweist, dass auf eine Inkubation der Ansätze zwischen den Elutionen gänzlich verzichtet werden kann. Damit kann die Inkubationszeit während der Elution im Vergleich zum TACS®-Protokoll deutlich reduziert werden.<sup>148</sup> Auch die hohe Dissoziationsrate des TST von Strep-Tactin® in einem biotinhaltigen Puffer belegt, dass kurze Inkubationszeiten ausreichend sind.<sup>129</sup>

Ein signifikanter Einfluss der Biotinkonzentration ist erst bei einer großen Differenz der betrachteten Biotinkonzentration (10  $\mu$ M vs. 1 mM) zu verzeichnen. So werden bei 1 mM Biotin mehr Zellen in der ersten Elution eluiert und die in den Elutionen isolierten Populationen weisen eine im Mittel höhere Markerproteinkonzentration auf der Oberfläche auf. In Experimenten mit Konzentrationen zwischen 10–100  $\mu$ M und 100–800  $\mu$ M sowie 2–7mM kann dagegen kein signifikanter Unterschied im Elutionsprofil der Zellen zwischen den im jeweiligen Experiment untersuchten Biotinkonzentrationen beobachtet werden.

Erstaunlicher ist die Beobachtung, dass der größte Anteil der Zellen häufig nicht in der ersten Elution eluiert, obwohl dies bei einer hohen Biotinkonzentration und langen Inkubationszeit zu erwarten wäre. Tatsächlich kann die Inkubation auf dem

Magneten als ein Faktor mit hohem Einfluss auf das Elutionsverhalten der Zellen identifiziert werden. Mehrfache Inkubation auf dem Magneten und Resuspension der Ansätze vor Abnahme des Überstandes führen zu einem schärferen Elutionsprofil mit dem größten Anteil eluierter Zellen in der ersten Elution sowie einer im Mittel höheren Markerproteinkonzentration auf den selektierten Zellen in den jeweiligen Elutionsfraktionen. Die genaue Ursache für dieses Phänomen wird hier experimentell nicht identifiziert. Wenngleich in den Experimenten in Kapitel 5.5.5 kein Einfluss von Scherkräften auf die Elution identifiziert werden kann, so lässt sich nicht vollkommen ausschließen, dass diese zur Elution beitragen. Bei der wiederholten Inkubation auf einem Magneten wurden die Zellen vor der Elution im Zuge der erneuten Durchmischung auf dem Vortexmischer häufiger und insgesamt länger den entsprechenden Scherkräften ausgesetzt als im Experiment in Kapitel 5.5.5. Yeung und Wittrup konnten nachweisen, dass durch Scherkräfte Zellen mit einer geringeren Oberflächenkonzentration an Bindungsprotein von magnetischen Beads gelöst werden können.<sup>126</sup> Ebenso könnte aber auch die Kraft des Magneten auf die Beads zu einer schärferen Elution führen. Es wäre denkbar, dass die kleinen Beads (Durchmesser 3  $\mu\text{m}$ ), durch den Magneten ein wenig aus der Zelloberfläche gezogen werden und so das Biotin einen besseren Zugang zum Strep-Tactin<sup>®</sup> bekommt. In jedem Fall müsste genauer untersucht werden, ob dieser Effekt bei verschiedenen Zelltypen auftritt und wie stark er von anderen Faktoren, wie der Oberflächendichte des Markerproteins abhängt. Es wäre ebenfalls interessant zu prüfen, wie die Elution auf anderen Matrices im Vergleich verläuft. In dem Experiment mit Agarose-Beads (Kapitel 5.2.3) wird der Großteil der Zellen in der ersten Elution eluiert (Daten nicht gezeigt). Allerdings müsste ein entsprechendes Experiment mit einer identischen Kultur sowohl mit magnetischen als auch mit Agarose-Beads durchgeführt werden.

Für ein ideales STACS-Elutionsprotokoll werden die Zellen nach einer fünfminütigen Inkubation eluiert. Weitere Elutionen können ohne weitere Inkubationszeit erfolgen. Allerdings sollte vor jeder Inkubation mehrmals auf einem Magneten inkubiert werden. Es sollte eine Biotinkonzentration von 1 mM verwendet werden. Zwar gehen dabei in den ersten Elutionen hochproduzierende Zellen verloren (vgl. Abbildung 67), aber die Anzahl an Elutionsschritten ist minimal und gering produzierende Zellen werden frühzeitig abgereichert.

Die Verwendung eines Biotingradienten hat dagegen für den Erfolg der Selektion von hochproduzierenden Zellen keinen Vorteil (siehe Kapitel 5.5.8). Allerdings kann diese Form der Elution in Anwendungen interessant sein, bei denen nicht ausschließlich Zellen mit einer hohen Oberflächendichte eines Proteins isoliert, sondern Zellen entsprechend der Konzentration eines Membranproteins fraktioniert werden sollen. Ein Beispiel könnte die Isolierung von Zellen aus Blut oder Geweben sein, bei denen verschiedene Zellen denselben Marker in unterschiedlicher Konzentration präsentieren. Eine gängige Möglichkeit, diese Zellen zu separieren, ist eine zweite Selektion über ein anderes Markerprotein. Hier könnte die zweite Selektion ggf. durch eine Stufenselektion mittels Biotins eingespart werden. Wie kompetitiv ein solches Verfahren wäre, müsste in weiteren Studien untersucht werden.

## 5.6 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Selektion von stabilen und hochproduzierenden Zellen. Dazu wird neben dem eigentlich zu exprimierenden Protein ein Membranmarkerprotein koexprimiert, das auf der extrazellulären Seite mit einem Twin-Strep-tag® (TST) fusioniert ist. Über den TST können Zellen an eine mit Strep-Tactin® gekoppelte Matrix wie magnetische Beads gebunden und selektiert werden. Bei der Selektion wird der Umstand genutzt, dass die TST-Strep-Tactin®-Bindung durch Zugabe von Biotin gelöst werden kann. Dieses Prinzip soll genutzt werden, um hochproduzierende Zellen anzureichern. Die Idee beruht auf der Annahme, dass hochproduzierende Zellen später von der Strep-Tactin®-Matrix dissoziieren. Darum wird die Methode als *Strep-Tactin® assisted cell selection (STACS)* bezeichnet (vgl. Kapitel 3).

Die Expression eines POI mit der Expression eines Membranmarkerproteins zu koppeln, um auf diese Weise Zellen zu selektieren, ist eine in der Literatur beschriebene Methode. Dazu werden in der Regel magnetische Beads verwendet<sup>120-122,124</sup> oder Zielzellen werden nach einer Fluoreszenzmarkierung des Membranproteins mittels FACS isoliert.<sup>110,112</sup> Ob Zellen über einen Antikörper an die Matrix gebunden werden oder ein Bindungspartner zu einem auf der Matrix immobilisierten Liganden direkt mit dem Markerprotein fusioniert ist; in nahezu allen Fällen werden nur Zielzellen von den restlichen Zellen getrennt. Gaines und Wojchowski konnten zwar

eine höhere Luciferaseproduktion nach mehrfacher MACS®-Selektion von Zellen messen, allerdings untersuchten die Autoren nicht, ob die höhere Produktion auf eine höhere Proteinexpression oder nur eine Anreicherung von exprimierenden Zellen zurückzuführen ist. Allerdings scheinen die Ergebnisse in der Studie eher für letztere Möglichkeit zu sprechen.<sup>120</sup> Mejia-Pous et al. messen eine Korrelation von GFP-Expression und IRES-gekoppelter CD4-Expression. Tatsächlich zeigen die Daten der Studie, dass durch die MACS®-Selektion der Anteil an hochproduzierenden Zellen in der selektierten Population steigt. Allerdings werden geringproduzierende Zellen nicht während der Elution entfernt, sondern deren Bindung während der Inkubationsphase bei der Bindung an die Matrix vermieden. Somit gibt es keine Elution in Abhängigkeit der Markergenexpression und es wird kein sekretiertes POI koexprimiert. Außerdem werden Primärzellen verwendet. Darum untersuchen die Autoren nicht, ob die selektierten Zellen über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen stabil sind. Vor allem erzielen die Autoren nur eine semistabile Population, indem eine Tol2-Transposase verwendet wird. Ohne diese ist es in der Studie nicht möglich, stabile Zellen zu generieren.<sup>149</sup> Aus dem Feld der Display-Methoden ist bekannt, dass die Bindung einer Zelle an Beads von der Oberflächenkonzentration und Affinität der Zielproteine auf der Zellmembran abhängt. Hier werden Zellen mit wenig Oberflächenprotein allerdings während der Inkubation mit Beads an einer Bindung durch Zugabe eines Kompetitors gehindert.<sup>126</sup> Dagegen basiert das STACS-Prinzip auf einer Selektion während der Elution, wodurch später entschieden werden kann, welche Zellen für die weitere Kultivierung verwendet werden. Außerdem wird in der Studie von Yeung und Wittrup kein eigentliches POI produziert.

Die Versuche in dieser Arbeit belegen, dass mittels STACS hochproduzierende Zellen angereichert werden können. Der Anteil der Zielzellen in der selektierten Population beträgt in den meisten Fällen deutlich über 90 %. Nur bei sehr geringem Anteil der Zielzellen in der Ausgangspopulation von unter 25 % oder in der ersten Elutionsfraktion tritt in den Experimenten eine geringere Reinheit auf. Damit bewegt sich die Effizienz von STACS bei der Selektion von positiven Zellen in einem vergleichbaren oder höheren Niveau wie andere Selektionsprotokolle.<sup>66,72,122,124,149</sup>

Unabhängig vom Expressionslevel der Zellen vor der Selektion führt die Anwendung von STACS dazu, dass der Anteil an Zellen mit einer hohen

Markerproteinkonzentration mit steigender Elutionsfraktion erhöht wird. Dass dieses Ergebnis bei verschiedenen Zelllinien (HEK293 und CHO) in allen Experimenten zu beobachten ist, zeigt, dass die STACS-Methode robust und reproduzierbar ist. Ein Vergleich von SEAP-exprimierenden Kulturen nach verschiedenen STACS-Runden belegt, dass erwartungsgemäß eine höhere Markergenexpression mit einer höheren SEAP-Expression einhergeht (vgl. Kapitel 5.4.4). Anwendern der Technologie ist es so möglich, zu entscheiden, ob sie möglichst viele eluierte Zellen verwenden möchten oder nur die am höchsten produzierende Population in der letzten Elutionsfraktion. Während bei der Proteinproduktion in der Regel nur hochproduzierende Zellen zum Einsatz kommen, kann es bei anderen Fragestellungen ausreichend sein, nur zwischen positiven Zielzellen und unerwünschten Zellen zu unterscheiden.

Interessanterweise basierte die Anreicherung der hochproduzierenden Zellen maßgeblich auf einer Depletion gering exprimierender Zellen in den frühen Elutionen und nur zum Teil auf einer erhöhten Elution von hochproduzierenden Zellen in späteren Elutionsfraktionen (s. Kapitel 5.5.7 und 5.5.8). In weiteren Experimenten sollte genauer untersucht werden, wie sich die Expression des POI in den verschiedenen Elutionsfraktionen im Vergleich zueinander verhält. Im Kapitel 5.4.2 wurden zwar zwei Elutionsfraktionen (E2 und E3) getrennt voneinander kultiviert, allerdings war deren Markergenexpression zum Zeitpunkt der Titerbestimmung vergleichbar und somit war auch in der POI-Konzentration in beiden Überständen kein Unterschied zu messen.

Eine Verknüpfung der POI-Expression mit der Expression eines Markergens kann sowohl bei der Verwendung einer IRES als auch bei einer Kontrolle des Markerproteins durch einen zweiten Promotor erreicht werden. Beide Strategien sind häufig in der Literatur beschrieben (s. Kapitel 2.4.2). In dieser Arbeit führt die Verwendung des zweiten Promotors im Vergleich zur Kontrolle mittels einer IRES zu einer höheren Expression des POI in den selektierten Kulturen. Vermutlich ist eine geringe Markergenexpression und damit eine höhere Stringenz während der Selektion bei der Verwendung des PGK-Promotors der Grund für diese Ergebnis (s. Kapitel 5.4.6). Weitere Experimente mit verschiedenen Promotoren und IRES-Varianten könnten andere Ergebnisse erzielen.



Besonders interessant ist der Einsatz der STACS-Technologie unter dem Aspekt, dass eine Vorkultivierung mit Antibiotika vermieden werden kann. In Experimenten dieser Arbeit wird belegt, dass durch die alleinige konsekutive Verwendung von STACS innerhalb von 9–12 Tagen stabil exprimierende Zellpopulationen generiert werden können. Damit weist die STACS-Selektion einen kurzen Selektionszeitraum auf. Bei der Verwendung von Antibiotika sind Selektionen von vergleichbarer Zeit<sup>68,90,97</sup> bis hin zu mehreren Wochen nötig.<sup>72,90</sup> Bei FACS-basierter Selektion können ebenfalls innerhalb von zwei Wochen stabile Zellen generiert werden.<sup>21,26</sup> Diese Zeiträume liegen im erwartbaren Bereich, weil eine transiente Expression bis zu ca. zwei Wochen zu verzeichnen ist.

