

Untersuchungen zur Beeinflussung der Scherempfindlichkeit
von CHO-Zellen durch Lipide und Cyclodextrine
in proteinfreiem Medium

Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Petra Dinhof
geboren am 11.12.1972 in Hannover

2001

Referentin: Frau PD Dr. Gerlinde Kretzmer

Korreferent: Herr Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 26.04.2001

Abstract, deutsch

Scherstress, CHO-Zellen, Lipaide

Dinhof, Petra

Untersuchungen zur Beeinflussung der Scherempfindlichkeiten von CHO-Zellen durch Lipaide und Cyclodextrine in proteinfreiem Medium

Die Beeinflussung der Scherempfindlichkeit von CHO-Tf70R wurde im Hinblick auf verschiedene Parameter untersucht. Es sollte durch eine Verstärkung der Zellmembran bzw. durch eine Erhöhung der Vitalität durch ausgewählte Additive im proteinfreien Kultivierungsmedium die Scherempfindlichkeit der Zellen gesenkt werden. Dabei wurden diese Additive zuerst im Hinblick auf ihre Toxizität getestet. Des Weiteren wurde eine Verminderung der Scherempfindlichkeit in Kombination miteinander, in Kombination mit einer geringeren Temperatur von 31 °C im Scherexperiment und in Kombination mit einer verminderten Temperatur von 31 °C während der Kultivierung durch die Additive untersucht. Außerdem wurde der Einfluss der Länge des Experimentes auf die Überlebensrate der Zellen in Kurz- und Langzeit-Experimenten näher analysiert.

Die Scherexperimente wurden aufgrund definierter Bedingungen in einem Rotationsviskosimeter durchgeführt. Vor und nach den Scherexperimenten wurden zellspezifische Untersuchungen sowie Analysen zur Metabolitbildung und zum Verbrauch von Nährstoffen durchgeführt. Ebenso wurden die Zustände der verschiedenen Kulturen während der Kultivierungsreihen dokumentiert und diskutiert.

Bei den Untersuchungen zeigten sich in den verschiedenen Kombinationen nur zwei Additive, Cholesterin und Cholsäure, als wirkungsvoll. Aufgrund des proteinfreien Mediums wurde in den durchgeführten Experimenten die Überlebensrate hauptsächlich von den zugefügten Additiven beeinflusst. Eine Einwirkung von ebenfalls scherreduzierenden Proteinen wurde damit ausgeschlossen.

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich eine Abhängigkeit der Überlebensrate der Zellkulturen von der Dauer des Experimentes. Der Einfluss der Temperatur war dagegen von geringerer Bedeutung, im Gegensatz zu vorliegenden Literaturwerten. Die Kombinationsexperimente mit zwei verschiedenen Additiven ergaben keine Erhöhung der Überlebensrate in Bezug auf beide Additive. Festgestellt wurde dagegen, dass das Additiv Cholsäure den anderen getesteten Additiven gegenüber in allen untersuchten Experimententypen höhere Überlebensraten aufweist.

Abstract, englisch

shear sensitivity, CHO-cells, lipoids

The part of lipoids and cyclodextrines in shear sensitivity and cultivation of CHO cells in protein free medium

Shear sensitivity of CHO-Tf70R cells is investigated under various conditions. Stronger cell membrane or higher cell viability, respectively, are achieved by adding selected additives to a protein free medium, and should minimise shear sensitivity. Therefore, investigations began with testing the toxicity of chosen additives. Studies were also performed minimisation of shear sensitivity in combination with additives, in combination with a reduced temperature of 31 °C in shear experiments, and in combination with a reduced temperature of 31 °C in cell cultivations. Influence of length of experiments on cell surviving rate was studied in short and long term experiments.

Shear experiments took place in a rotoviscometer because of defined conditions. Before and after the experiments, special cell specific investigations, such as analyses on metabolite production and nutrient consumption were done. Cultivation phases during cell cultivation were documented and discussed.

From all combinations, experiments showed only two effective additives, cholesterol and cholic acid. Because of the protein free medium, influence on cell survival rate was mainly effected by the used additives. Influence from shear reducing protein was therefore excluded.

Investigations also showed a dependence of cell survival rate on the duration of the experiments. In contrast to this, influence on temperature was low, in opposition to experiments found in literature. Combination experiments with two additives did not result in increased cell survival rate, as for both additives. It was discovered, that the additive cholic acid showed an increased cell survival rate, compared to all other tested additives in all other tested experiment types.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Aufgabenstellung	2
1.2 Theorie.....	3
1.2.1 Zellkultur und Wachstumsphase	3
1.2.2 Stoffwechsel.....	3
1.2.3. Scherstress tierischer Zellen.....	4
1.2.4 Rotationsviskosimeter	6
1.2.5 Zellmembran	6
1.2.6 Mediumzusätze.....	7
1.2.6.1 Cholesterin.....	7
1.2.6.2 Ergosterin	9
1.2.6.3 Gallensäuren: Cholsäure, Lithocholsäure, Deoxycholsäure	9
1.2.6.4 Retinol.....	10
1.2.6.5 Phosphatidylcholin.....	11
1.2.6.6 Testosteron	11
1.2.6.7 β -Cyclodextrin und Methyl-Cyclodextrin.....	12
1.2.6.8 Mediumzusätze zur Scherstressreduzierung in der Literatur	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Zelllinie und -kultivierung.....	13
2.2 Kultivierungsbedingungen der Experimente	13
Lösungsmittel.....	14
2.3 Scherstressversuche.....	14
2.4 Analytik	15
2.4.1 Zellzahl	15
2.4.2 Glukose und Laktat	15
2.4.3 Laktatdehydrogenase (LDH).....	16
2.4.4 Ammonium	16
2.4.5 Protein.....	16
2.4.6 Cholesterin	16
2.4.7 Aminosäuren	17
2.4.8 t-PA.....	17
2.4.9 Wachstumsrate	17
2.4.10 Spezifische Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten.....	17
2.4.11 Überlebensrate.....	18
2.5 Mediumzusätze	18
2.5.1 Cholesterin	18
2.5.2 Ergosterin.....	19
2.5.3 Gallensäuren: Cholsäure, Lithocholsäure, Deoxycholsäure	19
2.5.4 Retinol.....	19

2.5.5. Phosphatidylcholin	20
2.5.6 Testosteron	20
2.5.7 β -Cyclodextrin und Methyl-Cyclodextrin	20
3 Ergebnisse und Diskussion	21
3.1 Toxizitätstests	21
3.1.1 Ethanol	21
3.1.2 Gruppe I: Cholesterin und Ergosterin	23
3.1.3 Gruppe II: Cholsäure, Lithocholsäure, Deoxycholsäure	29
3.1.4 Gruppe III: Phosphatidylcholin, Testosteron, Retinol	35
3.1.5 Gruppe IV: β -Cyclodextrin, Methyl-Cyclodextrin	39
3.1.6 Fazit der Toxizitätstests	41
3.2 Scherstressversuche	42
3.2.1 Kurz- und Langzeit-Scherstressexperimente	42
3.2.1.1 Gruppe I: Cholesterin und Ergosterin	42
3.2.1.2 Gruppe II: Cholsäure, Lithocholsäure und Deoxycholsäure	67
3.2.1.3 Gruppe III: Phosphatidylcholin, Testosteron, Retinol	83
3.2.1.4 Gruppe IV: β -Cyclodextrin, Methyl-Cyclodextrin	117
3.2.1.5 Fazit der Kurzzeit- und Langzeit-Scherexperimente	128
3.2.2 Temperaturexperimente	137
3.2.2.1 Fazit der Temperatur-Scherexperimente	156
3.2.3 Kombinationsexperimente	159
3.2.3.1 Fazit der Kombinations-Scherexperimente	170
4 Zusammenfassung	172
4.1 Kurzzeit-Scherexperimente	172
4.2 Langzeit-Scherexperimente	174
4.3 Temperatur-Scherexperimente	175
4.4 Kombinations-Scherexperimente	176
4.5 Fazit	176
5 Ausblick	177
6 Anhang	179
A Aminosäuren	179
B Standardreihen	189
C Fotos gestresster und ungestresster Zellen	190
D Literatur	191
E Abkürzungen	196

1 Einleitung

Unter moderner Biotechnologie werden alle innovativen Methoden, Verfahren oder Produkte verstanden, die die wesentliche Nutzung von lebenden Organismen oder ihrer zellulären und subzellulären Bestandteile beinhalten und dabei von Erkenntnissen der Forschung auf den Gebieten Biochemie, [...], Zellbiologie oder Umwelt- und Verfahrenstechnik Gebrauch machen. [...] (DIB 1999)

Die Biotechnologie ist demnach ein vielfältiges und zukunftsorientiertes Gebiet. Sie beinhaltet unter anderem die Produktion pharmazeutisch relevanter Substanzen, die auf klassisch chemischem Wege nur unter großem Aufwand produziert bzw. aus biologischem Material isoliert werden können, genauso wie die technische Optimierung des Herstellungsprozesses.

Die Tierzellkulturtechnik nimmt heute eine bedeutende Stellung in der Biotechnologie ein. Besonders die Säugerzellen haben gegenüber Kultivierungen von Bakterien und Hefe den Vorteil, dass sie posttranslatorische Veränderungen wie Glykosilierungen und Acetylierungen an den produzierten Proteinen vornehmen können. Gerade diese Modifikationen der rekombinanten Proteine machen aber die therapeutische Wirkung aus. So sind die aus Hefe- oder Bakterienkultivierungen gewonnenen Proteine meist unwirksam.

Ein Nachteil gegenüber Hefen und Bakterien ist bei den Säugerzellen die Zellmembran. Die Säugerzellen besitzen keine feste Zellwand, die den Hefen und Bakterien eine große Stabilität verleiht und sie Schereinwirkungen gegenüber unempfindlich werden lässt. So ist z.B. das Scale-Up von Säugerzellkulturen durch die Scherempfindlichkeit eingeschränkt, weil die Zellen bei den in großen Reaktoren notwendigen hohen Rührgeschwindigkeiten absterben. Diese Rührgeschwindigkeiten sind für die gleichmäßige Durchmischung des Kulturmediums und die laufende Suspendierung der Zellen erforderlich. Um sowohl eine große Menge an Zellen kultivieren zu können und damit eine hohe Produktausbeute zu erhalten, als auch die Belastung der Zellen so gering wie möglich zu halten, sind viele Stoffe auf ihre scherreduzierenden Eigenschaften untersucht worden. So wurden z.B. Polyethylenglycole (PEG) und Pluronic F68 sowie fötales Kälberserum oder Dextran, um nur die bekanntesten zu nennen, in Tierzellkultivierungen auf ihre scherreduzierende Wirkung untersucht (Michaels et al. 1991, Goldblum et al. 1990, Zhang et al. 1992, Papoutsakis 1991). Im industriellen Maßstab wird heute vor allem Pluronic F68 eingesetzt (Murhammer 1988). Eine scherreduzierende Wirkung wird auch durch die Zugabe von Proteinen erzielt (Chatopadhyay et al. 1991).

1.1 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es aufzuzeigen, inwieweit die mechanische Belastbarkeit von CHO-Zellen durch Scherkräfte mittels geeigneter Kultivierungszusätze erhöht werden kann. Die Zusätze sollen die Kultivierung weder in Zellzahl noch in Vitalität beeinträchtigen, noch darf die Produktion des Zielproteins „tissue Plasminogen-Activator“ (t-PA) reduziert werden. Die scherreduzierende Substanz sollte in der Natur vorkommen, damit sie in die Zellmembran eingelagert werden bzw. die Zellen in ihrem Stoffwechsel positiv beeinflussen kann.

Zuerst werden Toxizitätstests durchgeführt, damit toxische Konzentrationen der Substanzen während der Kultivierung ausgeschlossen werden. Die geeigneten Konzentrationsbereiche werden anhand der Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl, der Vitalität, der Glukose- und Laktatkonzentration und Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten wie auch der Wachstumsrate bestimmt. In diesen Tests liegt die Zellkultur nicht als Suspension vor, da keine Durchmischung der Kultivierungsgefäße erfolgt.

Im nächsten Schritt werden Kultivierungen mit den ermittelten günstigen Konzentrationen durchgeführt. Auch hier werden die Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl sowie die Vitalität, die Glukose- und Laktatkonzentration und Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate wie auch die Wachstumsrate bestimmt. Außerdem werden die Protein- und die Aminosäure-Konzentrationen ermittelt und die Konzentration von Ammonium und dem Zielprodukt t-PA bestimmt. Von den beiden letzteren wird die Produktionsrate berechnet. Aus den gewonnenen Daten kann auf eine Beeinflussung der Zellen in Suspensionskulturen geschlossen werden.

Zum Abschluss erfolgt die eigentliche Untersuchung der Substanzen auf eine scherreduzierende Wirkung. Es werden vor und nach den Scherstressversuchen die Lebend-, Tot- und Gesamtzellzahl sowie die Vitalität bestimmt und die Konzentrationen von Ammonium und Protein. Bei Langzeit-Experimenten werden zusätzlich Glukose- und Laktatkonzentrationen sowie Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate, t-PA-Konzentration und -Produktionsrate sowie die Produktionsrate des Ammoniums bestimmt. In den Scherstressexperimenten werden Kurz- und Langzeit-Experimente sowie Temperatur- und Kombinationsexperimente als Variation durchgeführt. Bei allen Versuchen erfolgen die oben genannten Analysen.

1.2 Theorie

1.2.1 Zellkultur und Wachstumsphase

Die Zellzahl, einer der wichtigsten Parameter einer Kultivierung, ändert sich in ihrem Verlauf. Gegen die Zeit aufgetragen ergibt sich eine Wachstumskurve, die sich bei Batch-Kultivierungen in vier Phasen einteilen lässt.

In der *Lag-Phase* bleibt die Zellzahl konstant oder nimmt geringfügig ab. Die Produktivität bleibt gering. Nach der Zelladaption an die Umgebung wird in der *Log-Phase*, auch exponentielle Phase genannt, die Mitoseaktivität maximal, die Zellzahl erhöht sich exponentiell. Anschließend nimmt das Zellwachstum durch Nährstofflimitierung und Metabolite ab. Die *stationäre Phase* wird erreicht, es herrscht Gleichgewicht zwischen Wachstum und Absterben. Nimmt das Absterben überhand, wird von der *Absterbephase* gesprochen. (Lindl/Bauer 1992)

1.2.2 Stoffwechsel

Der Stoffwechsel von Zellkulturen ist komplex. Für die anstehenden Untersuchungen werden zwei Bereiche herausgegriffen und ihre Bedeutung für den Organismus kurz erläutert. Für detaillierte Angaben wird auf die angegebene Literatur verwiesen.

Der Glukose- und Glutaminstoffwechsel versorgt die Zelle mit Energie. Dabei wird über die Glykolyse Glukose zu Pyruvat abgebaut. Abhängig vom weiteren Stoffwechselweg kann durch die Umwandlung zum Laktat eine Energieausbeute von 2 mol bzw. über den Zitratzyklus eine Ausbeute von 36 mol Adenosintriphosphat (ATP) pro mol Glukose erzielt werden (Karlson 1994). Glutamin wird oxidativ abgebaut und liefert 10-15 % der benötigten Energie der Zelle. Außerdem dient es als Stickstoffquelle (Griffiths/Pirt 1967).

Der Aminosäuremetabolismus ist eng mit dem Zitratzyklus verbunden. Die Aminosäuren werden zum Aufbau zelleigener Proteine verwendet, können aber bei Bedarf weiter abgebaut werden. Von den 20 proteinogenen Aminosäuren sind zwölf essentiell für die Tierzellkultur: Arginin (Arg), Cystein (Cys), Histidin (His), Tyrosin (Tyr), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Lysin (Lys), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Threonin (Thr), Tryptophan (Trp) und Valin (Val) (Eagle 1955). Beim Abbau der Aminosäuren werden diese aufgrund ihrer unterschiedlichen Abbauwege in zwei verschiedene Gruppen unterteilt: die glukogenen und die ketogenen. Die glukogenen Aminosäuren werden über Glutamat in 2-Oxoglutarat umgewandelt bzw. liefern C₄-Verbindungen, z.B. Succinat. Die ketogenen Aminosäuren erzeugen als Metabolite Acetyl-CoA bzw. Acetacetat.

Glutamin kann als glukogene Aminosäure zu Laktat umgesetzt werden. Jedoch entsteht beim Abbau von Glutamin zu α -Ketoglutarat Ammonium.