Ein großer Vorteil von STACS im Vergleich zu Methoden wie der Antibiotikaselektion ist der geringe Stress, der auf die Zellen einwirkt. So sind nach einer STACS-Selektion das Zellwachstum und die Viabilität nicht oder nur geringfügig beeinträchtigt. Dagegen führen Selektionen mit Antibiotika zu einem hohen Anteil toter Zellen in der Kultur und hohem Zellstress (s. Kapitel 2.4.3.1 sowie Abbildung 23, Abbildung 29, Abbildung 37 und Abbildung 38). Gerade hochproduzierende Zellen sind jedoch aufgrund der höheren Expression bereits größerem Stress ausgesetzt,<sup>90,150</sup> so dass weitere stressinduzierende Faktoren möglichst vermieden werden sollten. Darüber hinaus könnte ein konstanter hoher Selektionsdruck dazu führen, dass vor allem jene Zellen proliferieren, die einen vergleichsweise hohen Anteil des Antibiotika-Resistenzgens zur GOI-Expression aufweisen.<sup>90</sup> Tatsächlich zeigen Zellen in dieser Arbeit, die nur mit STACS selektiert werden, ein höheres POI zu Markerexpressionsverhältnis als Zellen, die zuvor mit Puromycin selektiert wurden. Kaufmann et al. beschreiben in ihrer Studie, dass puromycinselektierte Zellen im Vergleich zu FACS-selektierten Zellen häufig eine Mosaikexpression bei klonalen Zelllinien aufweisen. Die Autoren vermuten, dass Antibiotikaselektion zu einem Proliferationsvorteil von Zellen führt, die das Resistenzgen zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimieren, statt den Einfluss von repressiven Chromatin Strukturen zu vermeiden.<sup>26</sup> STACS stellt wie FACS dagegen nur einen kurzen Selektionsvorteil zu wenigen Zeitpunkten dar.

Trotz seiner hohen Effizienz bei der Selektion von hochproduzierenden Zellen kann die STACS-Technologie auch mit etablierten Selektionsstrategien kombiniert werden. So werden in dieser Arbeit mit Puromycin selektierte, stabile Zellen mit

STACS selektiert. Die isolierten Populationen erreichen bis zu 3,2-mal höhere Produktausbeuten als die nur mit Puromycin selektierte Kultur. Weitere Studien könnten den Einfluss anderer Antibiotika untersuchen. So zeigen einige Experimente, dass Zeocin™ besonders effektiv bei der Selektion ist.<sup>72,90,97</sup> Es ist daher davon auszugehen, dass STACS auch mit anderen etablierten Verfahren, wie DHFR- oder GS-Selektion kombiniert werden kann. Diese Kombination ist eine attraktive Alternative zur Erhöhung des Selektionsdrucks durch eine höhere Konzentration des Selektionsreagenz, welche nicht immer in einer höheren Expression des POI resultiert.<sup>65,68,97</sup> Die Stabilisierung der Expression durch STACS ist zudem ein wichtiger Vorteil, da eine kontinuierliche Kultivierung mit Selektionsreagenzien oft vermieden werden soll.<sup>20</sup> Des Weiteren kann der extrazelluläre TST mittels Fluoreszenz-konjugiertem Strep-Tactin® markiert und die Zellen so in einem FACS sortiert werden. Außerdem wäre es interessant zu untersuchen, wie die STACS-Methode mit Transposasetechnologien kombiniert werden kann, um höhere Ausbeuten und eine längere Expressionsstabilität zu erhalten, welche für Transposasen publiziert sind.<sup>59,65-69</sup> Auch können weitere genetische Elemente in den Vektor integriert werden, um die POI-Expression zu erhöhen und zu stabilisieren. Ye et al. konnten zeigen, dass die POI-Expression in heterogenen Pools nach einer mehrfachen FACS-Selektion im Laufe der Zeit sinkt und dass dieser Effekt durch *universal chromatin-opening elements* (UCOE) vermieden wird.<sup>21</sup>

Ein großer Vorteil von STACS im Vergleich zu gerätebasierter Selektion wie FACS sind die sehr geringen Initialkosten. Damit ist STACS auch Laboren zugänglich, die über ein geringes Budget verfügen oder hohe Anschaffungskosten für ein FACS vermeiden möchten. Gleichzeitig ist die Methode leicht zu skalieren, ohne dass sich die Zeit zur Selektion der Zellen aufgrund der höheren zu selektierenden Zellzahl verlängert. Die Zeit, die für eine STACS eingeplant werden muss, liegt inkl. der Vorbereitung der Beads und der Zellen bei ca. 100 min. Eine Parallelisierung der Methode ist mit nur einem geringfügig höheren Zeitaufwand pro weiterer Probe möglich.

Es muss bei diesen Ergebnissen berücksichtigt werden, dass als POI in dieser Arbeit nur SEAP eingesetzt wird. Weitere Studien mit anderen Proteinen sind wünschenswert, um die Methode mit einer größeren Anzahl verschiedener POI zu demonstrieren. Außerdem lässt der höhere Anteil hochproduzierender Zellen

annehmen, dass im Falle der Entwicklung von klonalen Zelllinien weniger Zellen kultiviert werden müssten, weil mehr hochproduzierende Zellen in der Kultur vorhanden sind. Darum sollten STACS-selektierte Zellen in Zukunft auch auskloniert werden, um weitere Experimente zu dieser Fragestellung durchzuführen.

Ein weiter Aspekt wurde im Anschluss an die Experimente dieser Arbeit im Rahmen eines Patents zu STACS-Technologie untersucht. In dem Experiment wurde die Markergenkassette auf die Bestandteile des TST und der CD4-Transmembrandomäne reduziert. Ein kleineres Markerprotein ohne GFP führt zu einer erhöhten POI-Expression, da die Zelle weniger Ressourcen für die Synthese des Markerproteins verwenden muss. Allerdings stellte sich heraus, dass ohne GFP die Transmembrandomäne in *lipid rafts* lokalisiert ist und dies die Zellausbeute der Selektion reduziert. Erst eine Mutation einiger Aminosäuren führte wieder zu einer uniformen Verteilung des Markers auf der Membran und zu einer ausreichend hohen Zellausbeute.<sup>151</sup> Eine interessante Fragestellung ist daher, wie sich andere Transmembrandomänen auf die Ergebnisse einer STACS-Selektion auswirken.

In dieser Arbeit wird ebenfalls dargelegt, dass auch andere Matrices als magnetische Beads verwendet werden können. Gerade die Verwendung von Agarosematrices ist interessant, da diese in der Regel günstiger sind als magnetische Beads. Außerdem würde die Verwendung der in dieser Arbeit genutzten großen Agarose-Beads einen großen Vorteil bei der Automatisierung der Methode darstellen. Aufgrund der hohen Sedimentationsgeschwindigkeit der Beads könnte ähnlich effizient wie mit magnetischen Beads und einem Magneten gearbeitet werden. Dadurch ließe sich die Methode auf jedes automatisierte Pipettiersystem übertragen. Dies würde eine universelle automatisierte Hochdurchsatzselektion von Zellen mittels STACS ermöglichen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ziele dieser Arbeit erreicht wurden. Mit STACS wurde eine innovative, effektive, kosteneffiziente und leicht durchzuführende Methode zur Selektion von stabilen, hochproduzierenden Zellen entwickelt. Die Viabilität der Zellen sowie das Zellwachstum nach der Selektion sind nicht nennenswert beeinträchtigt. Durch Optimierung der Methode konnte die Protokolldauer reduziert und die ideale Biotinkonzentration von 1 mM zur Elution bestimmt werden. Experimente, die einen signifikanten Einfluss der Inkubation der Zell-Bead-

Komplexe auf dem Magneten nachweisen, geben einen tieferen Einblick in das STACS-Funktionsprinzip, der auch für die Magnet-Bead-basierte TACS-Technologie interessant sein dürfte. STACS stellt damit die erste Bead-basierte Methode dar, bei der Zellen mit einer erhöhten Expression des POI in Abhängigkeit der Oberflächenkonzentration des Markerproteins selektiert werden können.

## 6. Literatur

- (1) Lai, T.; Yang, Y.; Ng, S. K. Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (5), 579–603. <https://doi.org/10.3390/ph6050579>.
- (2) Zhu, M. M.; Mollet, M.; Hubert, R. S.; et al. Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology* **2017**, 1639–1669. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-52287-6\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-319-52287-6_29).
- (3) Ecker, D. M.; Jones, S. D.; Levine, H. L. The Therapeutic Monoclonal Antibody Market. *mAbs* **2015**, *7* (1), 9–14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>.
- (4) Zhu, J. Mammalian Cell Protein Expression for Biopharmaceutical Production. *Biotechnology Advances* **2012**, *30* (5), 1158–1170. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>.
- (5) Tripathi, N. K.; Shrivastava, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>.
- (6) Gaughan, C. L. The Present State of the Art in Expression, Production and Characterization of Monoclonal Antibodies. *Mol Divers* **2016**, *20* (1), 255–270. <https://doi.org/10.1007/s11030-015-9625-z>.
- (7) Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2010. *Nature Biotechnology* **2010**, *28* (9), 917–924. <https://doi.org/10.1038/nbt0910-917>.
- (8) Lu, R.-M.; Hwang, Y.-C.; Liu, I.-J.; et al. Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases. *Journal of Biomedical Science* **2020**, *27* (1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>.
- (9) Yuan, M.; Wu, N. C.; Zhu, X.; et al. A Highly Conserved Cryptic Epitope in the Receptor Binding Domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* **2020**, *368* (6491), 630–633. <https://doi.org/10.1126/science.abb7269>.
- (10) Almo, S. C.; Garforth, S. J.; Hillerich, B. S.; et al. Protein Production from the Structural Genomics Perspective: Achievements and Future Needs. *Curr Opin Struct Biol* **2013**, *23* (3), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.02.014>.
- (11) Büssow, K. Stable Mammalian Producer Cell Lines for Structural Biology. *Current Opinion in Structural Biology* **2015**, *32*, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.03.002>.
- (12) Yuan, M.; Huang, D.; Lee, C.-C. D.; et al. Structural and Functional Ramifications of Antigenic Drift in Recent SARS-CoV-2 Variants. *bioRxiv* **2021**. <https://doi.org/10.1101/2021.02.16.430500>.
- (13) Thomson, E. C.; Rosen, L. E.; Shepherd, J. G.; et al. Circulating SARS-CoV-2 Spike N439K Variants Maintain Fitness While Evading Antibody-Mediated

- Immunity. *Cell* **2021**, S0092867421000805.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.037>.
- (14) Greaney, A. J.; Starr, T. N.; Gilchuk, P.; et al. Complete Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain That Escape Antibody Recognition. *Cell Host Microbe* **2021**, *29* (1), 44-57.e9.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.11.007>.
- (15) Long, Q.-X.; Jia, Y.-J.; Wang, X.; et al. Immune Memory in Convalescent Patients with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell Discov* **2021**, *7*.  
<https://doi.org/10.1038/s41421-021-00250-9>.
- (16) Almo, S. C.; Love, J. D. Better and Faster: Improvements and Optimization for Mammalian Recombinant Protein Production. *Curr Opin Struct Biol* **2014**, *26*, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.03.006>.
- (17) Gutiérrez-Granados, S.; Cervera, L.; Kamen, A. A.; Gòdia, F. Advancements in Mammalian Cell Transient Gene Expression (TGE) Technology for Accelerated Production of Biologics. *Critical Reviews in Biotechnology* **2018**, *38* (6), 918–940. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1419459>.
- (18) Agrawal, V.; Bal, M. Strategies for Rapid Production of Therapeutic Proteins in Mammalian Cells. *BioProcess International* **2012**, *10* (4), 32–48.
- (19) Jostock, T.; Knopf, H.-P. Mammalian Stable Expression of Biotherapeutics. In *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols*; Voynov, V., Caravella, J. A., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; pp 227–238. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_15).
- (20) Wurm, F. M. Production of Recombinant Protein Therapeutics in Cultivated Mammalian Cells. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (11), 1393–1398.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1026>.
- (21) Ye, J.; Alvin, K.; Latif, H.; et al. Rapid Protein Production Using CHO Stable Transfection Pools. *Biotechnology Progress* **2010**, *26* (5), 1431–1437.  
<https://doi.org/10.1002/btpr.469>.
- (22) Priola, J. J.; Calzadilla, N.; Baumann, M.; et al. High-Throughput Screening and Selection of Mammalian Cells for Enhanced Protein Production. *Biotechnology Journal* **2016**, *11* (7), 853–865.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201500579>.
- (23) Le, K.; Tan, C.; Gupta, S.; et al. A Novel Mammalian Cell Line Development Platform Utilizing Nanofluidics and Optoelectro Positioning Technology. *Biotechnology Progress* **2018**, *34* (6), 1438–1446.  
<https://doi.org/10.1002/btpr.2690>.
- (24) Cossarizza, A.; Chang, H.-D.; Radbruch, A.; et al. Guidelines for the Use of Flow Cytometry and Cell Sorting in Immunological Studies\*. *European Journal of Immunology* **2017**, *47* (10), 1584–1797.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201646632>.
- (25) Sutermeister, B. A.; Darling, E. M. Considerations for High-Yield, High-Throughput Cell Enrichment: Fluorescence versus Magnetic Sorting. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 227. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36698-1>.
- (26) Kaufman, W. L.; Kocman, I.; Agrawal, V.; et al. Homogeneity and Persistence of Transgene Expression by Omitting Antibiotic Selection in Cell Line Isolation. *Nucleic Acids Research* **2008**, *36* (17), e111–e111.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn508>.

- (27) Wurm, F. M. Integration, Amplification and Stability of Plasmid Sequences in CHO Cell Cultures. *Biologicals* **1990**, *18* (3), 159–164. [https://doi.org/10.1016/1045-1056\(90\)90002-H](https://doi.org/10.1016/1045-1056(90)90002-H).
- (28) Barnes, L. M.; Bentley, C. M.; Dickson, A. J. Stability of Protein Production from Recombinant Mammalian Cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *81* (6), 631–639. <https://doi.org/10.1002/bit.10517>.
- (29) Castan, A.; Schulz, P.; Wenger, T.; Fischer, S. Cell Line Development. In *Biopharmaceutical Processing*; Elsevier, 2018; pp 131–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00007-4>.
- (30) *Therapeutic Proteins*; Voynov, V., Caravella, J. A., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; Vol. 899. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1>.
- (31) Siebertz, K.; van Bebber, D.; Hochkirchen, T. *Statistische Versuchsplanung*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-55743-3>.
- (32) Oyejola, B. A.; Nwanya, J. C. Selecting the Right Central Composite Design. *International Journal of Statistics and Applications* **2015**, *5* (1), 21–30.
- (33) Geisse, S. Reflections on More than 10 Years of TGE Approaches. *Protein Expression and Purification* **2009**, *64* (2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.10.017>.
- (34) Jäger, V.; Büssow, K.; Schirrmann, T. Transient Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells. In *Animal Cell Culture*; Al-Rubeai, M., Ed.; Cell Engineering; Springer International Publishing: Cham, 2015; Vol. 9, pp 27–64. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_2).
- (35) Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G. Poly(Ethylenimine) and Its Role in Gene Delivery. *Journal of Controlled Release* **1999**, *60* (2), 149–160. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00090-5).
- (36) Dunlap, D. D.; Maggi, A.; Soria, M. R.; Monaco, L. Nanoscopic Structure of DNA Condensed for Gene Delivery. 7.
- (37) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; et al. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92* (16), 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>.
- (38) Xie, Q.; Xinyong, G.; Xianjin, C.; Yayu, W. PEI/DNA Formation Affects Transient Gene Expression in Suspension Chinese Hamster Ovary Cells via a One-Step Transfection Process. *Cytotechnology* **2013**, *65* (2), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9483-9>.
- (39) Sang, Y.; Xie, K.; Mu, Y.; et al. Salt Ions and Related Parameters Affect PEI–DNA Particle Size and Transfection Efficiency in Chinese Hamster Ovary Cells. *Cytotechnology* **2015**, *67* (1), 67–74. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9658-z>.
- (40) Bertschinger, M.; Schertenleib, A.; Cevey, J.; et al. The Kinetics of Polyethylenimine-Mediated Transfection in Suspension Cultures of Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol Biotechnol* **2008**, *40* (2), 136–143. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9069-0>.
- (41) Rehman, Z. ur; Sjollem, K. A.; Kuipers, J.; et al. Nonviral Gene Delivery Vectors Use Syndecan-Dependent Transport Mechanisms in Filopodia To

- Reach the Cell Surface. *ACS Nano* **2012**, 6 (8), 7521–7532. <https://doi.org/10.1021/nn3028562>.
- (42) Clamme, J.-P.; Krishnamoorthy, G.; Mély, Y. Intracellular Dynamics of the Gene Delivery Vehicle Polyethylenimine during Transfection: Investigation by Two-Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2003**, 1617 (1), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.09.002>.
- (43) Kichler, A.; Leborgne, C.; Coeytaux, E.; Danos, O. Polyethylenimine-Mediated Gene Delivery: A Mechanistic Study. *The Journal of Gene Medicine* **2001**, 3 (2), 135–144. <https://doi.org/10.1002/jgm.173>.
- (44) Rehman, Z. ur; Hoekstra, D.; Zuhorn, I. S. Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis. *ACS Nano* **2013**, 7 (5), 3767–3777. <https://doi.org/10.1021/nn3049494>.
- (45) Han, X.; Fang, Q.; Yao, F.; et al. The Heterogeneous Nature of Polyethylenimine-DNA Complex Formation Affects Transient Gene Expression. *Cytotechnology* **2009**, 60 (1–3), 63–75. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9215-y>.
- (46) Delafosse, L.; Xu, P.; Durocher, Y. Comparative Study of Polyethylenimines for Transient Gene Expression in Mammalian HEK293 and CHO Cells. *Journal of Biotechnology* **2016**, 227, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.028>.
- (47) Schmitt, M. G.; White, R. N.; Barnard, G. C. Development of a High Cell Density Transient CHO Platform Yielding MAb Titers Greater than 2 g/L in Only 7 Days. *Biotechnology Progress* n/a (n/a), e3047. <https://doi.org/10.1002/btpr.3047>.
- (48) Derouazi, M.; Girard, P.; Tilborgh, F. V.; et al. Serum-Free Large-Scale Transient Transfection of CHO Cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, 87 (4), 537–545. <https://doi.org/10.1002/bit.20161>.
- (49) Bertschinger, M.; Backliwal, G.; Schertenleib, A.; et al. Disassembly of Polyethylenimine-DNA Particles in Vitro: Implications for Polyethylenimine-Mediated DNA Delivery. *Journal of Controlled Release* **2006**, 116 (1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.09.006>.
- (50) Gebhart, C. L.; Kabanov, A. V. Evaluation of Polyplexes as Gene Transfer Agents. *Journal of Controlled Release* **2001**, 73 (2), 401–416. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00357-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00357-1).
- (51) Boeckle, S.; von Gersdorff, K.; van der Piepen, S.; et al. Purification of Polyethylenimine Polyplexes Highlights the Role of Free Polycations in Gene Transfer. *J Gene Med* **2004**, 6 (10), 1102–1111. <https://doi.org/10.1002/jgm.598>.
- (52) Backliwal, G.; Hildinger, M.; Hasija, V.; Wurm, F. M. High-Density Transfection with HEK-293 Cells Allows Doubling of Transient Titers and Removes Need for a Priori DNA Complex Formation with PEI. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, 99 (3), 721–727. <https://doi.org/10.1002/bit.21596>.
- (53) Raymond, C.; Tom, R.; Perret, S.; et al. A Simplified Polyethylenimine-Mediated Transfection Process for Large-Scale and High-Throughput



- Applications. *Methods* **2011**, *55* (1), 44–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.04.002>.
- (54) Li, R. Transient Transfection of CHO Cells Using Linear Polyethylenimine Is a Simple and Effective Means of Producing Rainbow Trout Recombinant IFN- $\gamma$  Protein. *Cytotechnology* **2015**, *67* (6), 987–993.  
<https://doi.org/10.1007/s10616-014-9737-9>.
- (55) Fang, Q.; Shen, B. Optimization of Polyethylenimine-Mediated Transient Transfection Using Response Surface Methodology Design. *Electron. J. Biotechnol.* **2010**, *13* (5), 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue5-fulltext-6>.
- (56) Rajendra, Y.; Hougland, M. D.; Alam, R.; et al. A High Cell Density Transient Transfection System for Therapeutic Protein Expression Based on a CHO GS-knockout Cell Line: Process Development and Product Quality Assessment. *Biotechnology and Bioengineering* **2015**, *112* (5), 977–986.  
<https://doi.org/10.1002/bit.25514>.
- (57) Thompson, B. C.; Segarra, C. R. J.; Mozley, O. L.; et al. Cell Line Specific Control of Polyethylenimine-Mediated Transient Transfection Optimized with “Design of Experiments” Methodology. *Biotechnology Progress* **2012**, *28* (1), 179–187. <https://doi.org/10.1002/btpr.715>.
- (58) Backliwal, G.; Hildinger, M.; Chenuet, S.; et al. Rational Vector Design and Multi-Pathway Modulation of HEK 293E Cells Yield Recombinant Antibody Titers Exceeding 1 g/l by Transient Transfection under Serum-Free Conditions. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (15), e96.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn423>.
- (59) Matasci, M.; Baldi, L.; Hacker, D. L.; Wurm, F. M. The PiggyBac Transposon Enhances the Frequency of CHO Stable Cell Line Generation and Yields Recombinant Lines with Superior Productivity and Stability. *Biotechnology and Bioengineering* **2011**, *108* (9), 2141–2150.  
<https://doi.org/10.1002/bit.23167>.
- (60) Hunter, M.; Yuan, P.; Vavilala, D.; Fox, M. Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. *Current Protocols in Protein Science* **2019**, *95* (1), e77.  
<https://doi.org/10.1002/cpps.77>.
- (61) Cereghini, S.; Yaniv, M. Assembly of Transfected DNA into Chromatin: Structural Changes in the Origin-Promoter-Enhancer Region upon Replication. *The EMBO Journal* **1984**, *3* (6), 1243–1253.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb01959.x>.
- (62) Daramola, O.; Stevenson, J.; Dean, G.; et al. A High-Yielding CHO Transient System: Coexpression of Genes Encoding EBNA-1 and GS Enhances Transient Protein Expression. *Biotechnology Progress* **2014**, *30* (1), 132–141.  
<https://doi.org/10.1002/btpr.1809>.
- (63) Dalton, A. C.; Barton, W. A. Over-Expression of Secreted Proteins from Mammalian Cell Lines. *Protein Sci* **2014**, *23* (5), 517–525.  
<https://doi.org/10.1002/pro.2439>.
- (64) Bandaranayake, A. D.; Almo, S. C. Recent Advances in Mammalian Protein Production. *FEBS Lett* **2014**, *588* (2), 253–260.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.035>.
- (65) Rajendra, Y.; Peery, R. B.; Barnard, G. C. Generation of Stable Chinese Hamster Ovary Pools Yielding Antibody Titers of up to 7.6 g/L Using the

- PiggyBac Transposon System. *Biotechnology Progress* **2016**, 32 (5), 1301–1307. <https://doi.org/10.1002/btpr.2307>.
- (66) Ahmadi, S.; Davami, F.; Davoudi, N.; et al. Monoclonal Antibodies Expression Improvement in CHO Cells by PiggyBac Transposition Regarding Vectors Ratios and Design. *PLoS One* **2017**, 12 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179902>.
- (67) Kowarz, E.; Löscher, D.; Marschalek, R. Optimized Sleeping Beauty Transposons Rapidly Generate Stable Transgenic Cell Lines. *Biotechnology Journal* **2015**, 10 (4), 647–653. <https://doi.org/10.1002/biot.201400821>.
- (68) Balasubramanian, S.; Matasci, M.; Kadlecova, Z.; et al. Rapid Recombinant Protein Production from PiggyBac Transposon-Mediated Stable CHO Cell Pools. *Journal of Biotechnology* **2015**, 200, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.001>.
- (69) Balasubramanian, S.; Rajendra, Y.; Baldi, L.; et al. Comparison of Three Transposons for the Generation of Highly Productive Recombinant CHO Cell Pools and Cell Lines. *Biotechnology and Bioengineering* **2016**, 113 (6), 1234–1243. <https://doi.org/10.1002/bit.25888>.
- (70) XIA, X.; ZHANG, Y.; ZIETH, C. R.; ZHANG, S.-C. Transgenes Delivered by Lentiviral Vector Are Suppressed in Human Embryonic Stem Cells in a Promoter-Dependent Manner. *Stem Cells Dev* **2007**, 16 (1), 167–176.
- (71) Brown, A. J.; Sweeney, B.; Mainwaring, D. O.; James, D. C. Synthetic Promoters for CHO Cell Engineering. *Biotechnology and Bioengineering* **2014**, 111 (8), 1638–1647. <https://doi.org/10.1002/bit.25227>.
- (72) Lanza, A. M.; Kim, D. S.; Alper, H. S. Evaluating the Influence of Selection Markers on Obtaining Selected Pools and Stable Cell Lines in Human Cells. *Biotechnology Journal* **2013**, 8 (7), 811–821. <https://doi.org/10.1002/biot.201200364>.
- (73) Fan, L.; Frye, C. C.; Racher, A. J. The Use of Glutamine Synthetase as a Selection Marker: Recent Advances in Chinese Hamster Ovary Cell Line Generation Processes. *Pharmaceutical Bioprocessing* **2013**, 1 (5), 487–502. <https://doi.org/10.4155/pbp.13.56>.
- (74) Kim, J. Y.; Kim, Y.-G.; Lee, G. M. CHO Cells in Biotechnology for Production of Recombinant Proteins: Current State and Further Potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **2012**, 93 (3), 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>.
- (75) Hitoshi, N.; Ken-ichi, Y.; Jun-ichi, M. Efficient Selection for High-Expression Transfectants with a Novel Eukaryotic Vector. *Gene* **1991**, 108 (2), 193–199. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90434-D](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90434-D).
- (76) Zboray, K.; Sommeregger, W.; Bogner, E.; et al. Heterologous Protein Production Using Euchromatin-Containing Expression Vectors in Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res* **2015**, 43 (16), e102–e102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv475>.
- (77) Emerman, M.; Temin, H. M. Genes with Promoters in Retrovirus Vectors Can Be Independently Suppressed by an Epigenetic Mechanism. *Cell* **1984**, 39 (3, Part 2), 459–467. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90453-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90453-7).
- (78) Bebbington, C. R.; Renner, G.; Thomson, S.; et al. High-Level Expression of a Recombinant Antibody from Myeloma Cells Using a Glutamine Synthetase