1.2.3. Scherstress tierischer Zellen

Die mechanische Belastung, der Suspensionszellen in Zellkulturflaschen ausgesetzt sind, wird als Scherstress bezeichnet. Zur Berechnung der Kraft, die auf die Zellen wirkt, werden folgende Gesetze zu Grunde gelegt:

$$\text{Newtonsches Widerstandsgesetz: } F = \eta \cdot A \cdot \frac{dv}{dx} \quad (1)$$

F = Scherkraft, η = dynamische Viskosität, A = Fläche, dv/dx = Geschwindigkeitsgradient

Das Newtonsche Widerstandsgesetz beschreibt die Kraft, die zwischen zwei parallel gegeneinander verschobenen Platten auf ein dazwischen befindliches Fluid wirkt.

Wird mit F/A die Schubspannung τ eingeführt, so gilt:

$$\tau = \frac{F}{A} = \eta_{\text{Fluid}} \cdot \frac{dv}{dx} \quad (2)$$

$$\text{Allgemein gilt für alle Fluide: } \frac{dv}{dx} = \frac{1}{\eta_{\text{Fluid}} \cdot \tau^n} \quad (3)$$

In der Scherrate D [s^{-1}] ist die zeitliche Fluiddeformation miteinbezogen. Sie ist folgendermaßen mit τ verknüpft:

$$\text{Newtonsches Viskositätsgesetz } \tau = \eta_{\text{Fluid}} \cdot D \quad \eta = \text{konstant} \quad (4)$$

Die Scherempfindlichkeit tierischer Zellen unterscheidet sich von der Scherempfindlichkeit von Bakterien und Hefen. Zum einen besitzen Tierzellen keine stabilisierende Zellwand, zum anderen sind sie mit 10 bis 20 μm Durchmesser auch um ein Vielfaches größer als Bakterien und Hefen. In turbulenter Strömung stellt sich diese Größe als Nachteil heraus. Nach Kolmogoroff wirkt sich die Partikelgröße dann negativ aus, wenn sie sich in der gleichen Größenordnung wie die erzeugten Wirbel befindet (Cherry/Papoutsakis 1988). In diesem Fall wird der Partikel bzw. die Tierzelle stark von Scherkräften beansprucht (Henzler/Biedermann 1996; Storhas 1994; McQueen et al. 1987; Cherry/Papoutsakis 1986).

Mit

$$\text{Re} = \frac{w_{\text{Kol}} \cdot d_{\text{Kol}}}{\nu_{\text{Fluid}}} = 1 \quad (5)$$

Re = Reynoldszahl, w_{kol} = Kolmogoroff-Rotationsgeschwindigkeit, ν_{Fluid} = kinematische Viskosität, d_{kol} = Kolmogoroff-Durchmesser

ist die Trägheitskraft der Wirbel genauso groß wie die Reibungskraft (Kolmogoroff 1988) und die Scherbelastung an der Grenze zur Partikelschädigung. Wird über

$$\epsilon = \frac{\nu_{\text{Fluid}}^3}{d_{\text{Kol}}^4} \quad (6)$$

ϵ = lokale massenspezifische Energiedissipation [$\text{W} \cdot \text{k}^{-1}$]

ein kritischer Durchmesser d_{krit} von Tierzellen (20 μm) mit dem von Bakterien (2 μm) verglichen, so folgt, dass bei gleichen Reaktionsbedingungen die Tierzellen einer 10 000fachen höheren Scherbelastung ausgesetzt sind. Zur Berechnung einer kritischen Schubspannung τ_{krit} wird das Tröpfchen-Modell einer Zweiphasenemulsion verwendet (Levich 1962):

$$\tau_{krit} \cdot r_z^2 = 2 \cdot r_z \cdot \sigma_z \quad (7)$$

r_z = Zellradius, σ_z = Oberflächenspannung der Zellmembran/Membranspannung

Zhang et al. konnten 1991 die Kraft messen mit der eine definierte Hybridomzelle zum Zerplatzen gebracht wurde. Anhand eines theoretischen Zellmodells berechneten sie daraus die Membranspannung, die unabhängig von der Zellgröße zwischen 0,5 und $3 \cdot 10^{-3}$ N/m liegt (Zhang et al. 1992). Für die Membranspannung werden außerdem Werte zwischen 0,1 und $2 \cdot 10^{-3}$ N/m ermittelt (Stein 1967). Erste Schäden treten nach Gleichung (7) für Membranspannungen zwischen 0,1 und $0,5 \cdot 10^{-3}$ N/m und einem Durchmesser von 10 bis 20 μm zufolge bei einer Schubspannung von 20 bis 200 N/m auf.

In der Literatur lassen sich aus Rührkesselfermentern ermittelte kritische Schubspannungen finden (Kunas/Papoutsakis 1990; Abu-Reesh/Kargi 1991; Oh et al. 1989). Die Werte sind aufgrund von Abschätzungen nicht exakt. Definierte Ergebnisse lassen sich durch Messungen in Viskosimetern oder Kapillaren erzielen.

Wie in Tabelle 1.1 ersichtlich, sind die Ergebnisse zellspezifisch und hängen von der Dauer des Scherexperiments ab.

Zelllinie	τ_{krit} [N/m ²]	t _{Experiment}	Literatur
Erythrozyten	250	4 min	Sutera/Mehrjadi 1975
	150 - 300	2 min	Nevaril et al. 1968
	300	1,5 min	Leverett et al. 1972
	100	> 2 h	-- " --
Insektenzellen	1	3,5 h	Tramper et al. 1986
		5 min	Goldblum et al. 1990
	0,6	5 min	-- " --
	0,1	5 min	-- " --
TN-368	0,2	0,5 min	-- " --
BHK21 c13, adhären	50-80	1 h	Kretzmer/Schügerl 1991
	0,8-1	24 h	Ludwig et al. 1992
Hybridomzellen	80	0,017 s	McQueen/Bailey 1989
Myelomzellen	180	0,02 s	McQueen et al. 1987

Tab. 1.1 τ_{krit} verschiedener Zelllinien bei unterschiedlicher Reaktionsdauer in Viskosimetern, Kapillaren oder Scherstresskammern

Eine weitere Abhängigkeit der Scherempfindlichkeit liegt laut Born et al. (1992) im jeweiligen Wachstumsstatus der Zellen begründet. So sind Hybridomazellen sowohl in der Lag-Phase als auch in der stationären Phase wesentlich scherempfindlicher als in der exponentiellen Phase.

1.2.4 Rotationsviskosimeter

Das Rotationsviskosimeter setzt die beschriebene Translationsbewegung der Platten in eine Rotationsbewegung um. Auf diese Weise ist es möglich, dass die auf die Zellen wirkenden Scherkräfte erfasst und berechnet werden können. Mit :

$$M = F \cdot r \quad (8)$$

M = Drehmoment, r = Spaltgröße im Viskosimeter

kann die Viskosität des verwendeten Fluids bestimmt werden. Das Drehmoment über dem Spalt ist konstant. Mit Gleichung (2) ergibt sich:

$$\tau = \frac{M}{A \cdot r} \quad (9)$$

A = Mantelfläche des Viskositätszylinders

und

$$\tau = \frac{M}{2 \cdot \pi \cdot h \cdot r^2} \quad (10)$$

h = Spalthöhe

Der Betrag von τ und D ist an jeder Stelle des Spaltes gleich. Die Viskosität geht als stoffspezifische Größe in τ ein, so dass τ im Gegensatz zu D vom verwendeten Fluid abhängig ist (vgl. Gleichung vier). Die Viskosität des verwendeten Mediums kann mit der des Wasser gleichgesetzt werden. So kann mit den Viskositätswerten des Wasser in Abhängigkeit der Temperatur gerechnet werden (Grigoriev/Meilikov 1997, Reich 1997).

$$\eta (31^\circ\text{C}) = 770 \cdot 10^{-6} \text{ kg/m} \cdot \text{s}$$

$$\eta (37^\circ\text{C}) = 690 \cdot 10^{-6} \text{ kg/m} \cdot \text{s}$$

1.2.5 Zellmembran

Die Zellmembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht. Sie ist 5-10 nm dick und bestimmt die Stabilität der Tierzellen. Die Membran ist flexibel, da sich alle Moleküle gegeneinander verschieben lassen (fluid-mosaic-Modell) (Karlson 1994). Die Stabilität und die Festigkeit ist zum einen durch die Temperatur bestimmt, zum anderen wird sie durch den Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und Cholesterin in der Membran bestimmt (Duve 1989).

Bei niedrigen Temperaturen nimmt die Festigkeit der Membran zu. Die sogenannte Erstarrungstemperatur ist abhängig vom Anteil der ungesättigten Fettsäuren. Je höher dieser Anteil ist, um so niedriger ist auch die Erstarrungstemperatur (Karlson 1994).

Der Anteil von Cholesterin erhöht die Membranfestigkeit aufgrund der starren Struktur des Moleküls. Das Cholesterin kann sich wie verschiedene Proteine im hydrophoben Bereich der Membran einlagern. Es behindert dadurch die Beweglichkeit der Fettsäuren und lässt das fluid-mosaic-Modell erstarren (Bretscher 1985; Stryer 1990). Cholesterin kann der Zelle in Form von Lipoproteinen über Rezeptoren zuge-

führt werden, oder es kann als homogener Zusatz im Medium von der Zelle aufgenommen werden (Shinitzky 1978; Oram 1986).

1.2.6 Mediumzusätze

Unter den verwendeten Mediumzusätzen oder Additiven werden die zur Scherreduzierung eingesetzten Substanzen verstanden. Die hier verwendeten Additive gehören im weiten Sinn alle zu der Gruppe der Lipide. Im engen Sinn können sie in die Klasse der Isoprenoide eingeordnet werden. Eine Ausnahme bildet das Phosphatidylcholin, welches den Glycerinphosphatiden zugeordnet wird.

1.2.6.1 Cholesterin

Cholesterin kommt im Körper von Säugetieren in allen Zellen vor. Dabei ist der größte Prozentsatz in Galle, Gehirn und der Nebennierenrinde zu finden. Durch das ausgedehnte Vorkommen übernimmt das Cholesterin verschiedene Funktionen im Organismus. So werden z. B. in der weiteren Synthese aus Cholesterin die gesamten körpereigenen Hormone produziert. Zum anderen werden aus Cholesterin die Gallensäuren hergestellt, die zur Emulgation von Fetten im Verdauungsprozess beitragen. Eine weitere

Funktion erfüllt Cholesterin, indem es die Fluidität der Zellmembran regelt. Dabei versteift es durch sein starres Gerüst die Lipiddoppelschicht und schränkt außerdem die Beweglichkeit der Fettsäuremoleküle in der Membran ein (Stryer 1990).

Cholesterin kann sowohl exogen als auch endogen bezogen werden. Dabei ist der Säugetierorganismus nicht auf die exogene Aufnahme angewiesen. Die endogene Synthese versorgt den Organismus ausreichend mit Cholesterin. Wird zuviel Cholesterin aufgenommen, wirkt es hemmend auf die endogene Synthese.

Im menschlichen Körper sind ca. 250 g Cholesterin enthalten. Der Tagesumsatz liegt zwischen 1 und 2 g von denen ca. drei Viertel durch endogene Produktion gedeckt werden (Hilker 1995).

Cholesterin ist nicht wasserlöslich. Im Säugetierorganismus wird es entweder in Form von Micellen transportiert oder aber Chylomikronen bzw. Lipoproteine tragen zur Löslichkeit bei (Oncley 1956; Gofman 1954; Frederickson 1974).

Da sich Cholesterin in früheren Untersuchungen an anderen Zelllinien als scherreduzierend in proteinhaltigen Medien erwiesen hat, wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung an einer anderen Zelllinie in proteinfreiem Medium überprüft.

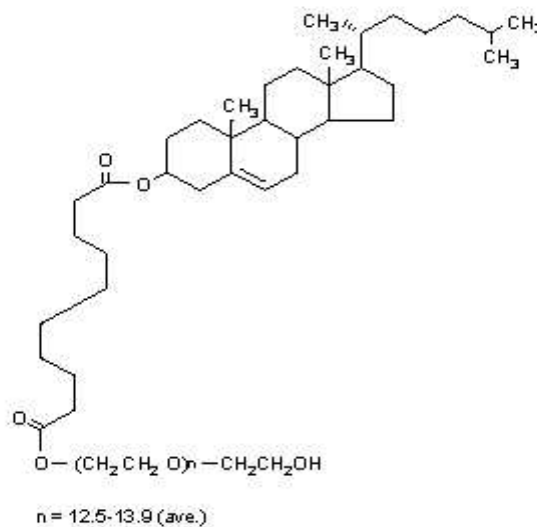


Abb. 1.1 Strukturformel von wasserlöslichem Cholesterin

1.2.6.2 Ergosterin

Ergosterin (Provitamin D₂) ist das Cholesterin-Analogon in Pilzen. Es ist ein C₂₈-Mycosterin und in höheren Pilzen, Mutterkorn, in Hühnerei als Begleiter des Cholesterins sowie in Hefe zu finden und vor allem in letzterem gut untersucht. (Seher/Homberg 1971; Weete/Laseter 1974;

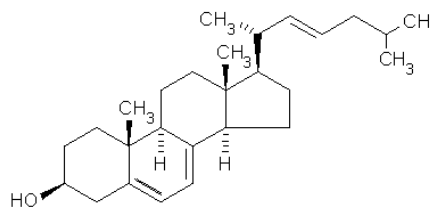


Abb. 1.2 Strukturformel von Ergosterin

Seitz et al. 1977; Schubert et al. 1968; Newton 1989; Loeffler/Hayes 1990; Debieu et al. 1992; Müller/Voigt 1984; Tothill et al. 1992, Schwadorf/Müller 1989; Müller et al. 1991). Durch UV-Bestrahlung geht es über Präcalciferol in Ergocalciferol (Vitamin D₂) über (Windaus et al. 1932).

Ergosterin wird in vielen Hefen produziert. Der Anteil beträgt im Durchschnitt 0,1 % des Trockengewichts. In einigen *Saccharomyces* ist es mit 7 bis 10 % der vorherrschende Membranbestandteil. Ergosterin erfüllt in *Saccharomyces cerevisiae* in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen verschiedene Aufgaben. So kann es in der geringen Menge von 100 ng/ml eine wachstumsauslösende Funktion übernehmen. Bei höheren Konzentrationen von 0,5 bis 1 µg/ml bestimmt es die Wachstumsrate und das Vorkommen von freien Sterolen in den Zellen pro Milligramm Trockengewicht (Rodriguez et al. 1985). Auch werden dem Ergosterin zytosolische Aufgaben zugeschrieben (Vendt 1956, Deborin/Ahibanova 1954, Parks 1978, Parks/Casey 1995). Als Cholesterin-Analoges in Hefezellen sollte Ergosterin ebenfalls eine scherreduzierende Funktion in Zellen übernehmen können, indem es wie Cholesterin die Zellmembran verstärkt.

1.2.6.3 Gallensäuren: Cholsäure, Lithocholsäure, Deoxycholsäure

In der Leber wird Cholesterin zu 80 % in Gallensäuren umgewandelt. Die Gallensäuren enthalten in der Seitenkette eine Carboxylverbindung und liegen fast immer als cis-Verbindung der Ringe A und B vor. Als konjugierte Verbindungen besitzen sie einen niedrigen pK-Wert und sind in der Lage als anionische Detergentien im physiologischen pH-Bereich zu wirken. Sie zählen zu den amphipathischen Lipiden und bilden zylindrisch geformte Micellen. Auf diese Weise können im Verdauungstrakt Fettstoffe emulgiert und so in den körpereigenen Stoffwechsel aufgenommen werden.

Gallensäuren werden in primäre und sekundäre Säuren eingeteilt. Die primären Säuren werden direkt in der Leber aus Cholesterin gebildet. Zu ihnen gehören bei Säugetieren die Cholsäure und die Chenodeoxycholsäure. Die sekundären

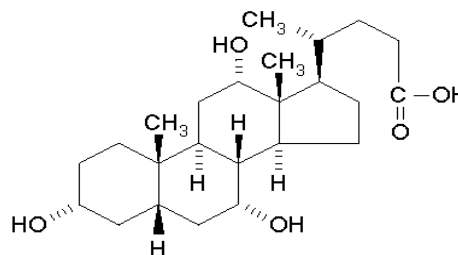


Abb. 1.3 Strukturformel von Cholsäure

Gallensäuren werden erst im Darm durch Bakterien aus den primären Konjugaten erzeugt. Deoxycholsäure und Lithocholsäure zählen zu den sekundären Gallensäuren. Durch die Resorption der Gallensäuren in der Pfortader gelangen sowohl primäre als auch sekundäre Säuren über die Leber in die Galle, so dass dort auch ein kleiner Anteil an sekundären Gallensäuren vorhanden ist (enterohepatischer Kreislauf).