- Gene as an Amplifiable Selectable Marker. *Nat Biotechnol* **1992**, *10* (2), 169–175. <https://doi.org/10.1038/nbt0292-169>.
- (79) Curtin, J. A.; Dane, A. P.; Swanson, A.; et al. Bidirectional Promoter Interference between Two Widely Used Internal Heterologous Promoters in a Late-Generation Lentiviral Construct. *Gene Therapy* **2008**, *15* (5), 384–390. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3303105>.
- (80) Balvay, L.; Rifo, R. S.; Ricci, E. P.; et al. Structural and Functional Diversity of Viral IRESes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **2009**, *1789* (9), 542–557. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.07.005>.
- (81) Hellen, C. U. T. IRES-Induced Conformational Changes in the Ribosome and the Mechanism of Translation Initiation by Internal Ribosomal Entry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **2009**, *1789* (9), 558–570. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.06.001>.
- (82) Douin, V.; Bornes, S.; Creancier, L.; et al. Use and Comparison of Different Internal Ribosomal Entry Sites (IRES) in Tricistronic Retroviral Vectors. *BMC Biotechnol* **2004**, *4*, 16. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-16>.
- (83) Bouabe, H.; Fässler, R.; Heesemann, J. Improvement of Reporter Activity by IRES-Mediated Polycistronic Reporter System. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (5), e28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1119>.
- (84) Bochkov, Y. A.; Palmenberg, A. C. Translational Efficiency of EMCV IRES in Bicistronic Vectors Is Dependent upon IRES Sequence and Gene Location. *BioTechniques* **2006**, *41* (3), 283–292. <https://doi.org/10.2144/000112243>.
- (85) Kaminski, A.; Belsham, G. J.; Jackson, R. J. Translation of Encephalomyocarditis Virus RNA: Parameters Influencing the Selection of the Internal Initiation Site. *The EMBO Journal* **1994**, *13* (7), 1673–1681. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06431.x>.
- (86) Koh, E. Y. C.; Ho, S. C. L.; Mariati; et al. An Internal Ribosome Entry Site (IRES) Mutant Library for Tuning Expression Level of Multiple Genes in Mammalian Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8* (12), e82100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082100>.
- (87) Borman, A. M.; Bailly, J. L.; Girard, M.; Kean, K. M. Picornavirus Internal Ribosome Entry Segments: Comparison of Translation Efficiency and the Requirements for Optimal Internal Initiation of Translation in Vitro. *Nucleic Acids Res* **1995**, *23* (18), 3656–3663.
- (88) Gurtu, V.; Yan, G.; Zhang, G. IRES Bicistronic Expression Vectors for Efficient Creation of Stable Mammalian Cell Lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *229* (1), 295–298. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1795>.
- (89) Rees, S.; Coote, J.; Stables, J.; et al. Bicistronic Vector for the Creation of Stable Mammalian Cell Lines That Predisposes All Antibiotic-Resistant Cells to Express Recombinant Protein. *BioTechniques* **1996**, *20* (1), 102–110. <https://doi.org/10.2144/96201st05>.
- (90) Yeo, J. H. M.; Ho, S. C. L.; Mariati, M.; et al. Optimized Selection Marker and CHO Host Cell Combinations for Generating High Monoclonal Antibody

- Producing Cell Lines. *Biotechnology Journal* **2017**, *12* (12), 1700175. <https://doi.org/10.1002/biot.201700175>.
- (91) Hennecke, M.; Kwissa, M.; Metzger, K.; et al. Composition and Arrangement of Genes Define the Strength of IRES-Driven Translation in Bicistronic MRNAs. *Nucleic Acids Res* **2001**, *29* (16), 3327–3334.
- (92) Mizuguchi, H.; Xu, Z.; Ishii-Watabe, A.; et al. IRES-Dependent Second Gene Expression Is Significantly Lower Than Cap-Dependent First Gene Expression in a Bicistronic Vector. *Molecular Therapy* **2000**, *1* (4), 376–382. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0050>.
- (93) Mansha, M.; Wasim, M.; Ploner, C.; et al. Problems Encountered in Bicistronic IRES-GFP Expression Vectors Employed in Functional Analyses of GC-Induced Genes. *Mol Biol Rep* **2012**, *39* (12), 10227–10234. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1898-z>.
- (94) Yang, X.; Cheng, A.; Wang, M.; et al. Structures and Corresponding Functions of Five Types of Picornaviral 2A Proteins. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 1373. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01373>.
- (95) Liu, Z.; Chen, O.; Wall, J. B. J.; et al. Systematic Comparison of 2A Peptides for Cloning Multi-Genes in a Polycistronic Vector. *Sci Rep* **2017**, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02460-2>.
- (96) Li, F.; Vijayasankaran, N.; Shen, A. (Yijuan); et al. Cell Culture Processes for Monoclonal Antibody Production. *MAbs* **2010**, *2* (5), 466–477. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>.
- (97) Spidel, J. L.; Vaessen, B.; Chan, Y. Y.; et al. Rapid High-Throughput Cloning and Stable Expression of Antibodies in HEK293 Cells. *Journal of Immunological Methods* **2016**, *439*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.09.007>.
- (98) Delrue, I.; Pan, Q.; Baczmanska, A. K.; et al. Determination of the Selection Capacity of Antibiotics for Gene Selection. *Biotechnology Journal* **2018**, *13* (8), 1700747. <https://doi.org/10.1002/biot.201700747>.
- (99) Bayat, H.; Hossienzadeh, S.; Pourmaleki, E.; et al. Evaluation of Different Vector Design Strategies for the Expression of Recombinant Monoclonal Antibody in CHO Cells. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **2018**, *48* (2), 160–164. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1421966>.
- (100) Liu, W.; Xiong, Y.; Gossen, M. Stability and Homogeneity of Transgene Expression in Isogenic Cells. *J Mol Med* **2006**, *84* (1), 57–64. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0711-z>.
- (101) Urlaub, G.; Chasin, L. A. Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, *77* (7), 4216–4220.
- (102) Fan, L.; Kadura, I.; Krebs, L. E.; et al. Improving the Efficiency of CHO Cell Line Generation Using Glutamine Synthetase Gene Knockout Cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, *109* (4), 1007–1015. <https://doi.org/10.1002/bit.24365>.
- (103) Chin, C. L.; Chin, H. K.; Chin, C. S. H.; et al. Engineering Selection Stringency on Expression Vector for the Production of Recombinant Human Alpha1-Antitrypsin Using Chinese Hamster Ovary Cells. *BMC Biotechnol* **2015**, *15*. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0145-9>.

- (104) Hu, Z.; Guo, D.; Yip, S. S. M.; et al. Chinese Hamster Ovary K1 Host Cell Enables Stable Cell Line Development for Antibody Molecules Which Are Difficult to Express in DUXB11-Derived Dihydrofolate Reductase Deficient Host Cell. *Biotechnology Progress* **2013**, *29* (4), 980–985. <https://doi.org/10.1002/btpr.1730>.
- (105) Liu, X.; Constantinescu, S. N.; Sun, Y.; et al. Generation of Mammalian Cells Stably Expressing Multiple Genes at Predetermined Levels. *Analytical Biochemistry* **2000**, *280* (1), 20–28. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4478>.
- (106) Mancia, F.; Patel, S. D.; Rajala, M. W.; et al. Optimization of Protein Production in Mammalian Cells with a Coexpressed Fluorescent Marker. *Structure* **2004**, *12* (8), 1355–1360. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.06.012>.
- (107) Oberbek, A.; Matasci, M.; Hacker, D. L.; Wurm, F. M. Generation of Stable, High-Producing CHO Cell Lines by Lentiviral Vector-Mediated Gene Transfer in Serum-Free Suspension Culture. *Biotechnology and Bioengineering* **2011**, *108* (3), 600–610. <https://doi.org/10.1002/bit.22968>.
- (108) Chenuet, S.; Martinet, D.; Besuchet-Schmutz, N.; et al. Calcium Phosphate Transfection Generates Mammalian Recombinant Cell Lines with Higher Specific Productivity than Polyfection. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *101* (5), 937–945. <https://doi.org/10.1002/bit.21972>.
- (109) Aebischer-Gumy, C.; Moretti, P.; Ollier, R.; et al. SPLICELECT™: An Adaptable Cell Surface Display Technology Based on Alternative Splicing Allowing the Qualitative and Quantitative Prediction of Secreted Product at a Single-Cell Level. *MAbs* **2020**, *12* (1). <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1709333>.
- (110) Jostock, T. Cell Surface Display of Polypeptide Isoforms by Stop Codon Readthrough. WO2010022961A1, March 4, 2010.
- (111) Pichler, J.; Hesse, F.; Wieser, M.; et al. A Study on the Temperature Dependency and Time Course of the Cold Capture Antibody Secretion Assay. *Journal of Biotechnology* **2009**, *141* (1), 80–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.03.001>.
- (112) Helman, D.; Toister-Achituv, M.; Bar-Shimon, M.; et al. Novel Membrane-Bound Reporter Molecule for Sorting High Producer Cells by Flow Cytometry. *Cytometry Part A* **2014**, *85* (2), 162–168. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22308>.
- (113) Jayasinghe, S. M.; Wunderlich, J.; McKee, A.; et al. Sterile and Disposable Fluidic Subsystem Suitable for Clinical High Speed Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* **2006**, *70B* (5), 344–354. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20111>.
- (114) Llufrío, E. M.; Wang, L.; Naser, F. J.; Patti, G. J. Sorting Cells Alters Their Redox State and Cellular Metabolome. *Redox Biology* **2018**, *16*, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.004>.
- (115) David, R.; Groebner, M.; Franz, W.-M. Magnetic Cell Sorting Purification of Differentiated Embryonic Stem Cells Stably Expressing Truncated Human CD4 as Surface Marker. *Stem Cells* **2005**, *23* (4), 477–482. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0177>.

- (116) Miltenyi, S.; Müller, W.; Weichel, W.; Radbruch, A. High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS. *Cytometry* **1990**, *11* (2), 231–238. <https://doi.org/10.1002/cyto.990110203>.
- (117) *Cell Separation*; Kumar, A., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; Vol. 106. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-75263-9>.
- (118) Haukanes, B.-I.; Kvam, C. Application of Magnetic Beads in Bioassays. *Nat Biotechnol* **1993**, *11* (1), 60–63. <https://doi.org/10.1038/nbt0193-60>.
- (119) Mohr, F.; Fischer, J. C.; Nikolaus, M.; et al. Minimally Manipulated Murine Regulatory T Cells Purified by Reversible Fab Multimers Are Potent Suppressors for Adoptive T-Cell Therapy. *Eur. J. Immunol.* **2017**, *47* (12), 2153–2162. <https://doi.org/10.1002/eji.201747137>.
- (120) Gaines, P.; Wojchowski, D. M. PIRE5-CD4t, a Dicistronic Expression Vector for MACS- or FACS-Based Selection of Transfected Cells. *BioTechniques* **1999**, *26* (4), 683–688. <https://doi.org/10.2144/99264st04>.
- (121) Han, H.; Liu, Q.; He, W.; et al. An Efficient Vector System to Modify Cells Genetically. *PLoS One* **2011**, *6* (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026380>.
- (122) Matheson, N. J.; Peden, A. A.; Lehner, P. J. Antibody-Free Magnetic Cell Sorting of Genetically Modified Primary Human CD4+ T Cells by One-Step Streptavidin Affinity Purification. *PLoS ONE* **2014**, *9* (10), e111437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111437>.
- (123) Gotoh, H.; Matsumoto, Y. Cell-Surface Streptavidin Fusion Protein for Rapid Selection of Transfected Mammalian Cells. *Gene* **2007**, *389* (2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.10.019>.
- (124) Lee, M. Y.; Lufkin, T. Development of the “Three-Step MACS”: A Novel Strategy for Isolating Rare Cell Populations in the Absence of Known Cell Surface Markers from Complex Animal Tissue. *J Biomol Tech* **2012**, *23* (2), 69–77. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2302-003>.
- (125) Liu, L.; Sommermeyer, D.; Cabanov, A.; et al. Inclusion of Strep-Tag II in Design of Antigen Receptors for T-Cell Immunotherapy. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34* (4), 430–434. <https://doi.org/10.1038/nbt.3461>.
- (126) Yeung, Y. A.; Wittrup, K. D. Quantitative Screening of Yeast Surface-Displayed Polypeptide Libraries by Magnetic Bead Capture. *Biotechnology Progress* **2002**, *18* (2), 212–220. <https://doi.org/10.1021/bp010186l>.
- (127) Droz, X.; Harraghy, N.; Lançon, E.; et al. Automated Microfluidic Sorting of Mammalian Cells Labeled with Magnetic Microparticles for Those That Efficiently Express and Secrete a Protein of Interest. *Biotechnology and Bioengineering* **2017**, *114* (8), 1791–1802. <https://doi.org/10.1002/bit.26270>.
- (128) de Almeida Fuzeta, M.; de Matos Branco, A. D.; Fernandes-Platzgummer, A.; et al. Addressing the Manufacturing Challenges of Cell-Based Therapies. In *Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology*; Silva, A. C., Moreira, J. N., Lobo, J. M. S., Almeida, H., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 225–278. [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_118](https://doi.org/10.1007/10_2019_118).
- (129) Schmidt, T. G. M.; Batz, L.; Bonet, L.; et al. Development of the Twin-Strep-Tag® and Its Application for Purification of Recombinant Proteins from Cell

- Culture Supernatants. *Protein Expression and Purification* **2013**, 92 (1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.021>.
- (130) Busch, D. H.; Wagner, H. Reversible MHC Multimer Staining for Functional Purification of Antigen-Specific T Cells. US7776562B2, August 17, 2010.
- (131) Stadler, H. Chromatographic Isolation of Cells and Other Complex Biological Materials. EP2817625A2, December 31, 2014.
- (132) Carl, U. D. Method of Isolating a Target Cell. WO2015166049A1, November 5, 2015.
- (133) Kelderman, S.; Heemskerk, B.; Fanchi, L.; et al. Antigen-Specific TIL Therapy for Melanoma: A Flexible Platform for Personalized Cancer Immunotherapy. *European Journal of Immunology* **2016**, 46 (6), 1351–1360. <https://doi.org/10.1002/eji.201545849>.
- (134) Mühlberger, M.; Unterweger, H.; Band, J.; et al. Loading of Primary Human T Lymphocytes with Citrate-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Does Not Impair Their Activation after Polyclonal Stimulation. *Cells* **2020**, 9 (2), 342. <https://doi.org/10.3390/cells9020342>.
- (135) Schmitt, A.; Tonn, T.; Busch, D. H.; et al. Adoptive Transfer and Selective Reconstitution of Streptamer-Selected Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cells Leads to Virus Clearance in Patients after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Transfusion* **2011**, 51 (3), 591–599. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02940.x>.
- (136) IBA Lifesciences GmbH. Manual StarGate Direct Transfer Cloning. June 2021.
- (137) Qiagen GmbH. QIAquick® Spin Handbook. January 2021.
- (138) Qiagen GmbH. QIAGEN® Plasmid Purification Handbook. February 2021.
- (139) IBA Lifesciences GmbH. MEXi, Expression and Purification of Recombinant Proteins from Mammalian Cells Using Strep-Tag®. June 2021.
- (140) IBA Lifesciences GmbH. Expression and Purification of Proteins Using Strep-Tactin®XT. May 2021.
- (141) IBA Lifesciences GmbH. Strep-Tag® Purification Using MagStrep “Type3” XT Beads. June 2021.
- (142) ForteBio, Sartorius. Amine Reactive Second-Generation (AR2G) Reagent Kit. 2019.
- (143) ForteBio, Sartorius. Amine Reactive Second-Generation (AR2G) Biosensors. 2019.
- (144) Bertschinger, M.; Chaboche, S.; Jordan, M.; Wurm, F. M. A Spectrophotometric Assay for the Quantification of Polyethylenimine in DNA Nanoparticles. *Analytical Biochemistry* **2004**, 334 (1), 196–198. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.07.020>.
- (145) Wu, H.; Kwong, P. D.; Hendrickson, W. A. Dimeric Association and Segmental Variability in the Structure of Human CD4. *Nature* **1997**, 387 (6632), 527–530. <https://doi.org/10.1038/387527a0>.
- (146) Davies, S. L.; O’Callaghan, P. M.; McLeod, J.; et al. Impact of Gene Vector Design on the Control of Recombinant Monoclonal Antibody Production by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology Progress* **2011**, 27 (6), 1689–1699. <https://doi.org/10.1002/btpr.692>.

- (147) Nehlsen, K.; Schucht, R.; da Gama-Norton, L.; et al. Recombinant Protein Expression by Targeting Pre-Selected Chromosomal Loci. *BMC Biotechnology* **2009**, *9* (1), 100. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-100>.
- (148) IBA Lifesciences GmbH. MHC I Streptamer® Magnetic Microbead Cell Isolation. January 2021.
- (149) Mejia-Pous, C.; Viñuelas, J.; Faure, C.; et al. A Combination of Transposable Elements and Magnetic Cell Sorting Provides a Very Efficient Transgenesis System for Chicken Primary Erythroid Progenitors. *BMC Biotechnol* **2009**, *9*, 81. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-81>.
- (150) Poulain, A.; Mullick, A.; Massie, B.; Durocher, Y. Reducing Recombinant Protein Expression during CHO Pool Selection Enhances Frequency of High-Producing Cells. *Journal of Biotechnology* **2019**, *296*, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.009>.
- (151) Dennis Karthaus. Fractionation of Cells Based on a Marker Protein. EP21190744, August 11, 2021.



## 7. Anhang

### 7.1 Standard-Protokoll für die Selektion von MEXi-293E und CHO-Zellen mittels der in dieser Arbeit entwickelten STACS-Technologie

Die in dieser Arbeit etablierte Selektionsmethode erlaubt die Selektion von hochproduzierenden Zellen. Nachfolgend wird die Methode beschrieben, wie sie im Kern in den Versuchsansätzen dieser Arbeit verwendet wurde. Abweichungen von der hier beschriebenen Methode, die im Zuge der Entwicklung und Optimierung in den jeweiligen Experimenten nötig waren, sind in den jeweiligen Experimenten beschrieben. Bei der Selektion von CHO-Zellen wird *Buffer IS* (8,06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 0,5% BSA, pH7,4) verwendet. Werden hingegen MEXi-293E-Zellen selektiert, wird in allen Schritten, sofern nicht anders beschrieben, statt *Buffer IS* MEXi-TM-Medium genutzt. Für die im Folgenden beschriebene Methode wird der Einfachheit halber nur der *Buffer IS* genannt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen für 5 min bei 100 × *g*.

Eine benötigte Menge Strep-Tactin® *Magnetic Microbeads* wird zweimal mit jeweils 1 ml kalten *Buffer IS* gewaschen. Anschließend werden die Beads in einem *Buffer IS* Volumen aufgenommen, welches dem der eingesetzten Bead-Suspension entspricht und bis zur Verwendung bei 2–8 °C gelagert. Die zu selektierenden Zellen können bei bis zu 25 °C zentrifugiert werden. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in mindestens 10 ml kaltem *Buffer IS* suspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C, wird das Zellpellet erneut in *Buffer IS* gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen wieder bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Sollten die Zellen zur leichten Aggregation neigen, wie die in dieser Arbeit verwendeten MEXi-293E-Zellen, wird nach der ersten Zentrifugation der Zellen statt *Buffer IS* 37 °C warmes PBS verwendet. Danach wird die Suspension abermals zentrifugiert, das Pellet in 37 °C warmen *Dissociation Buffer* suspendiert, für 5–10 min bei 37 °C inkubiert und Zellaggregate anschließend mit einer Pipette durch

vorsichtiges Auf- und Abpipettieren reduziert. Es folgt die Zugabe von 30 ml kaltem MEXi-TM-Medium, welches nach einer Zentrifugation bei 4 °C entfernt wird.

Die gewaschenen *Microbeads* werden zu dem Zellpellt pipettiert und das Pellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren suspendiert. Ggf. kann ein geringes Volumen *Buffer IS* hinzugefügt werden, wenn das Flüssigkeitsvolumen für ein Suspendieren der Zellen nicht ausreicht. Nun wird das Zell-Bead-Gemisch für mindestens 20 min bei 2–8 °C auf einem Rollermixer inkubiert. Für die weiteren Schritte werden die Zellen und Reagenzien auf Eis gelagert.

Es folgt das Waschen der gebundenen Zellen. Der Zell-Bead-Mix wird dazu in eine 15 ml Schraubröhre mit 10 ml eiskaltem *Buffer IS* überführt. Mittels vorsichtigen Pipettierens (ca. 3–5-mal) wird der Ansatz gemischt, bis keine Aggregate mehr zu erkennen sind und dann für ca. 3 min auf einem *StrepMan*-Magneten horizontal gelagert, bis alle Beads an der Gefäßwand gebunden sind. Nichtgebundene Zellen werden mit dem Überstand entfernt. Die beschriebene Waschprozedur wird drei weitere Male wiederholt.

Nachdem der Überstand ein viertes Mal entfernen wurde, folgt die Elution der Zellen, indem die Beads in 5 ml Elutionspuffer in einer 15 ml Schraubröhre suspendiert werden. Der Elutionspuffer besteht bei MEXi-293E-Zellen aus MEXi-CM-Medium, dem aus einer 100 mM D-Biotinlösung Biotin zugesetzt wird. Bei CHO-Zellen wird statt MEXi-CM *Buffer IS* verwendet. Eingestellte Biotinkonzentrationen werden in den jeweiligen Experimenten näher beschrieben. Das suspendierte Bead-Zell-Gemisch wird für mindestens 10 min bei 2–8 °C auf einem Rollermixer inkubiert. Mittels Auf- und Abpipettierens wird die Suspension gemischt und die 15 ml Schraubröhre wieder 3 min auf dem *StrepMan*-Magneten horizontal gelagert. Der Überstand (Elutionsfraktion 1) mit den eluierten Zellen wird zur weiteren Verwendung abgenommen und in eine frische, sterile Schraubröhre gegeben. Während der Prozedur verbleibt die Schraubröhre mit den Beads auf dem Magneten. Die Elutionsschritte werden so oft wiederholt, bis alle Zellen von den Beads dissoziiert und entfernt sind. Längere Inkubationszeiten während der Elution sind nicht nachteilig, verbessern das Ergebnis jedoch nicht. Eine Inkubation auf einem Rollermixer zwischen den weiteren Elutionen kann sogar entfallen. Nähere Angaben dazu finden sich in den jeweiligen Experimenten. Zur späteren Kultivierung können die Zellen in den

Elutionsfraktionen mit einem Durchflusszytometer analysiert werden. Geeignete Fraktionen werden vereinigt, für 5 min bei  $100 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert, anschließend in  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  warmen Kulturmedium suspendiert und in einem Schüttelinkubator weiter kultiviert.

Die Methode wurde am 11. August 2021 unter der Nummer EP21190744 beim europäischen Patentamt eingereicht.

## 7.2 Übersicht der Selektionsbedingungen für die Experimente in Kapitel 5.3 und 5.4

Die folgenden Tabellen beschreiben die exakten Bedingungen der STACS-Selektion sofern diese von denen in Kapitel 7.1 abweichen bzw. im Ergebniskapitel nicht beschrieben sind.

**Tabelle 14:** Übersicht der STACS-Selektionsbedingungen der Selektionen in Kapitel 5.3. Angaben mit „+“ bei der Biotinkonzentration beschreiben die Biotinkonzentration, um die die bereits im Medium vorhandene Biotinkonzentration erhöht wurde.

### Selektion I – CHO-P

Eingesetzte Zellmenge	$2 \times 10^7$ Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 $\mu\text{l}$
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	60 $\mu\text{l}$
Biotinkonzentration Elution 1	1 mM
Biotinkonzentration Elution 2	2 mM
Biotinkonzentration Elution 3	3 mM
Biotinkonzentration Elution 4	1 mM

### Selektion II – CHO-P-48h-I

Eingesetzte Zellmenge	$7,2 \times 10^6$ Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor -Zugabe	300 $\mu\text{l}$
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	30 $\mu\text{l}$
Biotinkonzentration Elution 1	1 mM
Biotinkonzentration Elution 2	2 mM
Biotinkonzentration Elution 3	3 mM
Biotinkonzentration Elution 4	1 mM

**Selektion I – MEXi-P**

Eingesetzte Zellmenge	$2 \times 10^7$ Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 $\mu$ l
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	60 $\mu$ l
Biotinkonzentration Elution 1	+ 1 mM
Biotinkonzentration Elution 2	+ 1 mM
Biotinkonzentration Elution 3	+ 1 mM

**Selektion II – MEXi-P-48h-I**

Eingesetzte Zellmenge	$2 \times 10^7$ Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 $\mu$ l
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	60 $\mu$ l
Biotinkonzentration Elution 1	+ 1 mM
Biotinkonzentration Elution 2	+ 2 mM
Biotinkonzentration Elution 3	+ 2 mM

**Selektion III – MEXi-P-48h-II**

Eingesetzte Zellmenge	$1,22 \times 10^7$ Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 $\mu$ l
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	60 $\mu$ l
Biotinkonzentration Elution 1	+ 1 mM
Biotinkonzentration Elution 2	+ 2 mM
Biotinkonzentration Elution 3	+ 2 mM

**Tabelle 15:** Übersicht der STACS-Selektionsbedingungen der Selektionen in Kapitel 5.4. Angaben mit „+“ bei der Biotinkonzentration beschreiben die Biotinkonzentration, um die die bereits im Medium vorhandene Biotinkonzentration erhöht wurde.