In der menschlichen Galle finden sich Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure und Lithocholsäure im Verhältnis 2,6 : 2,6 : 1 : Spur als Taurin- und Glycin-Konjugate (Thiele 1979, Nuhn 1990).

Da Gallensäuren Fettstoffe emulgieren und so zur besseren Aufnahme dieser beitragen, wird eine Beeinflussung der Lipidzusammensetzung der Zellmembranen vermutet. Auf diesem Weg könnte die Scherempfindlichkeit von Tierzellen verändert werden. Zum anderen könnte aufgrund der dem Cholesterin ähnlichen Struktur eine direkte Einlagerung in die Membran oder eine Umwandlung zu Cholesterin stattfinden.

1.2.6.4 Retinol

Retinol wird auch als Vitamin A₁ bezeichnet. Es ist ein Diterpen und zählt zu den Carotinoiden. Retinole finden sich in der Leber von Seefischen, verschiedener Wirbeltiere, im Milchlipp, im Fettgewebe und in einigen Organen. In der Netzhaut (Retina) von Säugetieren liegt es in der Form von Retinal vor. Retinole werden auch in Hühner- und Heringseiern gefunden.

Vitamin A₁ und seine Derivate werden im Organismus aus Carotinoiden gewonnen. Dabei liefert β-Carotin zwei Moleküle Retinal, wohingegen aus Carotinoiden mit nur einer unsubstituierten β-Endgruppe lediglich ein Molekül Retinal gewonnen werden kann.

Retinol hat verschiedene Funktionen im Organismus. Es findet z.B. beim Sehvorgang in den Lichtsinneszellen Verwendung. Dabei wird es über das Protein Opsin an die Sehpigmente (Lipoproteine) gekoppelt und erzeugt auf diesem Weg eine intensive Färbung der Verbindung (Thiele 1979).

Retinol ist sowohl an der zellulären Differenzierung beteiligt (Sporn et al. 1984; Sherman 1986, Sporn/Roberts 1991) als auch an der embryonalen Entwicklung (Thaler/Eichele 1990, Summerbell 1991). Weitere Anwendung findet das Vitamin A₁ bei der Erhaltung der funktionellen Unversehrtheit der Zell-, Mitochondrien- und

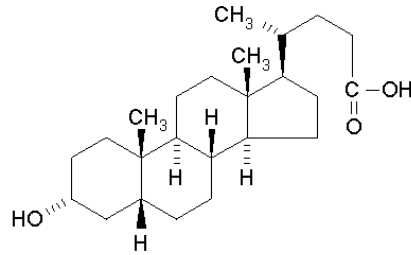


Abb. 1.4 Strukturformel von Lithocholsäure

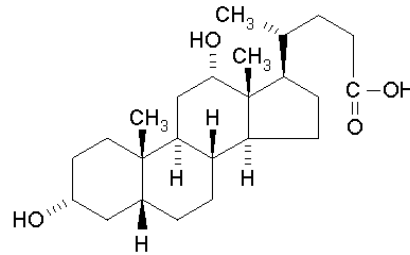


Abb. 1.5 Strukturformel von Deoxycholsäure

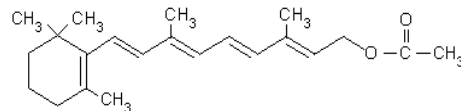


Abb. 1.6 Strukturformel von Retinol-Acetat

1981). Thurman et al. fand 1988 heraus, dass bei Mäusen eine Testosterongabe ad-renal-corticale Parenchymzellen vor Nekrosis schützt.

Testosteron wird wegen der dem Cholesterin ähnlichen Struktur als potentielle scher-reduzierende Substanz getestet. Es besteht die Möglichkeit einer Rückreaktion des Testosteron zu Cholesterin, aus welchem es produziert wird.

1.2.6.7 β -Cyclodextrin und Methyl-Cyclodextrin

Cyclodextrine (CD) sind sehr stabile zykli-sche Oligosaccharide, die je nach Größe der Ringe als α -, β - oder γ -Cyclodextrin be-zeichnet werden. Auf diese Weise werden 6-Ringe (α), 7-Ringe (β) und 8-Ringe (γ) unterschieden. Die Oligosaccharide können in der 2-, 3- oder 6-Position der Hydroxyl-gruppen substituiert werden, um die Eigen-schaften der Cyclodextrine, z.B. die

Löslichkeit zu verbessern. Dies ist bei Methyl-CD der Fall. Es ist ebenfalls ein β -CD, welches sich aber in Wasser statt wie unsubstituiertes β -CD in Natronlauge (NaOH) löst. CDs werden vorwiegend für eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit von unge-nügend wasserlöslichen Pharmazeutika eingesetzt. Die entsprechenden Substanzen werden vom CD komplexiert, können so zur Behandlung verabreicht und leichter vom Körper aufgenommen werden. Zum Beispiel werden Diclofenac und Piroxicam, zwei Säure-Antiphlogistika, als Einschlusskomplex mit CD verabreicht, weil die Löslich-keit der einzelnen Stoffe zu gering ist, um die benötigte Wirkung erzielen zu können (Vikman 1996, Piel).

In anderen Untersuchungen sind CDs als Ersatzstoffe für Rinder Serum Albumin (BSA) bzw. für fötales Kälberserum in Kulturmedien eingesetzt worden (Ohmori 1988, Yamane 1981 und Minamoto 1991). Auch wird über eine Adsorption zelltoxi-scher Substanzen in Kultivierungen berichtet (Ohmori 1988). Aufgrund dieser Wir-kung und der Ähnlichkeit der CDs mit Serum und BSA, die beide scherreduzierend wirken, werden β -CD und Methyl-CD als potentielle, scherreduzierende Substanzen getestet.

1.2.6.8 Mediumzusätze zur Scherstressreduzierung in der Literatur

In der Literatur lässt sich eine große Anzahl an Zusätzen finden, die alle eine Scher-reduzierung in Zellkulturen bewirken. Die bekanntesten sind Polyethylenglycole (PEG) und Pluronic F68 (PF68). Ihre Wirkung hängt von verschiedenen Aspekten ab, z.B. von ihrer Konzentration im Zellkulturmedium und von der Inkubationsdauer. Auch können verschiedene Zellarten auf die unterschiedlichen Zusätze anders reagieren. Eine Übersicht ist in Tabelle 1.2 zusammengestellt.

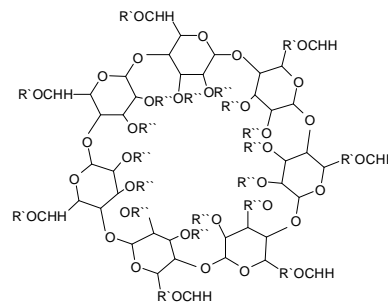


Abb. 1.9 Strukturformel von β -CD

Zelllinie → Additive ↓	SF-9	Myeloma	BHK-21	Hybridoma	CHO
PEG	Chattopadhyay et al. 1995 van der Pol et al. 1995a			Chattopadhyay et al. 1995 Micheals/Papoutsakis 1991 van der Pol et al. 1995 Michaels 1991	Michaels et al. 1995 van der Pol et al. 1995
Dextran	Chattopadhyay et al. 1995 Goldblum et al. 1990	van der Pol et al. 1995b McQueen/Bailey 1989		van der Pol et al. 1995b	
PF68	Chattopadhyay et al. 1995 Goldblum et al. 1990 Murhammer/Goochee 1988 Handa et al. 1987	Chattopadhyay et al. 1995 McQueen/Bailey 1989 Handa et al. 1987	Chattopadhyay et al. 1995	Chattopadhyay et al. 1995 Micheals/Papoutsakis 1991 Zhang et al. 1992 Goldblum et al. 1990 Michaels 1991 Lüdemann et al. 1996	Michaels 1995 Michaels et al. 1995b
Methocel	Chattopadhyay et al. 1995 Goldblum et al. 1990				Michaels 1995a
PVA/PVP	Chattopadhyay et al. 1995			Chattopadhyay et al. 1995	Michaels 1995a van der Pol/Tramper 1998 Michaels 1995a
Cholesterin			Tomeczkowski et. al. 1993		
BSA				Chattopadhyay et al. 1995 Lüdemann et al. 1996	
Serum	Chattopadhyay et al. 1995	Handa et al. 1987	Chattopadhyay et al. 1995	Chattopadhyay et al. 1995 Goldblum et al. 1990 Kunas/Papoutsakis 1990	
Carboxymethyl- cellulose			Chattopadhyay et al. 1995		
TPB		McQueen/Bailey 1989	Chattopadhyay et al. 1995		

Tab. 1.2 Untersuchungen von Mediumzusätzen in verschiedenen Zellkulturen

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinie- und kultivierung

Verwendet wird die Suspensionszelllinie CHO-Tf70R (Chinese Hamster Ovary), eine Weiterentwicklung der CHO-K1-Zelllinie von Puck (Puck 1959). Sie produziert den Wirkstoff „tissue Plasminogen-Activator“ (t-PA). Es handelt sich hierbei nicht um eine Hochleistungszelllinie. Die maximale Zelldichte liegt bei 1-1,5 Millionen Zellen pro Milliliter. Sie wird im serum- und proteinfreien Medium BP1P.F. (Bio Whittaker, Belgien) kultiviert. Glukose und Glutamin werden dem Medium in der Konzentration von 2,5 g/l bzw. 0,25 g/l zugesetzt.

Die Stammkulturhaltung erfolgt im Brutschrank (Typ BB16, Heraeus Instruments) bei 95%iger Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂-Gehalt, 25 rpm Rührergeschwindigkeit (Modell MCS-104S, Techne) in Techne-Rührerflaschen bei 37 °C Kultivierungstemperatur. Bei großer Zelldichte wird die Stammkultur unter den gleichen Bedingungen, jedoch bei 31 °C Kultivierungstemperatur gehalten. Zur optimalen Kultivierung und dem Anlegen von eingefrorenen Zellreserven wird auf die einschlägige Literatur verwiesen (Lindl/Bauer 1992).

Es werden die für Tierzellarbeiten nötigen Sterilitätsbedingungen eingehalten.

2.2 Kultivierungsbedingungen der Experimente

Die Experimente werden in zwei Versuchsreihen unterteilt: die Vorversuche zur Toxizität der Kultivierungszusätze in 6- bzw. 12-Loch-Platten (Eurolab, München) und die in 250 ml Techne-Flaschen durchgeführten Kultivierungen mit anschließenden Scherstressexperimenten. In den Toxizitätsversuchen wird die maximale Konzentration der Additive, die ohne Zellschädigung zugesetzt werden kann, ermittelt. Der Konzentrationsbereich variiert dort zwischen 0,5 mg/l für Lithocholsäure und bis zu 800 mg/l für Cholsäure. Die Toxizitätsversuche finden bei 37 °C statt.

Die Kultivierungen für die Scherstressversuche werden entweder wie die Toxizitätsversuche bei 37 °C oder mit Temperaturänderung zweieinhalb Tage bei 37 °C und zweieinhalb Tage bei 31 °C kultiviert. Die Versuche mit Temperaturshift tragen in der Versuchsbezeichnung den Buchstaben T.

Die Kultivierungszusätze werden am Animpftag der einzelnen Kultivierungen den entsprechenden Kulturen unter nachfolgenden Bedingungen sterilfiltriert zugesetzt (vgl. Tab. 2.1).

Zusätze	eingesetzte Konzentrationen [mg/l]	Lösungsmittel	Versuchsbezeichnung
Cholesterin	75 , 100 , 125	Medium	CI07-10; CV01-04*, LC01, CT01
Cholsäure	25 , 50 , 75	Medium	CH01-04, LCH01, CHT05-06 CHC01, CHPC01
Ergosterin	2, , 5 , 10	abs. Ethanol	E01-E03
Retinol	2,5 , 5 , 10	abs. Ethanol	R01-04, LR06, RT06
Lithocholsäure	-	-	-
Deoxycholsäure	4 , 10	Medium:1 M NaOH, 4:1	D01
Phosphatidylcholin	25 , 50	abs. Ethanol	PC01, PCL01
Testosteron	75 , 100	Medium	T01, TL01
β -CD	75 , 100	Medium	β -CD01
Methyl-CD	75 , 100	Medium	M-CD01

Tab. 2.1: Einsatzbedingungen der Mediumzusätze in den einzelnen Scherstressversuchen

* Vorkultur wird drei Tage vor dem eigentlichen Experiment mit der entsprechenden Konzentration kultiviert

2.3 Scherstressversuche

Die Scherstressversuche werden in einem Viskosimeter der Firma Contraves/Schweiz (Rheomat 115, Typ N + 100) durchgeführt. Verwendet wird der Edelstahl-Doppelspalt-Messkörper MS-DIN 125 (Mettler-Toledo). Der Innenradius des Systems beträgt 2,2752 mm der Außenradius 2,3491 mm. Bei allen Versuchen ist die Stufe drei der Grenzfrequenz sowie die Drehzahlstufe zwölf angewählt. Das Viskosimeter befindet sich nicht unter Brutschrankbedingungen. Das angeschlossene Wasserbad erwärmt das Viskosimeter auf die geforderte Versuchstemperatur.

Um den pH-Wert während des Versuchs konstant zu halten, wird dem normalen Kultiverungsmedium der Zusatzstoff 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES) (Sigma.-Aldrich) hinzugefügt (Scherstressmedium). Das Scherstressmedium enthält keine Scherstressadditive.

Die Scherstressversuche werden in Kurz- und Langzeitversuche unterteilt. Die Kurzzeitversuche dauern drei Stunden. Sie werden unter unsterilen Bedingungen durchgeführt, da das Bakterienwachstum sich in dieser kurzen Zeitspanne nicht negativ auf die Tierzellpopulation auswirkt. Die Langzeitversuche dauern 24 Stunden. Steriles Arbeiten ist erforderlich, damit Bakterien die Messergebnisse nicht verfälschen. Dazu wird der Reaktionsraum bei 1 bar Überdruck 40 min bei 121 °C autoklaviert (Typ 9710 E, Integra Bioscience).

Es werden 15 ml Scherstressmedium mit einer Zelldichte von $25 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in den Reaktionsraum eingefüllt. Dabei werden die Zellen den entsprechenden Kulturen in der erforderlichen Menge entnommen, bei 1500 rpm 2 min abzentrifugiert (Labofuge 6000, Heraeus), der Überstand dekantiert und verworfen sowie die Zellen in 16 ml Scherstressmedium resuspendiert. Diesen 16 ml wird ein Milliliter als Nullprobe für Analysen entnommen. Die restlichen 15 ml werden für den Versuch verwendet.

Die tatsächliche Drehzahl der laufenden Messung wird während der Versuche wie folgt von der am Gerät befindlichen Digitalanzeige abgelesen. Bei Kurzzeitversuchen wird der Anfangswert, der Wert zur Halbzeit und der Endwert notiert. Dagegen werden bei Langzeitversuchen neben dem Anfangs- und dem Endwert überwiegend zwei oder drei Werte während des Versuchs notiert. Die erhaltenen Werte werden gemittelt und zur Berechnung von τ verwendet.

$$\tau = \tau\%_o \cdot \overline{M} \quad (13)$$

\overline{M} = gemittelttes Drehmoment (Digitalanzeige)

2.4 Analytik

2.4.1 Zellzahl

Die Zellzahl der einzelnen Kulturen wird mikroskopisch (Olympus BH2) bestimmt. Verwendet werden Neubauer und Neubauer-improved Zählkammern. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt vierfach.

Für die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wird die Zellprobe eins zu eins mit Trypan Blue (Sigma-Aldrich) verdünnt und bei 100facher Vergrößerung ausgezählt. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgt durch die Abtrennung der Zellen vom Medium (2 min bei 1500 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415C) und die anschließende Resuspension in der gleichen Menge einer Kristallviolettlösung (0,1 g Kristallviolett, 10 ml Triton X-100, 21,014 g Zitronensäure auf 1 l bidestilliertes Wasser). Die Zellzahl wird bei 200facher Vergrößerung ausgezählt.