#### **Selektion I – CHO-ZSG4-P und CHO-ZSG5-P**

Eingesetzte Zellmenge	2 × 10 <sup>7</sup> Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 µl
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	60 µl
Biotinkonzentration Elution 1	1 mM
Biotinkonzentration Elution 2	2 mM
Biotinkonzentration Elution 3	3 mM
Biotinkonzentration Elution 4	1 mM

#### **Selektion II – CHO-ZSG4-P-I und CHO-ZSG5-P-I**

Eingesetzte Zellmenge	2 × 10 <sup>7</sup> Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 µl
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	60 µl
Biotinkonzentration Elution 1 (CHO-TF)	+ 3 mM
Biotinkonzentration Elution 2 (CHO-TF)	+ 5 mM
Biotinkonzentration Elution 3 (CHO-TF)	+ 0,55 mM

#### **Selektion I – CHO-ZSG4-woP und CHO-ZSG5-woP**

Eingesetzte Zellmenge	4 × 10 <sup>7</sup> Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 µl
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	60 µl
Biotinkonzentration Elution 1	1 mM
Biotinkonzentration Elution 2	2 mM
Biotinkonzentration Elution 3	3 mM
Biotinkonzentration Elution 4	1 mM

**Selektion II – CHO-ZSG4-woP-I und CHO-ZSG5-woP-I**

Eingesetzte Zellmenge pZSG4	6,9 × 10 <sup>6</sup> Zellen
Eingesetzte Zellmenge pZSG5	1,8 × 10 <sup>7</sup> Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 µl
Volumen <i>Microbead</i> -lsg. (ZSG4, ZSG5)	30 µl, 60 µl
Biotinkonzentration Elution 1	2 mM
Biotinkonzentration Elution 2	6 mM

**Selektion III – CHO-ZSG4-woP-II und CHO-ZSG5-woP-II**

Eingesetzte Zellmenge	2 × 10 <sup>7</sup> Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 µl
Volumen <i>Microbead</i> -lsg. (ZSG4, ZSG5)	30 µl, 60 µl
Biotinkonzentration Elution 1	3 mM
Biotinkonzentration Elution 2	5 mM
Biotinkonzentration Elution 3	1 mM

**Selektion IV – CHO-ZSG4-woP-III und CHO-ZSG5-woP-III**

Eingesetzte Zellmenge	2 × 10 <sup>7</sup> Zellen
Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 µl
Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	60 µl
Biotinkonzentration Elution 1	3 mM
Biotinkonzentration Elution 2	5 mM
Biotinkonzentration Elution 3	1 mM

**Selektion I – MEXi-ZSG4-woP und MEXi-ZSG5-woP sowie****Selektion II – MEXi-ZSG4-woP-I und MEXi-ZSG5-woP-I**

Eingesetzte Zellmenge	$6 \times 10^7$ Zellen
-----------------------	------------------------

Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	-
---	---

Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	500 $\mu$ l
--------------------------------	-------------

Biotinkonzentration Elution 1	1 mM
-------------------------------	------

Biotinkonzentration Elution 2	1 mM
-------------------------------	------

Biotinkonzentration Elution 3	1 mM
-------------------------------	------

Biotinkonzentration Elution 4	1 mM
-------------------------------	------

**Selektion III – MEXi-ZSG4-woP-II und MEXi-ZSG5-woP-II**

Eingesetzte Zellmenge ZSG4	$1,8 \times 10^7$ Zellen
----------------------------	--------------------------

Eingesetzte Zellmenge ZSG5	$2,1 \times 10^7$ Zellen
----------------------------	--------------------------

Ggf. Volumen zur Aufnahme des Zellpellets vor Bead-Zugabe	300 $\mu$ l
---	-------------

Volumen <i>Microbead</i> -lsg.	140 $\mu$ l
--------------------------------	-------------

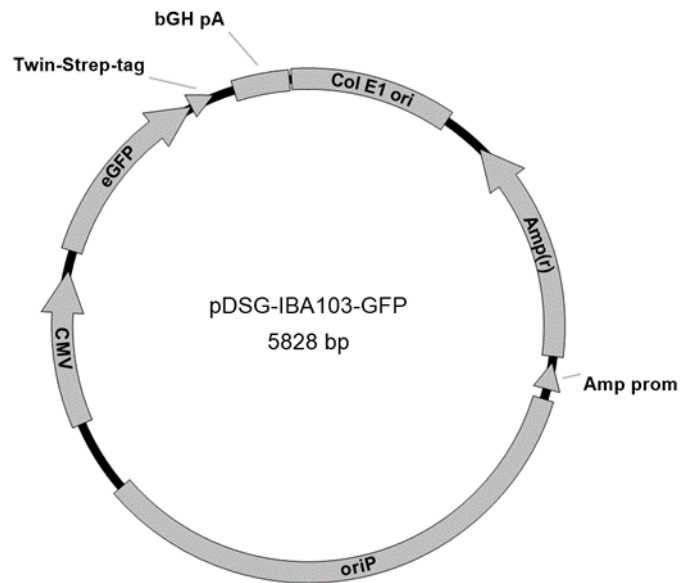
Biotinkonzentration Elution 1	1 mM
-------------------------------	------

Biotinkonzentration Elution 2	1 mM
-------------------------------	------

Biotinkonzentration Elution 3	1 mM
-------------------------------	------

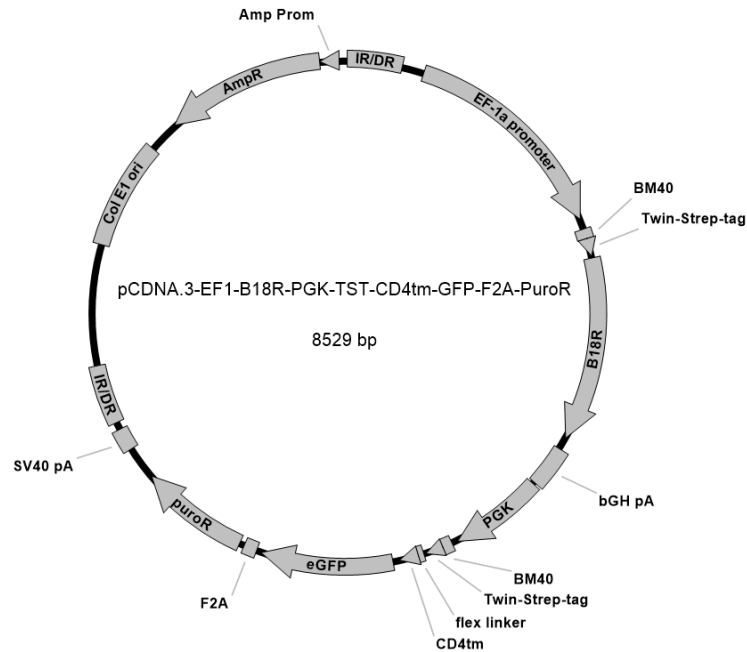
Biotinkonzentration Elution 4	1 mM
-------------------------------	------

### 7.3 Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

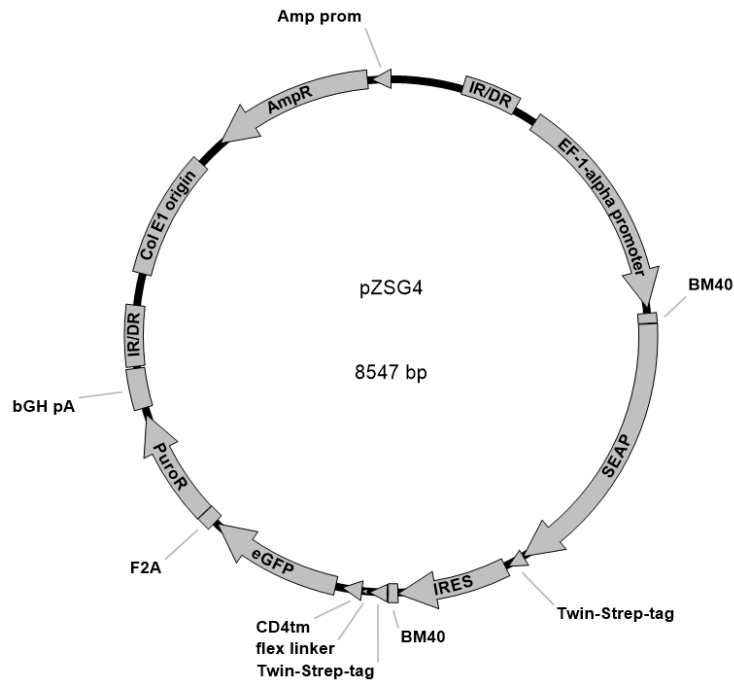


**Abbildung 71:** Elemente des Plasmids pDSG-IBA103-GFP: *Cytomegalo-Virus*-Promotor (CMV), *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), Twin-Strep-tag®, *bovine growth hormon* Poly(A)-Signal (bGH pA), *E. coli* Replikationsursprung (Col E1 ori), Ampicillin-Resistenz-Gen (Amp<sup>r</sup>), Ampicillin-Resistenz-Gen-Promotor (Amp prom)

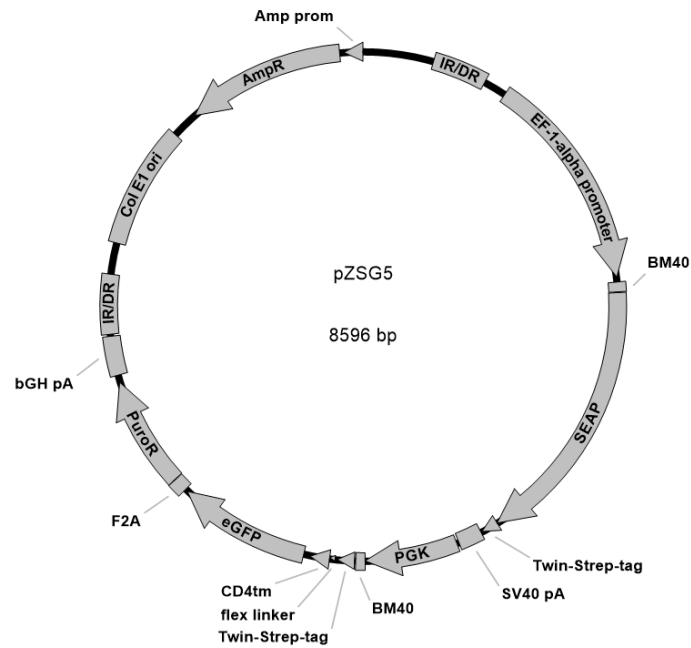




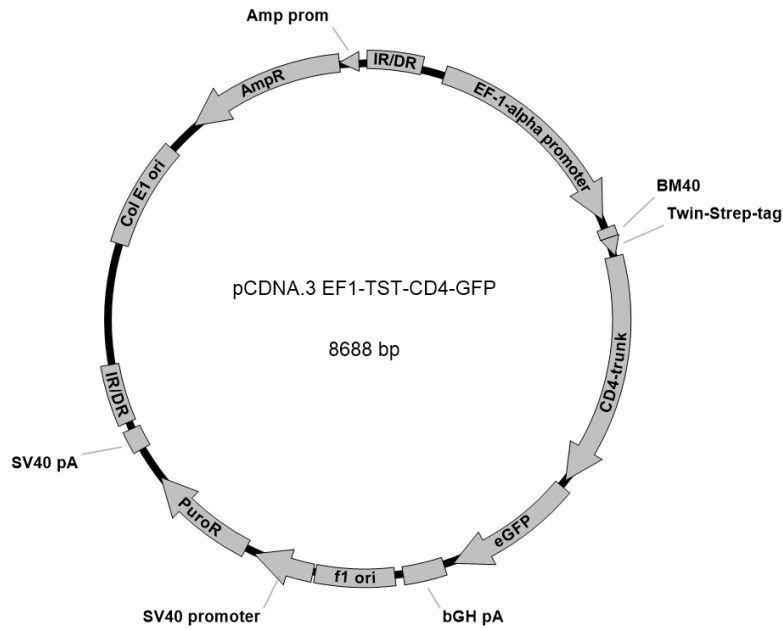
**Abbildung 72:** Elemente des Plasmids pCDNA.3-EF1-B18R-PGK-TST-CD4tm-GFP-F2A-PuroR: *human elongation factor 1*  $\alpha$ -Promotor (EF-1a promoter), BM40-Signalsequenz (BM40), Twin-Strep-tag<sup>®</sup>, B18R-Protein (B18R), *bovine growth hormone* Poly(A)-Signal (bGH pA), Phosphoglyceratkinase-Promotor (PGK), Sequenz für einen flexiblen linker (flex linker), CD4-Transmembrandomäne (CD4tm), *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), selbstspaltendes Peptid des Maul- und Klauenseuche-Virus (*Foot-and-mouth self cleaving peptide*, F2A), Puromycin N-Acetyltransferase zur Vermittlung einer Puromycinresistenz (PuroR), *Simian-Virus 40* Poly(A)-Signal (SV40 pA), terminale und direkte invertierte Wiederholungen der *Sleeping Beauty*-Transposase (IR/DR), *E. coli* Replikationsursprung (Col E1 ori), Ampicillin-Resistenz-Gen (AmpR), Ampicillin-Resistenz-Gen-Promotor (Amp prom)



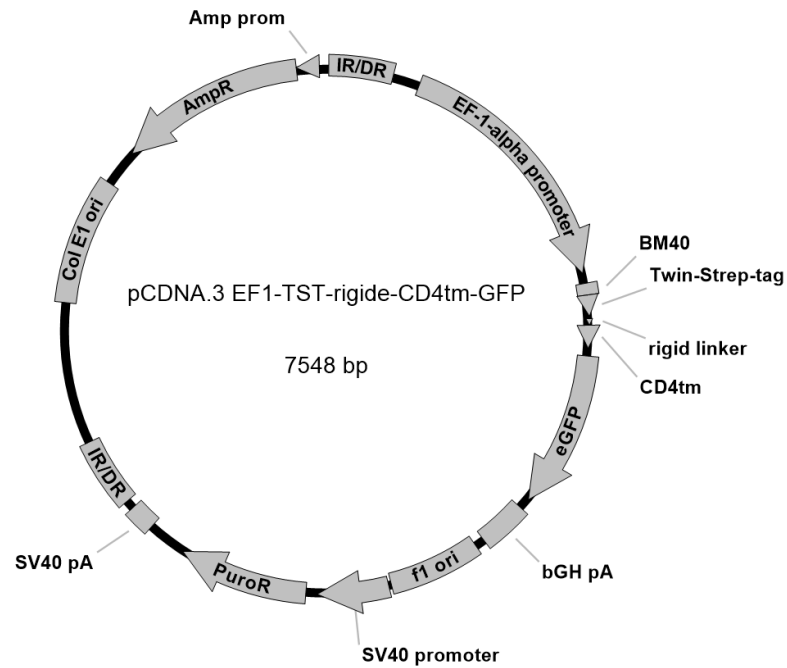
**Abbildung 73:** Elemente des Plasmids pZSG4: *human elongation factor 1*  $\alpha$ -Promotor (EF-1-alpha promoter), BM40-Signalsequenz (BM40), sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP), Twin-Strep-tag<sup>®</sup>, interne ribosomale Eintrittsstelle des *Encephalomyocarditis*-Virus (IRES), Sequenz für einen flexiblen linker (flex linker), CD4-Transmembrandomäne (CD4tm), *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), selbstspaltendes Peptid des Maul- und Klauenseuche-Virus (*Foot-and-mouth self cleaving peptide*, F2A), Puromycin N-Acetyltransferase zur Vermittlung einer Puromycinresistenz (PuroR), *bovine growth hormone* Poly(A)-Signal (bGH pA), terminale und direkte invertierte Wiederholungen der *Sleeping Beauty*-Transposase (IR/DR), *E. coli* Replikationsursprung (Col E1 ori), Ampicillin-Resistenz-Gen (AmpR), Ampicillin-Resistenz-Gen-Promotor (Amp prom)