2.4.2 Glukose und Laktat

Die Konzentrationsbestimmung von Glukose und Laktat erfolgt simultan. Für die Messung wird die Zellprobe 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand in einem halbautomatischen Analyzer der Firma Yellow Springs Instruments (YSI 2700 Select) gemessen. Das Messprinzip ist der Firmenschrift zu entnehmen (Yellow Springs Instruments, 1996).

Anhand der Konzentrationen ist der Stoffwechsel zu verfolgen.

2.4.3 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die LDH-Bestimmung erfolgt photometrisch (Uvikon 930, Kontron Instruments) bei 340,1 nm. Zur Bestimmung wird das Testkit DG 1340-K der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Das Messprinzip ist der Firmenschrift zu entnehmen (Sigma-Aldrich, Firmenschrift LDH Opt., 1998). Es wird der relative LDH-Wert gemessen. Das heißt, die absolute Aktivität des LDHs im Medium vor und nach den Versuchen ist nicht interessant, sondern die Zunahme der Aktivität ist entscheidend.

Die LDH-Aktivität steht in engem Zusammenhang mit der Zellvitalität. Hohe Werte deuten auf eine Vitalitätsabnahme hin.

2.4.4 Ammonium

Die Ammoniumkonzentration wird ebenfalls bei 340,1 nm (Uvikon 930, Kontron Instruments) photometrisch bestimmt. Dazu wird ein Testkit (Nr. 1 111 753) der Firma Biopharm eingesetzt. Für die Messung müssen zuerst die Proteine entfernt werden. Dazu werden Probe und Perchlorsäure im Verhältnis 1:2 gemischt, eine halbe Stunde bei 4 °C gekühlt und anschließend bei 5500 rpm 5 min abzentrifugiert. Das Messprinzip ist der Firmenschrift zu entnehmen (Boehringer Mannheim, Firmenschrift Ammoniak, 1998).

Ammoniak ist ein Stoffwechselmetabolit der das Zellwachstum beeinträchtigt. Für CHO-Zellen sind Konzentrationen von 36 bis 75 mg/l wachstumshemmend (Butler 1985). Toxische Konzentrationen liegen für die Zellen ab 150 mg/l vor (Kurano 1990).

2.4.5 Protein

Die Proteinbestimmung erfolgt photometrisch (Immunoreader NJ-2000) bei 620 nm. Verwendet wird das Micro-Coomassie-Testkit (Nr. 23 200 UN1760) der Firma Pierce, zum Messprinzip siehe Firmenschrift Pierce 1998.

Aus der Proteinbestimmung können Rückschlüsse auf den Stoffwechsel gezogen werden.

2.4.6 Cholesterin

Zur Cholesterinbestimmung wird ein Testkit (Nr. 352-20) der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Die Bestimmung erfolgt photometrisch bei 500 nm (Uvikon 930, Kontron Instruments) bestimmt. Entgegen der Anleitung wird aufgrund der geringen Cholesterinkonzentration der Volumenanteil der Messprobe von 10 µl auf 100 µl erhöht. Für das Messprinzip wird auf die Firmenschrift Cholesterin der Firma Sigma-Aldrich verwiesen (1998).

In den Cholesterinversuchen kann anhand dieser Untersuchung eine Aufnahme des Zusatzes in die Zelle verfolgt werden.

2.4.7 Aminosäuren

Die Aminosäurenbestimmung erfolgt mittels high performance liquid chromatography (HPLC). Verwendet wird eine reversed phase (RP) C¹⁸ Säule von waters, mit der die mit ortho-Phthalaldehyd (OPA) derivatisierten Proben analysiert werden.

Zur Probenvorbereitung werden die Überstände im Verhältnis eins zu eins mit Methanol vermischt und eine halbe Stunde bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend werden sie bei 5500 rpm für 5 min zentrifugiert.

Anhand der Aminosäurekonzentrationen kann der Stoffwechsel der Zellen verfolgt werden.

2.4.8 t-PA

Die Konzentration des Glykoproteins t-PA wird anhand eines enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) der Firma Diagnostic International (Nr. 10 1005) bestimmt. Die Messung erfolgt bei 490 nm (Immunoreader NJ-2000). Zum Messprinzip siehe die Firmenschrift biopool.

Die Bestimmung gibt Aufschluss darüber, ob und in welcher Größenordnung die Zellen das Zielprotein produzieren oder ob sie durch eine Beeinträchtigung in der Produktion gestört werden.

2.4.9 Wachstumsrate

Das Wachstum der Zellen ist nicht limitiert. Im Idealfall entstehen in der exponentiellen Wachstumsphase aus jeder Zelle zwei Tochterzellen. Die Wachstumsgeschwindigkeit r_x ist durch die Änderung der Lebendzellkonzentration X definiert:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (11)$$

μ = zellspezifische Wachstumsrate

Für die zellspezifische Wachstumsrate μ ergibt sich ein logarithmischer Zusammenhang:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (12)$$

X_1, X_2 = Lebendzellkonzentrationen zum Zeitpunkt t_1, t_2

2.4.10 Spezifische Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten

Für den Glukoseverbrauch und die Bildung von Laktat, Ammonium und t-PA werden die entsprechenden Raten berechnet. Für die Substratbildungsrate gilt bei satzweisem Betrieb:

$$r_s = \frac{dS}{dt} = q_s \cdot X(t) \quad (13)$$

dS = Änderung der Substratkonzentration, q_s = zellspezifische Verbrauchsrate, $X(t)$ = Gesamtzellkonzentration zum Zeitpunkt t

$$q_s = \frac{Q_s}{\bar{X}} \quad (14)$$

Q_s = spezifischer Verbrauch, \bar{X} = mittlere Lebendzellzahl = $\frac{X_1 + X_2}{2}$

Für die Verbrauchsgeschwindigkeit ergibt sich:

$$Q_s = \frac{S_1 - S_2}{t_2 - t_1} \quad (15)$$

S_1, S_2 = Substratkonzentrationen zum Zeitpunkt t_1, t_2

Für die Produktbildung lassen sich äquivalente Gleichungen aufstellen.

2.4.11 Überlebensrate

Die Überlebensrate R_s ist der prozentuale Anteil der Lebendzellzahlen nach dem Scherstressexperiment in Bezug auf die anfängliche Lebendzellzahl.

2.5 Mediumzusätze

Die Mediumadditive werden zu Beginn der Kultivierungsreihe den einzelnen Kulturen zugesetzt. Eine Ausnahme bilden die Experimente CV01 bis CV03, denen die Additive in der Vorkultur drei Tage vor dem Beginn der Kultivierungsreihe zugesetzt werden.

2.5.1 Cholesterin

Cholesterin wird in wasserlöslicher Form (Sigma-Aldrich, C1145) den entsprechenden Kulturen zugesetzt. Dabei werden zwei unterschiedliche Ansätze vorgenommen:

- Ansatz eins enthält 100 mg/l Cholesterin, was bei einem Volumen von 150 ml und 10 % Fehler eine Einwaage von 0,05 g erfordert.
- Ansatz zwei enthält 125 mg/l und erfordert unter den gleichen Bedingungen eine Einwaage von 0,07 g.

Für die Versuche werden je einmal 500 ml der genannten Lösungen angesetzt und bei 4 °C aufbewahrt. Für die weiteren Versuche werden die Lösungen jeweils bei Versuchsbeginn neu angesetzt. Die Cholesterinlösungen werden dem Medium sterilfiltriert zugesetzt.

2.5.2 Ergosterin

Für die Ergosterinversuche wird eine Stammlösung angesetzt. Es werden dafür 0,05 g Ergosterin (Sigma-Aldrich, E6510) in 30 ml abs. Ethanol gelöst. Die Stammlösung hat somit eine Konzentration von 1,67 g/l. Sie wird nicht sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. Den Versuchen werden die benötigten Volumina bei

Versuchsbeginn zugesetzt, bspw. 593 μl für 100 ml einer Kultur mit der Konzentration von 10 mg/l. Die unterschiedlichen Ethanolmengen werden durch Zugabe der entsprechenden Mengen zu den anderen Kulturen ausgeglichen.

2.5.3 Gallensäuren: Cholsäure, Lithocholsäure, Deoxycholsäure

Für die Cholsäureversuche wird bei Versuchsbeginn eine Stammlösung frisch in Medium angesetzt, sterilfiltriert und werden die entsprechenden Volumina den einzelnen Kulturen zugesetzt. So werden bspw. 0,10 g des einfachen Natriumsalzes der Cholsäure (Sigma-Aldrich, C6445) in 10 ml Medium aufgelöst. Die so erhaltene Stammlösung hat eine Konzentration von 10 g/l. Sie wird bei 4 °C aufbewahrt. Für 100 ml einer Kultur mit der Konzentration von 50 mg/l erfordert dies eine Zugabe von 500 μl der Stammlösung, für 75 mg/l werden 750 μl benötigt.

Die Versuche mit Lithocholsäure (Sigma-Aldrich, L6250) erfordern die Auflösung der Substanz in abs. Ethanol. Es wird eine Stammlösung von 0,10 g Lithocholsäure auf 10 ml Ethanol angesetzt. Sie wird nicht sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. Für die verschiedenen Konzentrationen werden die entsprechenden Volumina zugesetzt. Es erfolgt kein Ausgleich der unterschiedlichen Ethanolkonzentration, da es sich bei diesem Versuch um einen Toxizitätstest handelt. Vielmehr werden die Auswirkungen der verschiedenen Ethanolkonzentrationen durch den Vergleich mit Referenzen mit der gleichen Ethanolkonzentrationen kompensiert.

Eine Stammlösung von 4,0 g/l Deoxycholsäure (Sigma-Aldrich, D2510) in 0,2 M NaOH wird für die Versuche angesetzt. Sie wird sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. Für die entsprechenden Konzentrationen werden die erforderlichen Volumina zugesetzt und die daraus resultierenden unterschiedlichen NaOH-Konzentrationen der einzelnen Kulturen in der Versuchsreihe durch NaOH-Zugabe ausgeglichen. Die NaOH-Zugabe wird ihrerseits durch die gleiche Stoffmenge an HCl kompensiert.

2.5.4 Retinol

Für die Versuche mit Retinol (Sigma-Aldrich, R7882) wird eine Stammlösung von 0,05 g in 2 ml abs. Ethanol angesetzt. Die Konzentration beträgt demnach 25,00 g/l. Die Lösung wird nicht sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. Die in den Versuchen verwendeten Volumina sind so gering, dass auf einen Ausgleich der Ethanolkonzentration verzichtet wird.

2.5.5 Phosphatidylcholin

Für die Experimente mit PC (Sigma-Aldrich, P3644) werden 0,150 g PC in 3 ml abs. Ethanol aufgelöst. Die Konzentration beträgt demnach 50 g/l. Die Lösung wird nicht sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Die Zugabe erfolgt bei Versuchsbeginn. Auf einen Ausgleich der Ethanolkonzentration wird aufgrund der geringen Menge verzichtet.

2.5.6 Testosteron

Testosteron (Sigma-Aldrich, T5035) wird den Versuchen ebenfalls als Stammlösung zugesetzt. Es liegt in einer wasserlöslichen Form vor, da es 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin stabilisiert ist. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 4,95 g/l und wird durch das Lösen von 0,24 g Substanz (das entspricht 24,8 mg Testosteron) in 5 ml Medium erzeugt. Die Stammlösung wird sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Bei Versuchsbeginn werden die äquivalenten Mengen zugesetzt.

2.5.7 β -Cyclodextrin und Methyl-Cyclodextrin

Für die Experimente mit β -CD (Sigma-Aldrich, C4805) wird eine Stammlösung von 50 g/l angesetzt, indem 0,10 g in 2 ml NaOH gelöst werden. Die Lösung wird sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Aufgrund der geringen Volumina, die in den einzelnen Versuchen verwendet werden, wird auf einen NaOH-Ausgleich zwischen den einzelnen Kulturen sowie auf eine Neutralisierung verzichtet.

Methyl-CD (Sigma-Aldrich, C4555, Substitutionsgrad 10,5-14,7) wird in bidestilliertem Wasser gelöst. Es werden 0,10 g in 2 ml Wasser gegeben. Die Konzentration der Lösung beträgt 50 g/l. Die Lösung wird sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Toxizitätstests

Die in den Toxizitätstests eingesetzten Substanzen werden in folgende Gruppen zusammengefasst:

- Gruppe I: Cholesterin und Ergosterin, weil beide die gleiche Funktion jedoch in verschiedenen Zellen erfüllen,
- Gruppe II: Cholsäure, Lithocholsäure und Deoxycholsäure, weil sie alle zu der Gruppe der Gallensäuren gehören,
- Gruppe III: Phosphatidylcholin, Testosteron und Retinol, weil sie aufgrund ihrer Funktionen keiner anderen Gruppe zuzuordnen sind,
- Gruppe IV: β -Cyclodextrin und Methyl-Cyclodextrin, weil sie aufgrund ihrer Struktur Moleküle komplexieren können und beide nicht in der Natur vorkommen; es ist keine Einlagerung in die Zellmembran möglich und die Substanzen können nicht verstoffwechselt werden.

3.1.1 Ethanol

Einige der zu untersuchenden Substanzen werden in Ethanol (EtOH) gelöst. Damit der Einfluss des Ethanols in den Versuchen von dem der Substanzen unterschieden werden kann, wird ein Toxizitätstest mit Ethanol durchgeführt.

Es werden vier Kulturen mit den Ethanol-Konzentrationen 0,12 %, 0,20 %, 0,32 %, und 0,64 % untersucht. Sie werden mit einer Referenz, die kein Ethanol enthält, verglichen. Dabei entwickeln sich die Lebendzellzahlen der Kulturen bis 0,32 % Ethanol

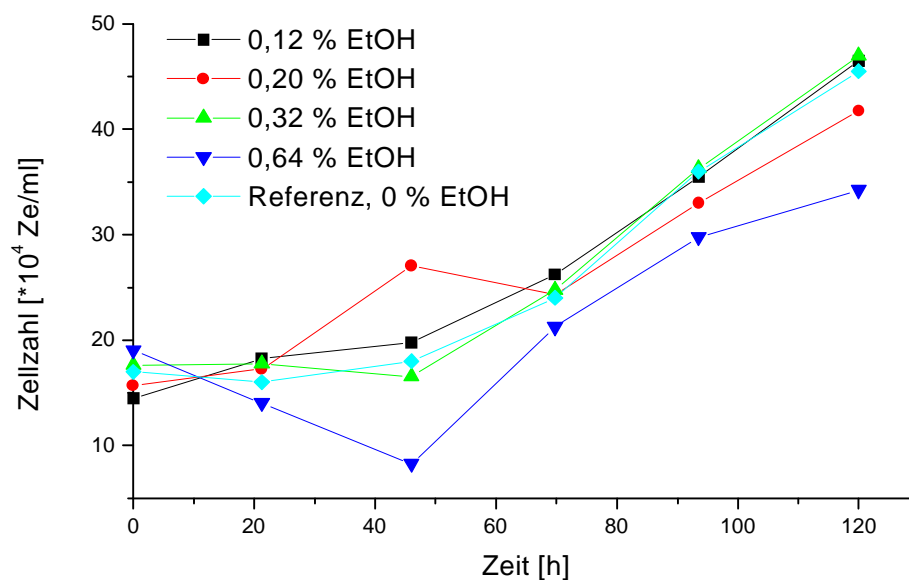


Abb. 3.1 Lebendzellzahl im EtOH-Toxizitätstest

analog zur Referenz (vgl. Tab. 3.1). Geringe Abweichungen treten bei der Kultur mit 0,20 % EtOH auf. Eine Beeinflussung zeigt sich in der Kultur mit 0,64 % EtOH. Hier verringert sich die Lebendzellzahl in den ersten 46 Stunden auf $8 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Am Ende der Kultivierung werden weder die gleiche noch ähnliche Lebendzellzahlen wie bei der Referenz erreicht.

Werden die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten der Kulturen miteinander verglichen, fällt eine höhere Verbrauchs- sowie Produktionsrate der Kultur mit 0,64 % EtOH auf (vgl. Tab. 3.2 und 3.3). Dies deutet auf einen Einfluss des EtOH auf die Zellen der Kultur hin, da mehr Glukose verbraucht und mehr Laktat produziert wird. Die Verbrauchs- und Produktionsraten der restlichen Kulturen sind vergleichbar.

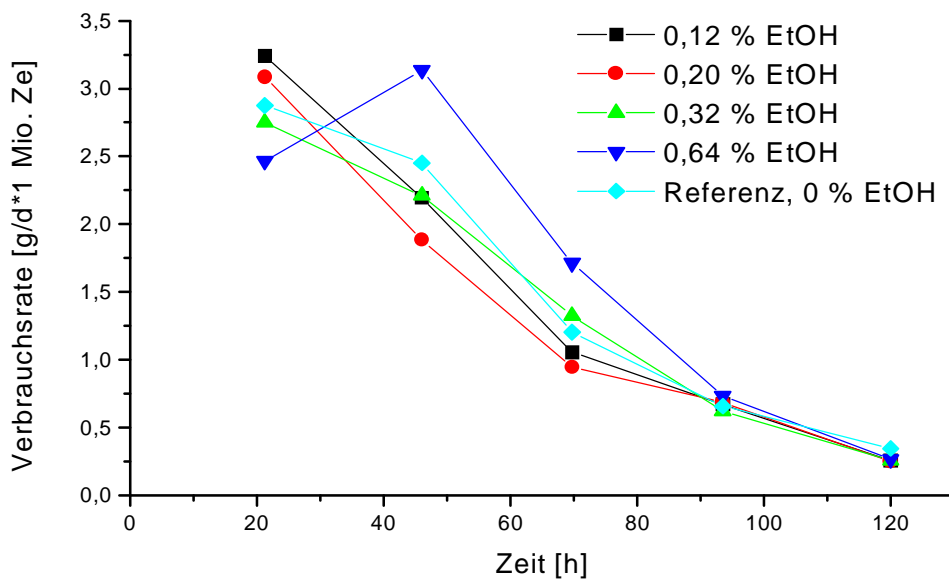


Abb. 3.2 Glukoseverbrauchsrate im EtOH-Toxizitätstest

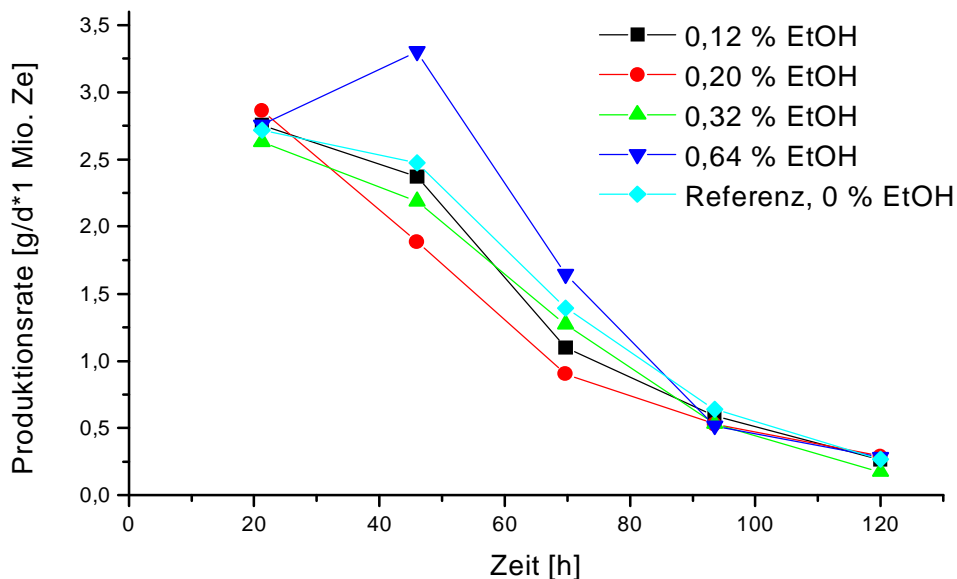


Abb. 3.3 Laktatproduktionsrate im EtOH-Toxizitätstest

Aufgrund dieser Daten kann von einem Einfluss des EtOHs ab einer Konzentration von 0,64 % ausgegangen werden. Volumina der in EtOH zu lösenden Medium-additive, die eine Konzentration über 0,64 % EtOH in den Kulturen bedeuten, sollten vermieden werden.

3.1.2 Gruppe I: Cholesterin und Ergosterin

Cholesterin wird als wasserlösliches Derivat im Medium BioPro P.F. 1 aufgelöst. Es wird eine Stammlösung von 1 g/l verwendet. Weil aus der Literatur bekannt ist (Tomeczkowski et al. 1993), dass Konzentrationen über 100 mg/l Cholesterin einen toxischen Einfluss auf adhärenzte BHK21-Zellen haben, soll in einem ersten Test die toxische Konzentrationsobergrenze in einem Bereich von 175 mg/l bis 500 mg/l festgestellt werden.

Wie in Abb. 3.4 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Lebendzellzahlen erst in der 92. und in der 126. Stunde deutlich voneinander. Die Kulturen mit Cholesterinzusatz über 175 mg/l enthalten von $11 \cdot 10^4$ bis zu $38 \cdot 10^4$ weniger lebende Zellen pro Milliliter als die Vergleichskultur. Die Totzellzahl (vgl. Abb. 3.5) lässt dagegen eine viel frühere Differenzierung im Wachstumsverhalten der Kulturen erkennen. Die Totzellzahlen unterscheiden sich bereits in der 70. Stunde um bis zu $6 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter voneinander.

Bei der Betrachtung der Vitalitätsverläufe der einzelnen Kulturen (vgl. Abb. 3.6) ist eine Vitalitätsabnahme der mit Cholesterin versetzten Kulturen erkennbar. Die Vitalität nimmt ab der 40. Stunde kontinuierlich ab und sinkt bei den Konzentrationen von 400 mg/l und 500 mg/l bis auf 30 % ab. Das Cholesterin wirkt sich demzufolge ab einer Kultivierungsdauer von 40 Stunden sichtbar negativ auf die Vitalität der Zellen aus. Der verschlechterte Zustand der Zellen beeinflusst seinerseits das Zellwachstum negativ. Dabei ist eine Abhängigkeit der Wachstumsbeeinflussung von der Konzentration des Cholesterins deutlich.

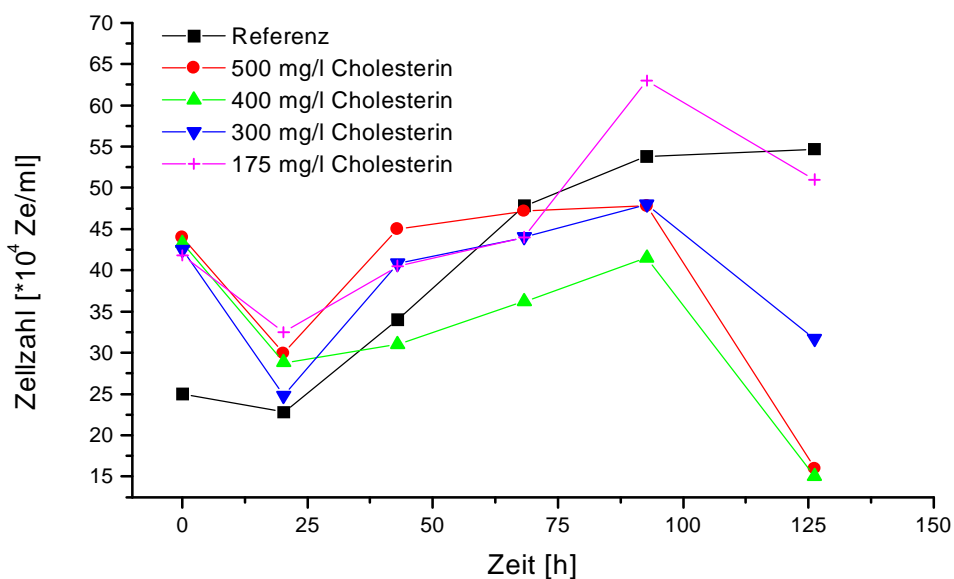


Abb. 3.4: Lebendzellzahl im ersten Cholesterin-Toxizitätstest

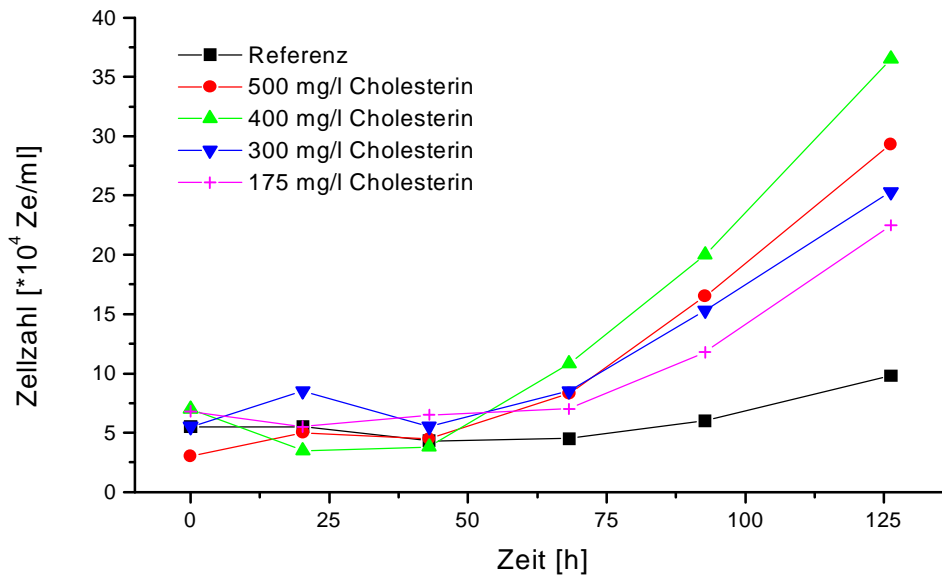


Abb. 3.5 Totzellzahl im ersten Cholesterin-Toxizitätstest

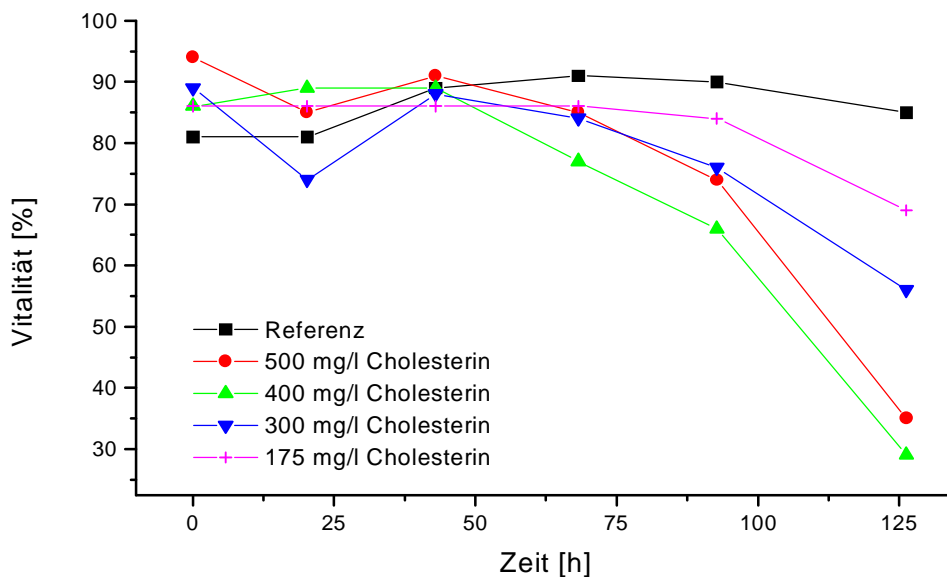


Abb. 3.6 Vitalität im ersten Cholesterin-Toxizitätstest

Die hier getesteten Konzentrationen sind als Zusatz für Kultivierungen, die länger als zwei Tage untersucht werden sollen, nicht geeignet, da sie das Zellwachstum negativ beeinflussen und so einen Vergleich zwischen den Kulturen nicht zulassen. Aus diesem Grund wird ein weiterer Toxizitätstest mit geringeren Konzentrationen durchgeführt.

Im zweiten Cholesterin-Toxizitätstest werden die Kulturen mit Cholesterin-Konzentrationen zwischen 75 und 125 mg/l versetzt. Wie in Abb. 3.7 zu erkennen ist, differieren auch hier die Lebendzellzahlen der Kulturen mit Cholesterin-Zusatz. Die Differenz beträgt in der 90. Stunde $3 \cdot 10^4$ bis $12 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Damit ist sie im Durchschnitt um ein Drittel geringer als die Lebendzellzahldifferenz im ersten Test zur gleichen Stunde. Im Gegensatz zum ersten Test unterscheiden sich die

Zellzahlen in der 115. Stunde nicht wesentlich voneinander. Die größte Abweichung zur Referenz zeigt dort die Kultur mit 85 mg/l Cholesterin-Zusatz mit $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter.

Die Totzellzahlen unterscheiden sich bis zur 90. Stunde nicht voneinander (vgl. Abb. 3.8). Erst in der 115. Stunde treten offensichtliche Differenzen auf. Dabei ist es gerade die Kultur mit der geringsten Cholesterin-Konzentration, die eine Differenz von $12 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter aufweist. Die Totzellzahlen der mit höheren Cholesterin-Konzentrationen versetzten Kulturen sind mit $15 (\pm 1) \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter vergleichbar.

Bei der Betrachtung der Vitalitätsverläufe des zweiten Toxizitätstests mit Cholesterin fällt auf, dass die Vitalität der Referenz bis zur 70. Stunde niedriger ist als die der mit Cholesterin versetzten Kulturen (vgl. Abb. 3.9). Dies liegt an der niedrigeren Startvitalität der Referenzkultur. Ausschlaggebend ist, dass sich die Vitalität der Cholesterin-Kulturen im Versuchszeitraum nicht maßgeblich von der Referenz unterscheidet.