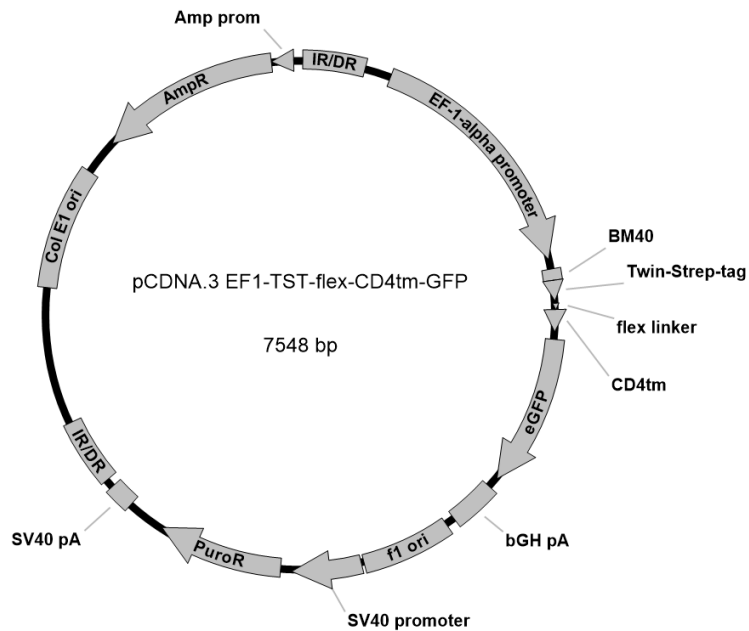
**Abbildung 74:** Elemente des Plasmids pZSG5: *human elongation factor 1*  $\alpha$ -Promotor (EF-alpha promoter), BM40-Signalsequenz (BM40), sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP), Twin-Strep-tag<sup>®</sup>, *Simian-Virus 40* Poly(A)-Signal (SV40 pA), Phosphoglyceratkinase-Promotor (PGK), Sequenz für einen flexiblen linker (flex linker), CD4-Transmembrandomäne (CD4tm), *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), selbstspaltendes Peptid des Maul- und Klauenseuche-Virus (*Foot-and-mouth self cleaving peptide*, F2A), Puromycin N-Acetyltransferase zur Vermittlung einer Puromycinresistenz (PuroR), *bovine growth hormone* Poly(A)-Signal (bGH pA), terminale und direkte invertierte Wiederholungen der *Sleeping Beauty*-Transposase (IR/DR), *E. coli* Replikationsursprung (Col E1 ori), Ampicillin-Resistenz-Gen (AmpR), Ampicillin-Resistenz-Gen-Promotor (Amp prom)



**Abbildung 75:** Elemente des Plasmids pCDNA.3 EF1-TST-CD4-GFP: *human elongation factor 1 α*-Promotor (EF-1-alpha promoter), BM40-Signalsequenz (BM40), Twin-Strep-tag®, CD4-Transmembran- und extrazelluläre Domäne (CD4-trunk), *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), *bovine growth hormon* Poly(A)-Signal (bGH pA), f1 Replikationsursprung (f1 ori), *Simian-Virus 40*-Promotor (SV40 promoter), Puromycin N-Acetyltransferase zur Vermittlung einer Puromycinresistenz (PuroR), *Simian-Virus 40* Poly(A)-Signal (SV40 pA), terminale und direkte invertierte Wiederholungen der *Sleeping Beauty*-Transposase (IR/DR), *E. coli* Replikationsursprung (Col E1 ori), Ampicillin-Resistenz-Gen (AmpR), Ampicillin-Resistenz-Gen-Promotor (Amp prom)



**Abbildung 76:** Elemente des Plasmids pCDNA.3 EF1-TST-rigide-CD4tm-GFP: *human elongation factor 1*  $\alpha$ -Promotor (EF-1-alpha promotor), BM40-Signalsequenz (BM40), Twin-Strep-tag®, Sequenz für einen rigiden linker (rigid linker), CD4-Transmembrandomäne (CD4tm), *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), *bovine growth hormone* Poly(A)-Signal (bGH pA), f1 Replikationsursprung (f1 ori), *Simian-Virus 40*-Promotor (SV40 promotor), Puromycin N-Acetyltransferase zur Vermittlung einer Puromycinresistenz (PuroR), *Simian-Virus 40* Poly(A)-Signal (SV40 pA), terminale und direkte invertierte Wiederholungen der *Sleeping Beauty*-Transposase (IR/DR), *E. coli* Replikationsursprung (Col E1 ori), Ampicillin-Resistenz-Gen (AmpR), Ampicillin-Resistenz-Gen-Promotor (Amp prom)



**Abbildung 77:** Elemente des Plasmids pCDNA.3 EF1-TST-flex-CD4tm-GFP: *human elongation factor 1*  $\alpha$ -Promotor (EF-1-alpha promoter), BM40-Signalsequenz (BM40), Twin-Strep-tag®, Sequenz für einen flexiblen linker (flex linker), CD4-Transmembrandomäne (CD4tm), *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), *bovine growth hormon* Poly(A)-Signal (bGH pA), f1 Replikationsursprung (f1 ori), *Simian-Virus 40*-Promotor (SV40 promoter), Puromycin N-Acetyltransferase zur Vermittlung einer Puromycinresistenz (PuroR), *Simian-Virus 40* Poly(A)-Signal (SV40 pA), terminale und direkte invertierte Wiederholungen der *Sleeping Beauty*-Transposase (IR/DR), *E. coli* Replikationsursprung (Col E1 ori), Ampicillin-Resistenz-Gen (AmpR), Ampicillin-Resistenz-Gen-Promotor (Amp prom)

#### 7.4 Übersicht der DNA- und Aminosäuresequenzen der Plasmidelemente

**Tabelle 16:** Angabe der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Plasmidelemente. Die Angaben wurden aus der aus dieser Arbeit hervorgegangenen Patentanmeldung kopiert.<sup>151</sup>

Sequenz Nr.	Sequenz	Beschreibung
1	GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG CCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGT GGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGT TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTG ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTC	Nukleotidsequenz des <i>Cytome- galo-Virus</i> -Promotors (CMV) des Plasmids pDSG-IBA103- GFP

2	<p>GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGG  GAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGT  GATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGC  AGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC  CGTGTGTGGTTCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAAT  TACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTG  GGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTG  GCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGTGC GAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC  TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG  GCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTT  GGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGC  CTGCGAGCGGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTG  GTGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCG  GCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA  TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGC  CTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCA  CCTCGATTAGTTCTCGATCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGG  TTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTG  GCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCT  CAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA</p>	Nukleotidsequenz des EF1 $\alpha$ -Promotors
---	--	---



3	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGGCGAGGGACGCGGCTGCTC TGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATTCTTCACGTC CGTTCGCAGCGTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCGGCGACGCTTCCT GCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGTTCCCTTGGCGTTTCGCGGCGTGCCGGACGTGACAAACG GAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGCG CGCCGACCGGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGC GGCCGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCCCT GCCCCGCGGGTGTTCGCATTCTGCAAGCCCCCGGAGCGCACGTCGGCAGTCGGCTCCCT CGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG	Nukleotidsequenz des Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGK) aus pCDNA.3-EF1-B18R-PGK-TST-CD4tm-GFP-F2A-PuroR
4	CTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCC GCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGG TAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTTCGCGCCACCTTCTACCCCTCCCCTA GTCAGGAAGTTCCCCCGCCCCGAGCTCGCGTCATGCAGGACGTGACAAATGGAAGTA GCACaTCTCACTAGTCTCGTGCAAATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGC CCTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGA AGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAG GTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCCGCACGCTTCAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTC TTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTTCG	Nukleotidsequenz des Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGK) aus pZSG5

5	<p>CGGGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCG  GTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGC  CCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAA  AGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAA  GACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGT  GCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGT  GCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTC  AACAAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCC  TCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCGAAC  CACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACC</p>	Nukleotidsequenz der IRES in pZSG4
6	KQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	Aminosäuresequenz des F2A-Peptids
7	MRAWIFFLLCLAGRALA	Aminosäuresequenz des BM40-Signalpeptids
8	<p>AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTAC  AAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT  CTTA</p>	Nukleotidsequenz der SV40 poly(A)-Signalsequenz

9	GTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCA CTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC ATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT AGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG	Nukleotidsequenz der bGH poly(A)-Signalsequenz
10	ASAWSHQPFEKGGGSGGGSSAWSHQPFEK	Aminosäuresequenz des Twin-Strep-tag®
11	SGTSGGGGSGGGGS	Aminosäuresequenz des flexiblen Linkers zwischen Twin-Strep-tag® und CD4tm
12	SGTSEAAAKEAAAK	Aminosäuresequenz des rigiden Linkers zwischen Twin-Strep-tag® und CD4tm
13	PVQPMALIVLGGVAGLLFIGLGIFFCVRCRHHRR	Aminosäuresequenz der CD4-Tansmembrandomäne (CD4tm)

14	<p>MNRGVPPFRHLLLVLQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIFHWKNSNQI  KILGNQGSFLTkgpsklNDRADSRRLWDQGNFPLIIKLNKIEDSDTYICEVEDQKEEVQL  LVFGLTANSdthllqgqslTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLsvsQLELQDSGT  WTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLAfQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQ  AERASSKSWITFDLKNKEVSVKRVTQDPKLQMGKKLPLHLTLpQALPQYAGSGNLTAL  EAKTGKlHQEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVW  VLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLSNIKVLPTWSTPVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCV  RCRHRRR</p>	<p>Aminosäuresequenz der  CD4-Transmembrandomäne  und der extrazellulären  Domäne</p>
15	<p>MTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGL  DIGKVWVADDGAAVAVWTTPEsVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHR  PKEPAWFLATVGVSPDHQgKGLGSavVLPgVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFT  VTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA</p>	<p>Aminosäuresequenz der Puro-  mycin N-Acetyltransferase</p>
16	<p>SGTRHSYAIDIENEITEFFNKMRDTLPakDSKWLNPACMFGGTMNDIAALGEPFSAKCPP  IEDSLLSHRYKDYVVKWERLEKNRRRQVSNKRVKHGDLWIANyTSKFSNRRYLCTVTTK  NGDCVQGIVRSHIRKPPSCIPKTYELGTHDKYGIDLYCGILYAKHYNNITWYKDNKEINID  DIKYSQTGKELIIHNPELEDsGRYDCYVHYDDVRIKNDIVSRCKILTVIPSQDHRFKLILDP  KINVTIGEPANITCTAVSTSLlDDVLIewENPSGWLIGFDfDVYSVLTSRGGITEATLYFE  NVTEEYIGNTYKCRGHNYFFEKLTlTTTVVLE</p>	<p>Aminosäuresequenz des  B18R-Proteins</p>

17	MVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPT LVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDT LVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGVSQLA DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELY	Aminosäuresequenz eGFP
18	MIIPVEEENPDFWNREAAEALGAAKKLQPAQTAACKNLIIFLGDGMGVSTVTAARILKGQK KDKLGPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAAARFN QCNTTRGNEVISVMNRRAKAGKSVGVTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSADVPAS ARQEGCQDIATQLISNMDIDVILGGGRKYMFPMPGTPDPEYPDDYSQGGTRLDGKNLVQE WLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLFEPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTE AALRLLSRNPRGFFLFVEGGRIDHGHESRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLV TADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNGPGYVLKDGARPDVTESESG SPEYRQQS AVPLDEETHAGEDVAVFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTAC DLAPPAGTTDAAHPGG	Aminosäuresequenz der SEAP
19	MRAWIFFLLCLAGRALAAMASAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWHPQFEKSGMNRGVP FRHLLLVLQLALLPAATQGKKVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIFHWKNSNQIKILGNQG SFLTGKPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIKNLKI ESDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTA NSDTHLLQGQSLTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTL SVSQLELQDSGTWTCTVLQ NQKKVEFKIDIVVLA FQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSK SWITFDLKNKEVSVKRVTDPKLQMGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLT LALEAKTGKL HQEVNLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLM LSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAG	Aminosäuresequenz der Ex- pressionskassette des Plas- mids pCDNA.3 EF1-TST-CD4-GFP

	MWQCLSDSGQVLLESNIKVLPTWSTPVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRHRRR GGGGSKDPPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFIC TTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYK TRAEVKFEGDTLVNRIELKGIKDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIR HNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAA GITLGMDELYK	
20	MRAWIFFLLCLAGRALAAMASAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEKSGTSGGGGS GGGGSPVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRHRRRGGGGSKDPPVATMVSKGEELF TGVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGV QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPI GDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAAGITLGMDELYK	Aminosäuresequenz der Ex- pressionskassette des Plasmids pCDNA.3 EF1-TST- flex-CD4tm-GFP
21	MRAWIFFLLCLAGRALAAMASAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEKSGTSEAAAK EAAAKPVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRHRRRGGGGSKDPPVATMVSKGEELF TGVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGV QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPI GDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAAGITLGMDELYK	Aminosäuresequenz der Ex- pressionskassette des Plasmids pCDNA.3 EF1-TST- rigide-CD4tm-GFP