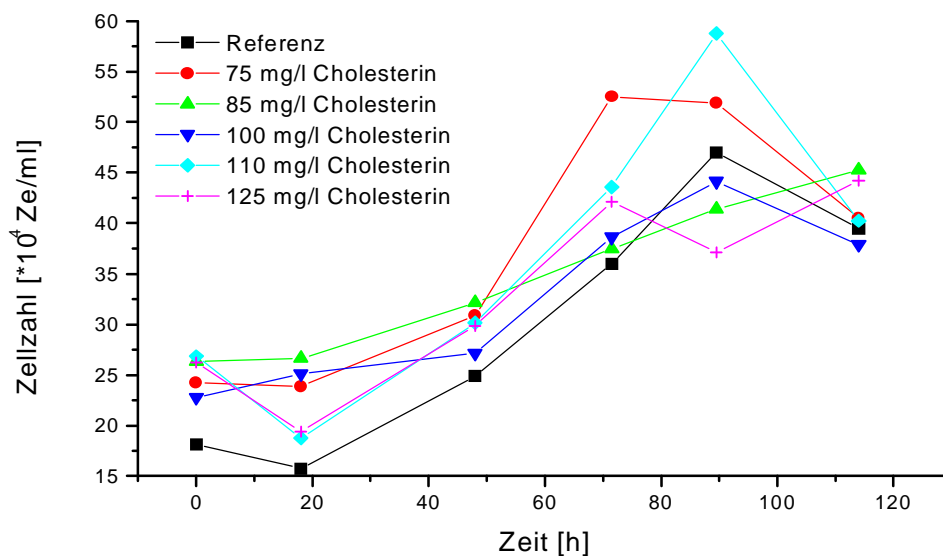


Abb. 3.7 Lebendzellzahl im zweiten Cholesterin-Toxizitätstest

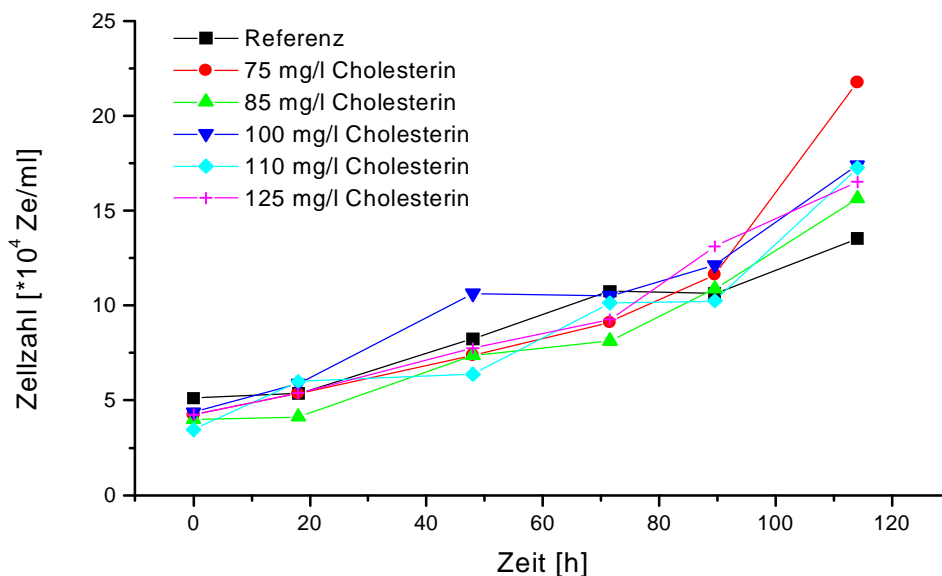


Abb. 3.8 Totzellzahl im zweiten Cholesterin-Toxizitätstest

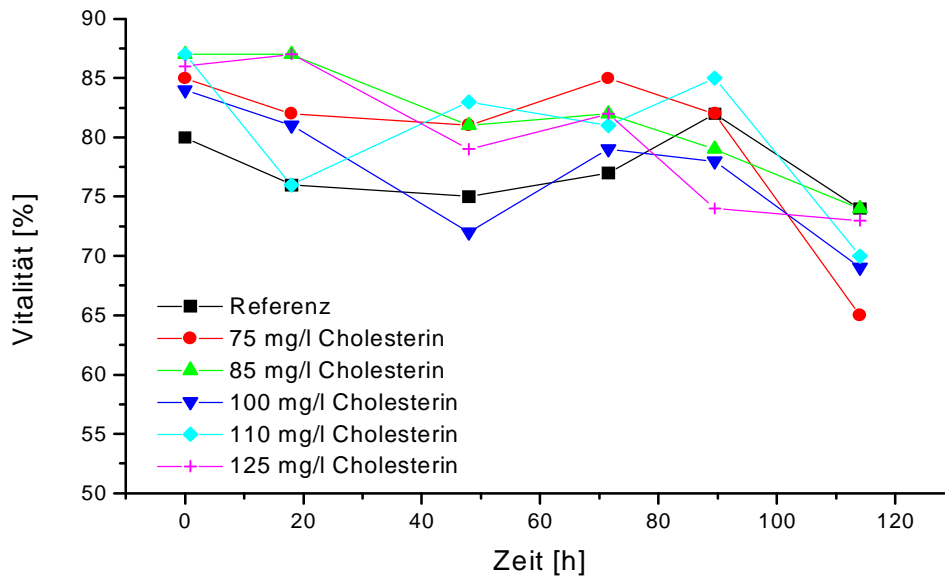


Abb. 3.9 Vitalität im zweiten Cholesterin-Toxizitätstest

Anhand der gewonnenen Daten ergibt sich ein Einsatzbereich von Cholesterin als nicht-zellschädigendes Additiv in CHO-Kulturen in einem Bereich bis 125 mg/l. Oberhalb dieser Konzentration bis 175 mg/l liegen keine Daten vor. Der Konzentrationsbereich über 175 mg/l erweist sich als eindeutig toxisch und sollte deshalb vermieden werden.

Ergosterin ist im wässrigen Medium nicht löslich und lässt sich auch in Ethanol nur in geringen Mengen lösen. Es wird eine Stammlösung mit 5,5 g/l angesetzt. Für den Toxizitätstest werden Konzentrationen zwischen 10 mg/l und 55 mg/l eingestellt.

Die Lebendzellzahlen des Toxizitätstests (vgl. Abb. 3.10) sind niedrig. Trotzdem lassen sich Unterschiede in der Änderung der Lebendzellzahl erkennen. In den Kulturen mit 40 mg/l und 55 mg/l Ergosterin sinkt die Lebendzellzahl bis zur 20. Stunde auf Null ab. Diese Ergosterin-Konzentrationen wirken toxisch auf die Zellen, wie sich an

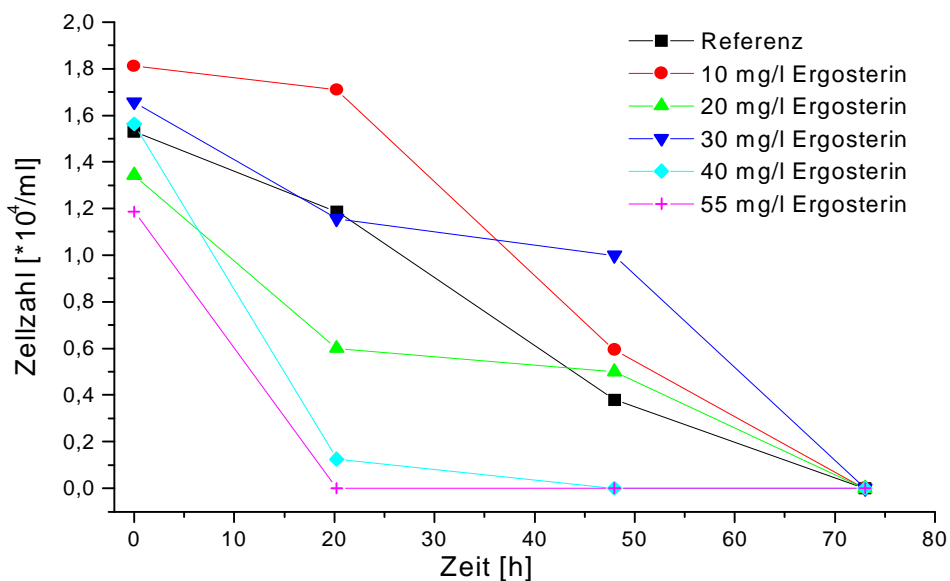


Abb. 3.10 Lebendzellzahl im Ergosterin-Toxizitätstest, alle Kulturen mit 1 % EtOH

der Vitalität (vgl. Abb. 3.11) ebenfalls feststellen lässt. Auffällig ist, dass innerhalb des Versuchszeitraums von 73 Stunden die Lebendzellzahl aller Kulturen bis auf Null Zellen pro Milliliter absinkt. Das lässt eine Schädigung der Zellen schon zu Versuchsbeginn vermuten, die wahrscheinlich auf das unübliche, mehrfache Abzentrifugieren der Zellen bei Kultivierungsbeginn in Kombination mit Ethanol während der Kultivierung zurückzuführen ist.

Die unterschiedliche Anfangsvitalität der Kulturen beruht zum einen auf den geringen Zellzahlen. Unterläuft bei der Zählung ein Fehler, so wirkt er sich stärker auf die Ergebnisse aus, als bei hohen Zellzahlen. Da die Kulturen alle aus der gleichen Vorkultur angeimpft werden, kann die Vitalität nicht um 30 % variieren. Für einen Einfluss des Ethanols und des Ergosterins ist die Einwirkzeit zu gering, weil die Probe unmittelbar nach dem Animpfen genommen wird.

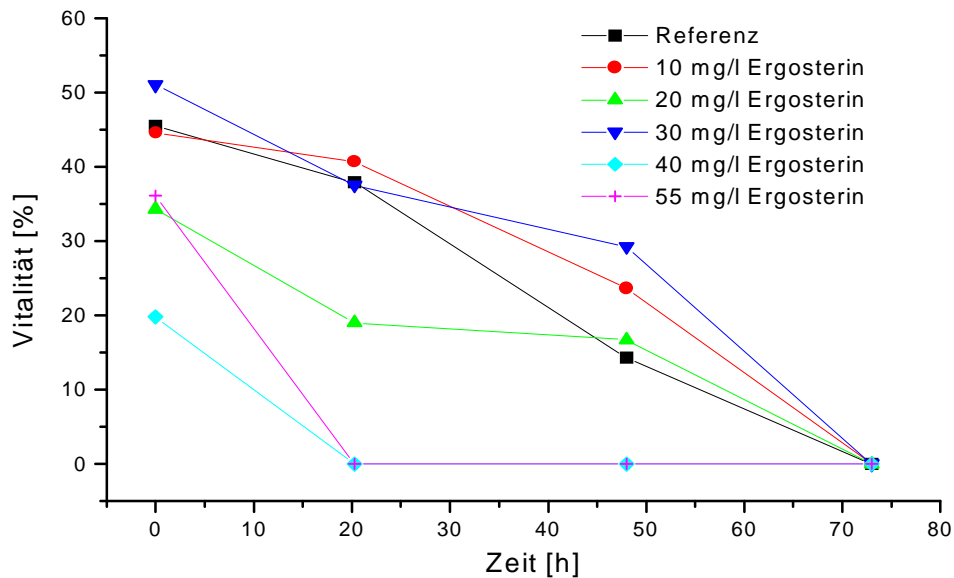


Abb. 3.11 Vitalität im Ergosterin-Toxizitätstest, alle Kulturen mit 1 % EtOH

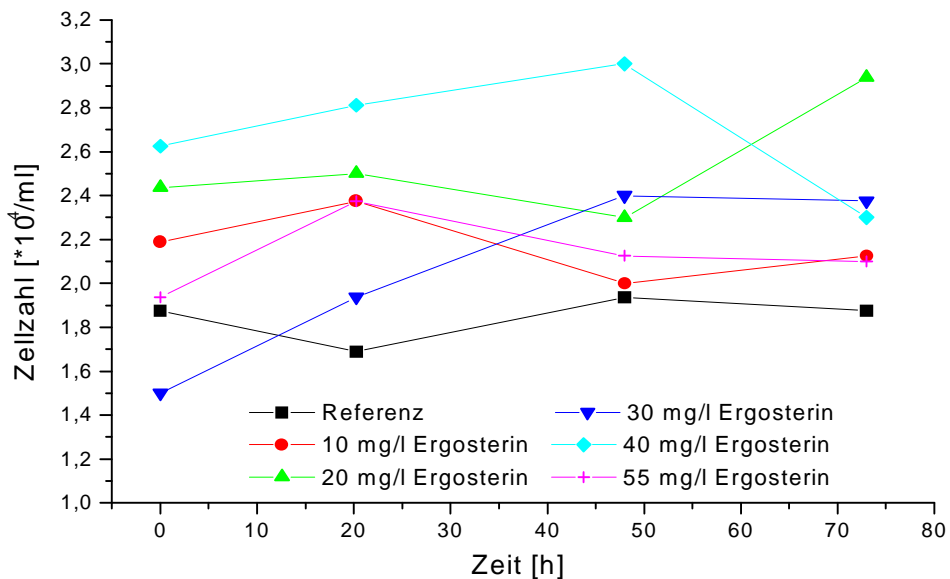


Abb. 3.12 Totzellzahl im Ergosterin-Toxizitätstest, alle Kulturen mit 1 % EtOH

Bei der Betrachtung der Totzellzahlen (vgl. Abb. 3.12) ist kein Zusammenhang mit der Höhe des Ergosterin-Zusatzes zu erkennen. Die Kultur mit der höchsten Konzentration (55 mg/l) und die mit der niedrigsten (10 mg/l) differieren in den Totzellzahlen nicht. In der Referenz befindet sich die geringste Zahl an toten Zellen pro Milliliter.

Zur Feststellung des Toxizitätsbereichs von Ergosterin werden Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten während der Kultivierung näher untersucht (vgl. Abb. 3.13 u. 3.14). Es ergeben sich maximal drei Werte für die einzelnen Kulturen, weil die Kulturen schon nach wenigen Tagen absterben. Die Raten für die höheren Ergosterin-Konzentrationen können nur ungenügend mit der Referenz verglichen werden, da die Lebendzellzahlen dieser Kulturen schon nach 20 bzw. 48 Stunden gleich Null sind. Bei den ermittelten Raten wird festgestellt, dass die Kulturen mit den Konzentrationen

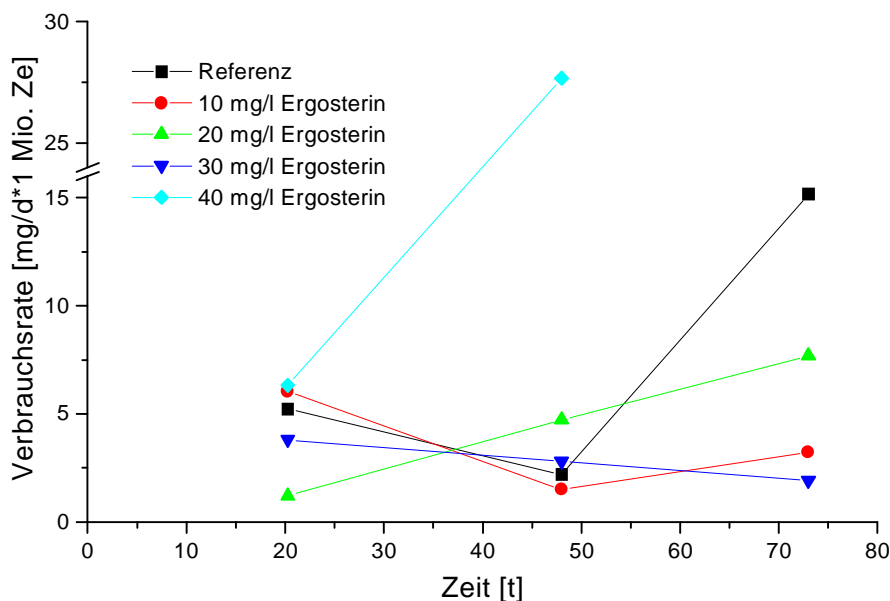


Abb. 3.13 Glukoseverbrauchsrate im Ergosterin-Toxizitätstest, alle Kulturen mit 1 % EtOH

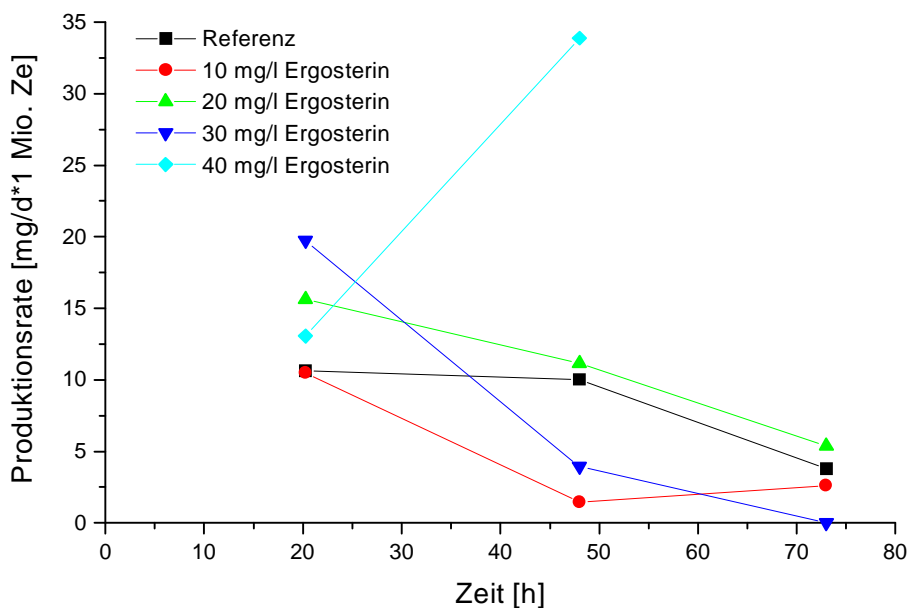


Abb. 3.14 Laktatproduktionsrate im Ergosterin-Toxizitätstest, alle Kulturen mit 1 % EtOH

von 10 mg/l sowie 30 mg/l Ergosterin bis zur 48 Stunde ähnliche Glukoseverbrauchsraten wie die Referenz besitzen. Die Kultur mit der Konzentration von 20 mg/l besitzt eine der Referenz vergleichbare Laktatproduktionsrate. Die Kultur mit 40 mg/l besitzt der Referenz gegenüber sowohl eine erhöhte Glukoseverbrauchs- als auch eine erhöhte Laktatproduktionsrate.

Eine Einstufung der Ergosterin-Konzentrationen ist anhand der ermittelten Daten schwierig, vor allem da sich in den einzelnen Kulturen EtOH-Konzentrationen von 1 % befinden, welchen nach Kap. 3.1.1 ein negativer Einfluss auf die Zellen zukommt. Um für anschließende Kultivierungen den negativen Einfluss von Ergosterin auf die Zellen definitiv ausschließen zu können, sollten Konzentrationen über 20 mg/l vermieden werden. Im Toxizitätstest sterben die Kulturen über 40 mg/l Ergosterin sehr früh ab.

3.1.3 Gruppe II: Cholsäure, Lithocholsäure, Deoxycholsäure

Das Natriumsalz der **Cholsäure** löst sich gut in wässrigen Medien. Mit einer Stammlösung von 10 g/l werden in einem ersten Toxizitätstest Konzentrationen zwischen 50 und 800 mg/l eingestellt.

Die Vitalitätsverläufe (vgl. Abb. 3.15) zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Höhe des Cholsäure-Zusatzes. Ab einer Konzentration von 200 mg/l ist ein negativer Einfluss deutlich zu erkennen. Eine Cholsäure-Konzentration von 100 mg/l bzw. 50 mg/l beeinflusst die Vitalität dagegen nicht.

Eine Betrachtung der Totzellzahl (vgl. Abb. 3.16) der Kulturen zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von der Höhe der Cholsäure-Konzentration. Die hohen Cholsäure-Konzentrationen bewirken eine Erhöhung der Totzellzahl. Nach 20 Stunden ist die Totzellzahl der Kulturen von 200 bis 800 mg/l um $5 \cdot 10^4$ bis $8 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter höher als die Totzellzahl der Referenz. Die Totzellzahlen der geringer konzentrierten Cholsäure-Kulturen unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der Referenz.

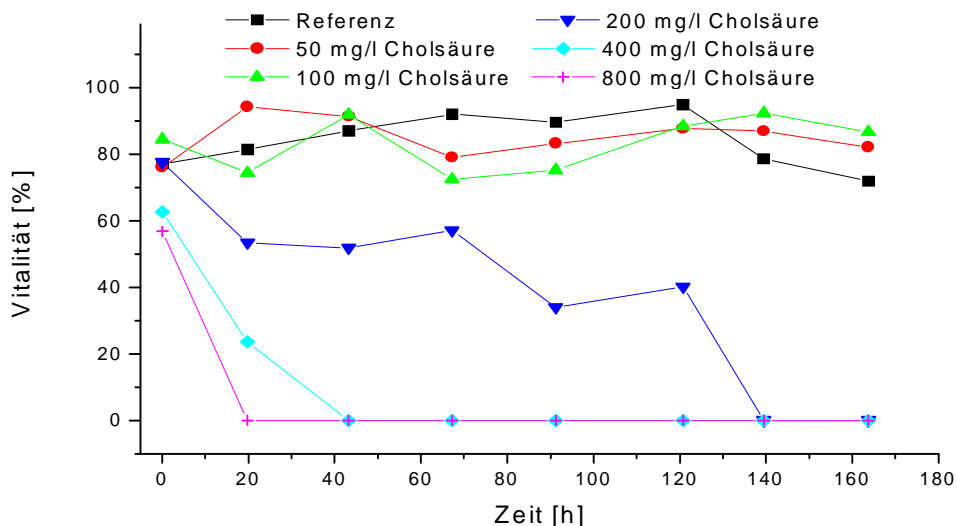


Abb. 3.15 Vitalität im ersten Cholsäure-Toxizitätstest

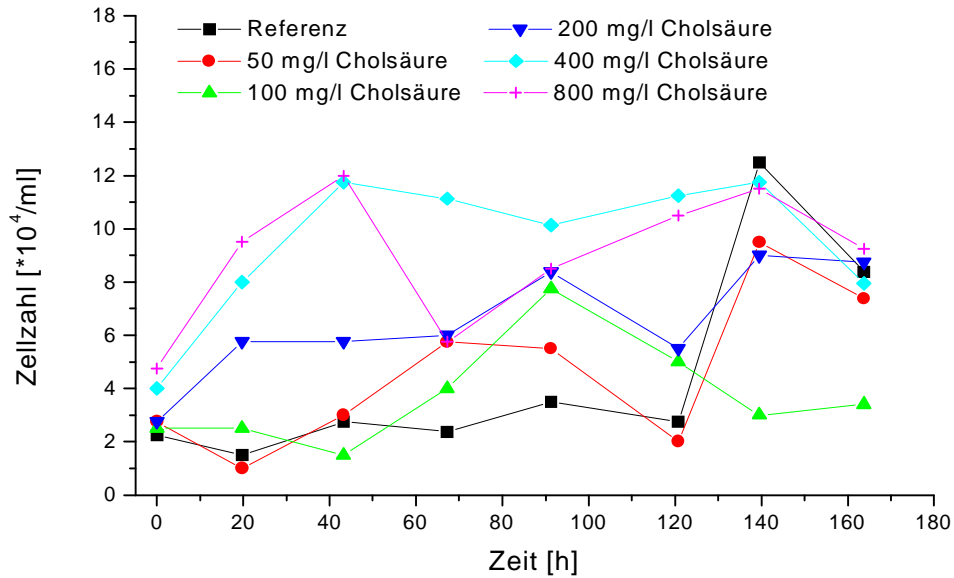


Abb. 3.16 Totzellzahl im ersten Cholsäure-Toxizitätstest

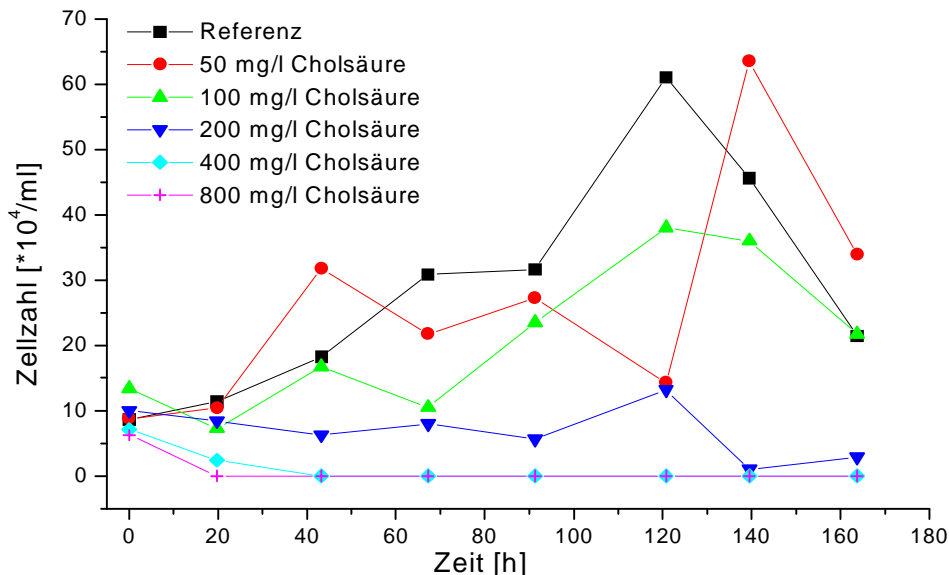


Abb. 3.17 Lebendzellzahl im ersten Cholsäure-Toxizitätstest

Die Verläufe der Lebendzellzahlen bestätigen die Annahme, dass Cholsäurekonzentrationen über 200 mg/l einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum haben (vgl. Abb. 3.17). Die Lebendzellzahlen dieser Kulturen sinken während der Kultivierung von $10 \cdot 10^4$ auf $0 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter ab. Hingegen steigen die Lebendzellzahlen der Kulturen mit einer Konzentration ≤ 100 mg/l auf bis zu $34 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter an.

Aus den gewonnenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass eine Cholsäurekonzentration über 200 mg/l das Zellwachstum negativ beeinflusst. Inwieweit dies auch auf die verwendeten Konzentrationen von 50 mg/l und 100 mg/l zutrifft wird in einem zweiten Toxizitätstest untersucht.

In diesem werden Konzentrationen zwischen 25 und 150 mg/l eingestellt. Angesichts des Verlaufes der Lebendzellzahl (vgl. Abb. 3.19) und der Vitalität

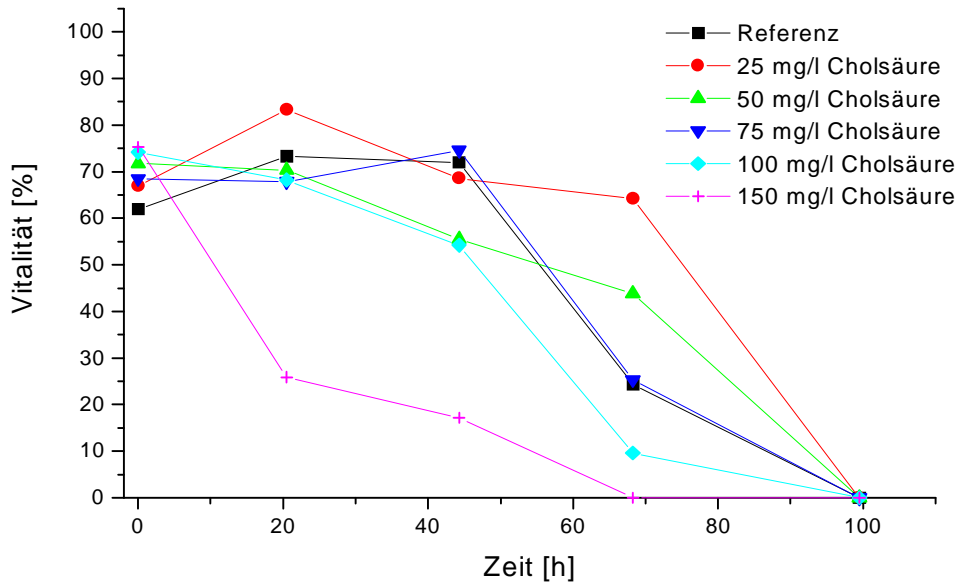


Abb. 3.18 Vitalität im zweiten Cholsäure-Toxizitätstest

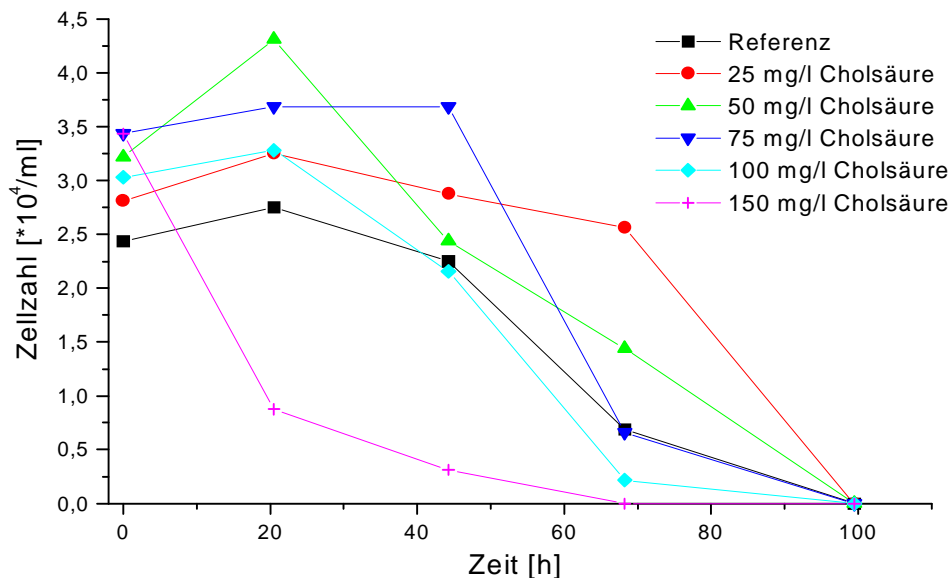


Abb. 3.19 Lebendzellzahl im zweiten Cholsäure-Toxizitätstest

(vgl. Abb. 3.18) wird auf einen negativen Einfluss bei einer Cholsäure-Konzentration von 150 mg/l geschlossen. Die Lebendzellzahl und die Vitalität sinken im Beobachtungszeitraum auf den Wert Null ab. Dagegen kann der Verlauf der niedriger konzentrierten Cholsäure-Kulturen nicht eindeutig von denen der Referenz unterschieden werden.

Die Totzellzahlen (vgl. Abb. 3.20) können nicht für eine weitere Bestimmung herangezogen werden, da sie sich um maximal $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter unterscheiden und damit im Bereich der normalen Abweichung liegen. Um festzustellen, ob geringere Konzentrationen Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Zellen haben werden die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate in die Beurteilung miteinbezogen. Der Verlauf der Glukoseverbrauchsrate (vgl. Abb. 3.21) zeigt eine Ähnlichkeit zwischen der Referenz und den niedrigsten Cholsäure-

Konzentrationen von 25 und 50 mg/l. Die höher konzentrierten Kulturen weisen zum Ende ihrer Kultivierung eine stark erhöhte Glukoseverbrauchsrate auf. Bei der Laktatproduktionsrate sind die Cholsäure-Konzentrationen bis 75 mg/l geringer als die Referenz (vgl. Abb. 3.22). Die Produktionsraten der höheren Cholesterin-Kulturen sind gegenüber der Referenz erhöht

Zusammenfassend können folgende Aussagen über die getesteten Konzentrationen im Cholsäure-Toxizitätstest getroffen werden. Konzentrationen über 150 mg/l sind eindeutig zellschädigend und daher zu vermeiden. Im Konzentrationsbereich zwischen 50 mg/l und 100 mg/l treten Abweichungen zur Referenzkultur auf. Konzentrationen unter 50 mg/l sind nicht zelltoxisch und können demzufolge in Kultivierungen eingesetzt werden.