22	MRAWIFFLLCLAGRALAAMASAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEKSGTSGGGGS GGGGSPVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRRCRHRRRGGGGSKDPPVATMVSKGEELF TGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYG QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGQVQLADHYQQNTPI GDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYKYSGRDSRVD GSGKQTLNFDLLKLAGDVESNPGPACKLQKLTMTTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAA FADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVVADDGAAVAVWTTPESEAG AVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVV LPGVEAAERAGVPAFLETSAAPRNLPFYERLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA	Aminosäuresequenz des Markerproteins des Plasmids pCDNA.3-EF1-B18R-PGK-TST- CD4tm-GFP-F2A-PuroR
23	MRAWIFFLLCLAGRALAAMASAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEKSGTSGGGGS GGGGSPVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRRCRHRRRGGGGSKDPPVAHMVSKGEELF TGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYG QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGQVQLADHYQQNTPI GDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYKASGRDGSGV KQTLNFDLLKLAGDVESNPGPSMGTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHT VDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVVADDGAAVAVWTTPESEAGAVFAEIGPRM AELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERA GVPAFLETSAAPRNLPFYERLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA	Aminosäuresequenz der Markerepressionskassette von pZSG4 und pZSG5

## 7.5 Übersicht der Einstellung der verschiedenen statistischen Versuchspläne

**Tabelle 17:** Übersicht der Einstellung der verschiedenen statistischen Versuchspläne

<b>Einstellung</b>	<b>Kapitel 5.1.1</b>	<b>Kapitel 5.1.2</b>	<b>Kapitel 5.1.3</b>	<b>Kapitel 5.5.1</b>	<b>Kapitel 5.5.2</b> <b>2-7mM Biotin</b>	<b>Kapitel 5.5.2</b> <b>0,1-0,8 mM</b> <b>Biotin und</b> <b>Kapitel 5.5.3</b>
type	CCD	Full facto- rial.center	CCD	full factorial	full facto- rial.center	full facto- rial.center
runs	17	9	12	4	11	6
factors	3	3	2	2	3	2
levels	2 2 2	2 2 2	2 2	2 2	2 2 2	2 2
replications	1	1	1	1	1	1
repeat.only	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE	FALSE
randomize	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE	TRUE
seed	25800	25353	24314	592	31284	27607, 10149
ncenterVar	2	1	2		3	2
alphaVar	rotatable		rotatable			
seedVar	8135		8193			



<b>Einstellung</b>	<b>Kapitel 5.1.1</b>	<b>Kapitel 5.1.2</b>	<b>Kapitel 5.1.3</b>	<b>Kapitel 5.5.1</b>	<b>Kapitel 5.5.2 2-7mM Biotin</b>	<b>Kapitel 5.5.2 0,1-0,8 mM Biotin und Kapitel 5.5.3</b>
etyperbVariable	"none"		all			
ncube	8	8	4		8	4
ncenter	1 2	1	2 2		3	2
cube.gen	full factorial		full factorial			
nstar	6		4			
nrunVar		8		8	8	8
nfacVar		3		2	3	2
nrepVar		1		1	1	1
nblockVar		1		1	1	1
specialrbVariable		none		none	none	none
hardVar		0		0	0	0
designrbVariable		default		default	default	default
genVar		NULL		NULL	NULL	NULL
catlgVar		catlg		catlg	catlg	catlg
resVar		V+		V+	V+	V+

<b>Einstellung</b>	<b>Kapitel 5.1.1</b>	<b>Kapitel 5.1.2</b>	<b>Kapitel 5.1.3</b>	<b>Kapitel 5.5.1</b>	<b>Kapitel 5.5.2 2-7mM Biotin</b>	<b>Kapitel 5.5.2 0,1-0,8 mM Biotin und Kapitel 5.5.3</b>
qualcritrbVariable		MA		MA	MA	MA
comprclassVar		3: all interac- tions of group 1		3: all interac- tions of group 1	3: all interac- tions of group 1	3: all interac- tions of group 1
estrbVariable		none		none	none	none
comprrbVariable		manual		manual	manual	manual
attr(,"class")		menu.de- sign2FrF" "list"		menu.de- sign2FrF" "list"	menu.de- sign2FrF" "list"	menu.de- sign2FrF" "list"

## 8. Danksagung

Zunächst gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Thomas Scheper für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und dafür, dass er mir die Promotion an seinem Institut ermöglicht hat.

Bei Prof. Dr. Sascha Beutel möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken sowie für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.

Dr. Ulrich Krings danke ich vielmals für die Übernahme des weiteren Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Mike Rothe, Dr. Joachim Bertram und Dr. Herbert Stadler dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, im Rahmen meiner Arbeit bei der IBA diese Promotion durchzuführen und mich bei diesem Vorhaben stets unterstützt haben.

Vor allem Dr. Joachim Bertram danke ich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit in der IBA und die große Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus danke ich ihm für die jahrelange Förderung und sein stets offenes Ohr.

Ein großer Dank gilt meinem ehemaligen Vorgesetzten und Mentor Dr. Uwe Carl. Zunächst danke ich ihm für seine großartige Unterstützung bei der Planung der Klonierungen der verwendeten Plasmide. Vor allem möchte ich ihm aber für seine jahrelange Unterstützung, Förderung und sein Vertrauen in mich danken. Die vielen Jahre der Zusammenarbeit gehören zu den schönsten meines bisherigen beruflichen Weges.

Außerdem möchte ich Dr. Thomas Schmidt dafür danken, dass ich ihn zu der Konferenz begleiten durfte, auf der ich die Idee zu dieser Arbeit entwickelt habe. Ohne seine frühe Befürwortung dieser Idee wäre sie vielleicht nie Wirklichkeit geworden. Darüber hinaus danke ich ihm dafür, dass er mich immer gefördert und mir viele

Möglichkeiten eröffnet hat. Es war inspirierend, mit einem so herausragenden Wissenschaftler arbeiten zu können.

Das Weiteren möchte ich Dr. Manfred Gossen und Jörg Contzen für die hervorragende Zusammenarbeit in dem gemeinsamen KMU-Projekt danken, innerhalb dessen ich einige Experimente dieser Arbeit durchgeführt habe. Vor allem danke ich beiden für die Bereitstellung einiger in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sowie die zahlreichen bereichernden Diskussionen der Projektergebnisse.

Lilia Batz danke ich für die molekularbiologischen und Klonierungsarbeiten für sämtliche in der IBA hergestellten Plasmide dieser Arbeit. Ihr Enthusiasmus für die Molekularbiologie ist beispielhaft.

Ebenfalls großer Dank gilt den IBA-Mitarbeiterinnen in der Zellkultur Dr. Franziska Hartung, Jennifer Koch, Stefanie Kramer, Marit Strotbeck und Antje Ulrich für die fürsorgliche Pflege der Zellkulturen und der Aufreinigung der Proteine.

Sandra König und Dr. Gerd Holzapfel danke ich für die Herstellung der Strep-Tactin<sup>®</sup>-Multimeragarose und der Nitrozellulosemembran sowie die vielen Jahre der guten Zusammenarbeit.

Die Anfertigung einer Promotionsarbeit ist ein zeitaufwendiges Unterfangen. Dieses mit meiner beruflichen Tätigkeit zu vereinbaren war nur möglich, weil ich bei der IBA in einem exzellenten Team arbeiten darf. Ohne das hohe Maß an Selbstständigkeit, Erfahrung und Professionalität, welches dieses Team jeden Tag leistet, wäre es schwer geworden, diese Arbeit fertigzustellen. Darum gilt ein großer Dank der Abteilung ProTAG I.

Der Drang die Welt zu erforschen, sie zu verstehen und neues zu lernen ist uns in die Wiege gelegt. Wie dieser Forschergeist erwacht, kann ich jeden Tag bei dem größten Wunder dieser Welt beobachten; meinem kleinen Sohn. Dieses Interesse zu fördern und zu wahren ist eine Aufgabe guter Eltern. Ich wäre wohl nie in der Lage gewesen, diese Arbeit anzufertigen, wenn ich nicht die besten Eltern hätte, die ich mir vorstellen kann. Ich danke ihnen von ganzem Herzen dafür, dass sie mir meine Fragen immer beantwortet haben und mich mein ganzes Leben unterstützen.

Zum Schluss möchte ich meiner Frau Regina danken. Ohne ihre Unterstützung und ihr Verständnis in der Zeit dieser Promotion hätte ich nicht die Zeit gefunden, diese Arbeit fertig zu stellen. Sie gefunden zu haben ist die größte Entdeckung meines Lebens und sie übersteigt den persönlichen Wert jeder wissenschaftlichen Entdeckung, die ich mir jemals in meinem Leben vorstellen könnte.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Dennis Karthaus  
Geburtsdatum und -ort: 19.11.1985 in Bielefeld

### Berufliche Laufbahn

---

01.06.2012 – heute **IBA GmbH (Göttingen)**, Anbieter für Produkte und Services im Bereich Biotechnologie und Lifesciences

01.05.2019 – heute **Director Protein Products and Assays**, Leitung der Produktion sowie der Forschung und Entwicklung für Produkte zur Expression, Reinigung und Analyse von rekombinanten Proteinen

01.11.2016 – 01.05.2019 **Leiter der Arbeitsgruppe „Eukaryontische Proteinproduktion“**, Projektkoordination für Forschungs- und Entwicklungsprojekte im Bereich Proteinproduktion, Proteinreinigung und Assayentwicklung, Verantwortung für kundenspezifische Auftragsproduktion von Proteinen

01.06.2012 – 01.11.2016 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, Entwicklung und Optimierung von eukaryontischen Protein-Produktionsprozessen und Produkten

### Akademische und schulische Laufbahn

---

06.11.2017-heute **Promotion** am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Naturwissenschaftliche Fakultät, Kooperation mit der IBA Lifesciences GmbH

- 25.08.2009–20.04.2012 Hochschule Bremerhaven  
Masterstudiengang „Biotechnologie“  
Abschluss M.Sc. (Note 1,1)  
Masterarbeit am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin im Bereich Pharmazeutische Biotechnologie, Arbeitsgruppe Aufarbeitungstechnik und Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik  
Thema: „Zelllinienentwicklung und Etablierung einer High-Throughput-Methode zur Optimierung einer plattformbasierten Antikörperaufreinigung“
- 08.10.2006–24.08.2009 Fachhochschule Bielefeld, Fachbereich Ingenieurwissenschaften und Mathematik  
Bachelorstudiengang „Apparative Biotechnologie“  
Abschluss B.Sc. (Note 1,7)  
Thema der Bachelorarbeit: „Planung, Inbetriebnahme und Durchführung einer kontinuierlichen Kultivierung von CHO-Zellen“
- 08.1996–17.06.2005 Hans-Ehrenberg-Gymnasium  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## 10. Publikationen

### 10.1 Journal Publikationen

Karthaus, D., Fractionation of cells based on a marker protein. *Europäisches Patentamt*, EP21190744 (2021)

Thomas G. M. Schmidt, Lilia Batz, Lidia Bonet, Uwe Carl, Gerd Holzapfel, Klaus Kiem, Kamila Matulewicz, Dennis Niermeier\*, Isabel Schuchardt, Kristian Stanar, Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expression and Purification* 92, 54–61 (2013)

\*Nach Heirat Dennis Karthaus

Thomas G. M. Schmidt, Andreas Eichinger, Markus Schneider, Lidia Bonet, Uwe Carl, Dennis Karthaus, Ina Theobald, Arne Skerra, The Role of Changing Loop Conformations in Streptavidin Versions Engineered for High-affinity Binding of the Strep-tag II Peptide. *J Mol Biol* 433, 166893 (2021)

### 10.2 Poster Präsentationen

Niermeier D., Batz L., Carl U., Schmidt T., Tietzel M.  
“Advantages of Strep-Tactin®XT – IBA’s 3rd generation Strep-tag® system now enables new protein purification and detection applications”  
PEGS Europe, 31.10.–04.11.2016, Lissabon

Niermeier D., Batz L., Carl U., Schmidt T., Tietzel M.  
“STREP-TACTIN®XT – THE SUPERIOR NEXT GENERATION SYSTEM FOR PROTEIN PURIFICATION & ASSAY DEVELOPMENT”  
PepTalk, 09.–13.01.2017, San Diego

Niermeier D., Carl U., Batz L., Schmidt T., Tietzel M.  
“THE STREP-TAG® TECHNOLOGY - One affinity tag for all protein applications”  
PEGS Europe, 13.–17.11.2017, Lissabon

Karthaus D., Carl U., Batz L., Kramer S., Möller F., König S., Schmidt T.  
“Overcoming limitations of conventional tag systems – Strep-Tactin®XT applications”  
PEGS Europe, 18.–22.11.2018, Lissabon



Karthaus D., König S., Strotbek M., Ulrich A., Rattenholl A., Stute K., Jahnmatz P.  
“Outstanding performance from purification to immobilization – Strep-tag® system”  
PepTalk, 20–24.01.2020, San Diego

Karthaus D., Hartung F., Koch J., König S., Strotbek M., Ulrich A., Rattenholl A., Stute K., Jahnmatz P.  
“The Strep-tag® technology – Outstanding performance from purification to analytic applications”  
PEGS Boston, 04. –05.08.2020, virtuelle Konferenz