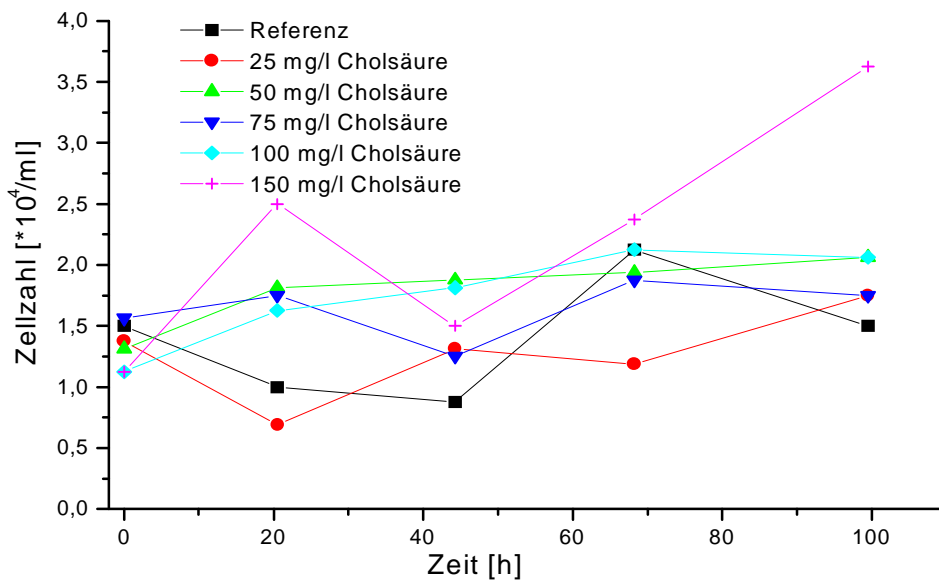


Abb.3.20 Totzellzahl im zweiten Cholsäure-Toxizitätstest

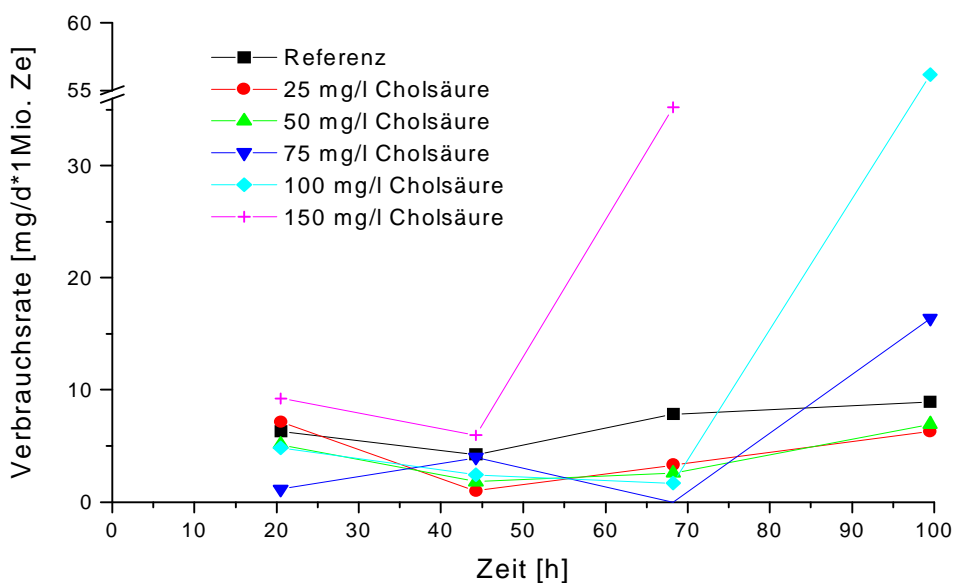


Abb.3.21 Glukoseverbrauchsrate im zweiten Cholsäure-Toxizitätstest

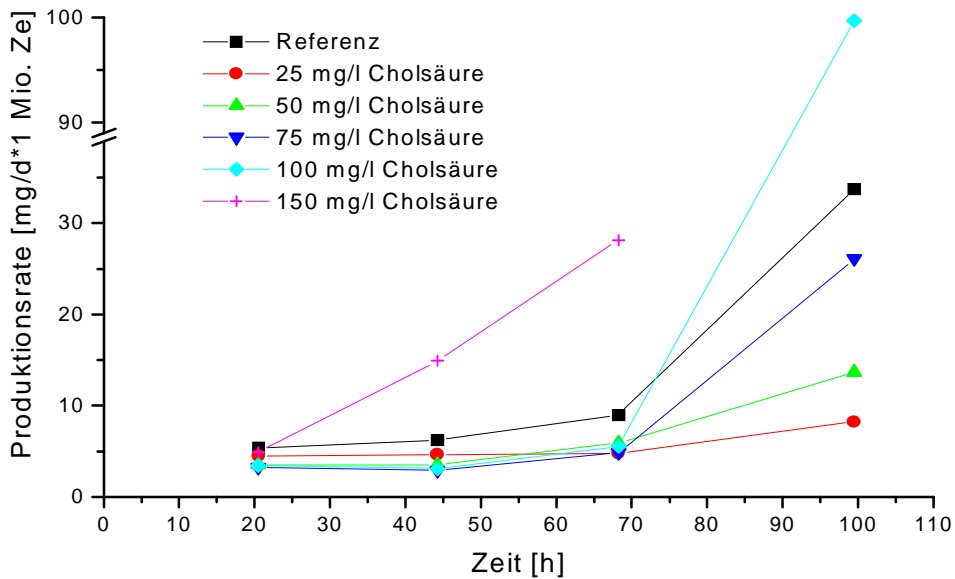


Abb.3.22 Laktatproduktionsrate im zweiten Cholsäure-Toxizitätstest

Lithocholsäure wird in Ethanol gelöst, da es in wässrigen Medien gänzlich unlöslich ist. Es wird eine Stammlösung von 10 g/l hergestellt. In einem ersten Toxizitätstest wird sie den Kulturen im Bereich von 25 bis 200 mg/l zugesetzt. Dieser Konzentrationsbereich erweist sich nach 20 Stunden Kultivierungsdauer bereits als toxisch (Daten nicht angegeben). Der zweite Test umschließt den Bereich von 0,5 bis 5 mg/l Lithocholsäure. Auch hier zeigt sich bereits nach 20 Stunden eine zellschädigende Wirkung der Konzentration von 2,5 und 5 mg/l (Daten nicht angegeben).

Die Konzentrationen von 0,5 und 1 mg/l lassen nach längerer Kultivierungsdauer eine von der Konzentration abhängige, zellschädigende Wirkung erkennen (vgl. Abb. 3.23). So sinkt die Lebendzellzahl in der Kultur mit 1 mg/l Lithocholsäure innerhalb

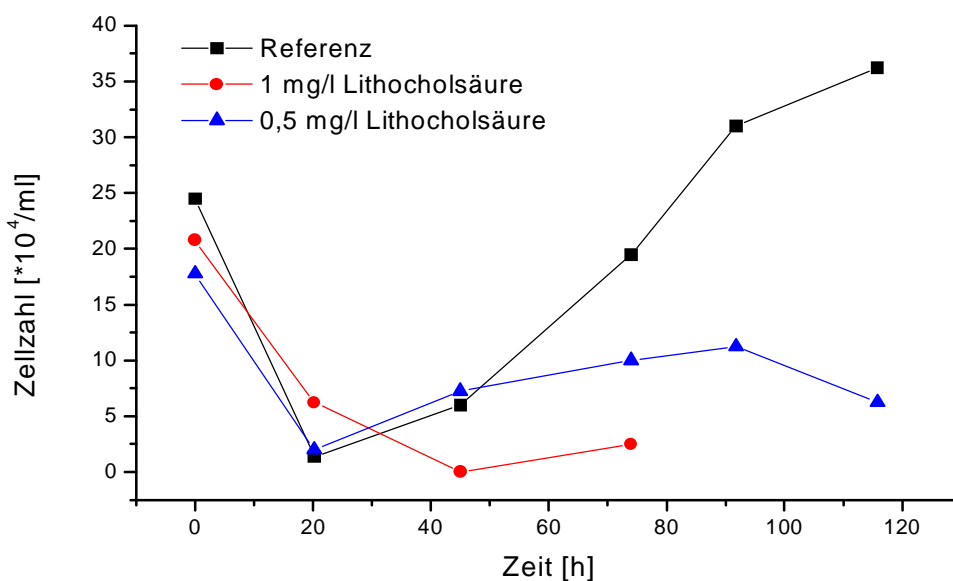


Abb. 3.20 Lebendzellzahl im zweiten Lithocholsäure-Toxizitätstest

von 45 Stunden auf Null Zellen pro Milliliter. Die Kultur mit einer Konzentration von 0,5 mg/l Lithocholsäure ist in ihrem Wachstum gehemmt. Die maximale Zellzahl mit $11 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter wird nach 90 Stunden erreicht. Dieser Wert beträgt ein Drittel der Lebendzellzahl der Referenz zum selben Zeitpunkt.

Für die weitere Kultivierung und für die nachfolgenden Scherstressexperimente wird auf den Einsatz von Lithocholsäure aufgrund der schon bei geringer Konzentration toxischen Eigenschaften in verzichtet.

Deoxycholsäure wird aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in 0,2 M NaOH gelöst. Die den substituierten Kulturen entsprechenden Referenzen werden mit einer äquivalenten Konzentration an 0,2 M NaOH versetzt. Mit der Stammlösung von 5 g/l werden Konzentrationen im Bereich von 4 bis 80 mg/l eingestellt. Dabei erweisen sich die Konzentrationen von 40 und 80 mg/l bereits nach 47 Stunden als zelltoxisch (Daten nicht angegeben). Zu diesem Zeitpunkt sind keine lebenden Zellen mehr in der Kultur vorhanden. Eine Beeinträchtigung des Zellwachstums lässt sich bei den Konzentrationen von 10 und 20 mg/l erkennen (vgl. Abb. 3.21). Die Zellzahlen sind in der 100. Stunde um $12 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter bei 20 mg/l und um $9 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter bei 10 mg/l geringer als die entsprechende Referenz. Lediglich bei 4 mg/l treten keine Unterschiede zur Referenz auf. Dieses Verhalten findet sich im Vitalitätsverlauf bestätigt (vgl. Abb. 3.22). Die Vitalität der höher konzentrierten Kulturen ist in der 60. Stunde auf 50 % abgesunken, während die Referenzen noch eine Vitalität von 70 % besitzen. Dagegen ähnelt die Vitalität der Kultur mit 4 mg/l der Vitalität ihrer entsprechenden Referenz.

Aufgrund der bei Konzentrationen über 10 mg/l festgestellten wachstumshemmenden Eigenschaften werden in den nachfolgenden Kultivierungen und Scherstressversuchen Konzentrationen bis 10 mg/l Deoxycholsäure eingesetzt, um so negativen Einflüssen durch Deoxycholsäure auf die Zellen vorzubeugen.

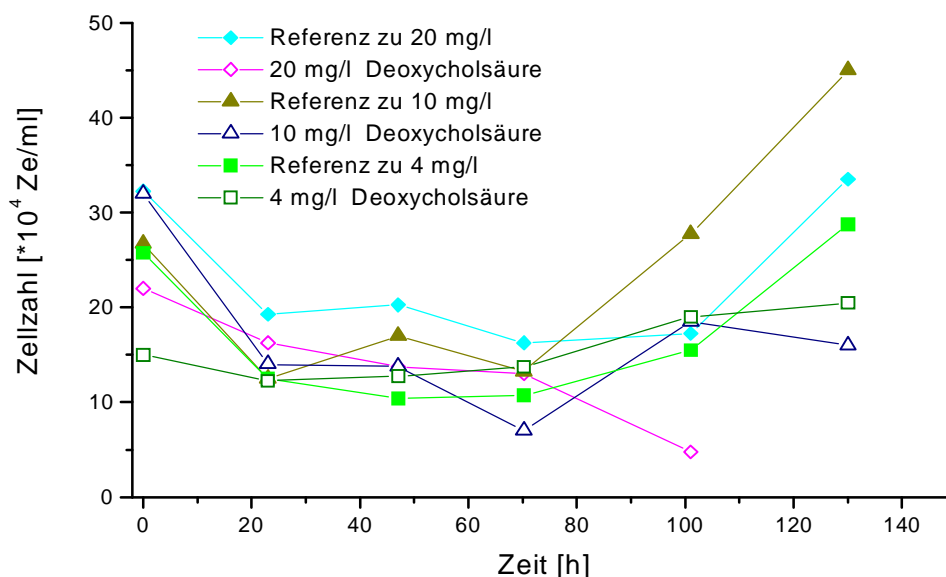


Abb. 3.21 Lebendzellzahl im Deoxycholsäure-Toxizitätstest

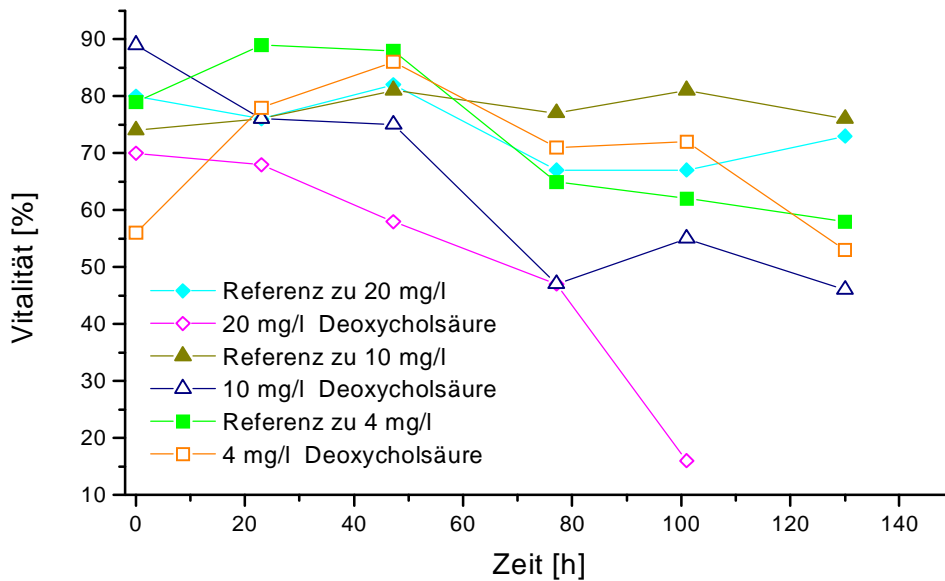


Abb. 3.22 Vitalität im Deoxycholsäure-Toxizitätstest

3.1.4 Gruppe III: Phosphatidylcholin, Testosteron, Retinol

Phosphatidylcholin wird in EtOH gelöst, da es hydrophob ist. Mit einer Stammlösung von 50 g/l werden Konzentrationen zwischen 5 und 100 mg/l eingestellt. Daraus resultieren EtOH-Konzentrationen zwischen 0,005 und 0,3 %, die, wie im Toxizitätstest mit Ethanol festgestellt (s. dort), keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum haben.

Der Verlauf der einzelnen Lebendzellzahlen in Abb. 3.26 zeigt eine Abnahme der Lebendzellzahl der mit 100 mg/l Phosphatidylcholin versetzten Kultur. In der 73. Stunde ist sie um 54 % geringer als zu Beginn der Kultivierung. Die Lebendzellzahl sinkt bis zur 120. Stunde auf 8 % der Animpfdichte. Die Lebendzellzahlen

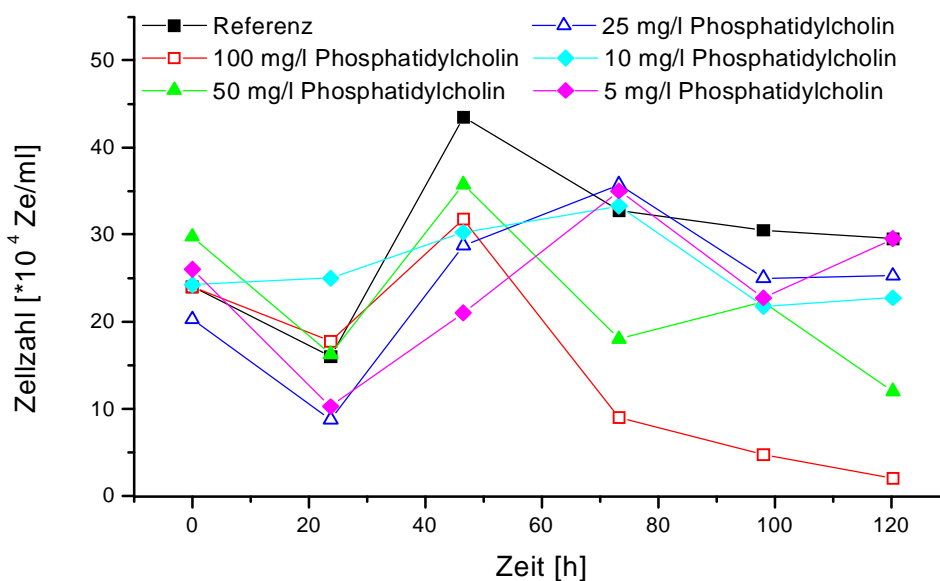


Abb. 3.26 Lebendzellzahl im Phosphatidylcholin-Toxizitätstest

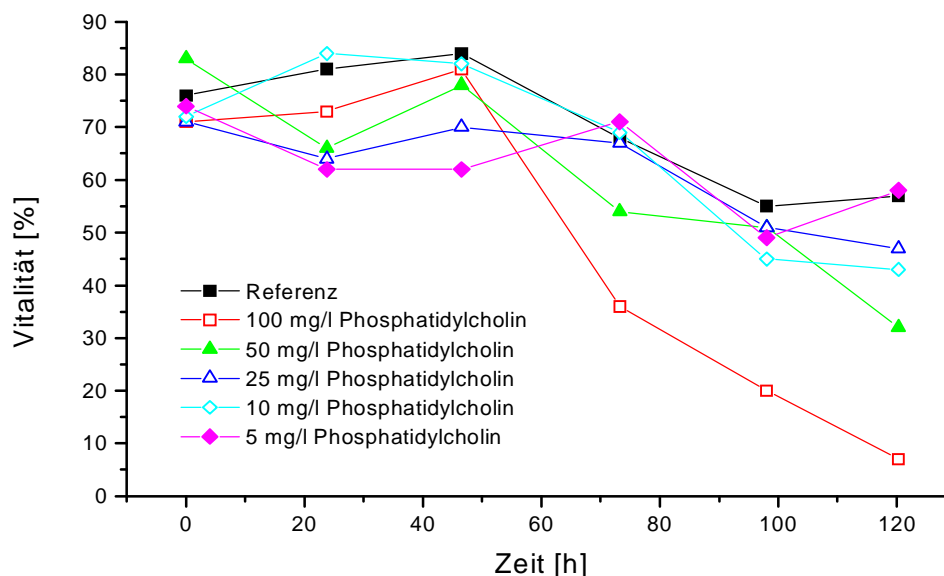


Abb. 3.27 Vitalität im Phosphatidylcholin-Toxizitätstest

der mit 50 mg/l Phosphatidylcholin versetzten Kultur betragen in der 73. Stunde 60 % und in der 120. Stunde 40 % der Animpfdichte. Damit liegen die Lebendzellzahlen dieser Kulturen unter den Werten der Referenz. Die zugesetzten Konzentrationen beeinflussen folglich die Lebendzellzahl.

Bei der Betrachtung des Vitalitätsverlaufs (vgl. Abb. 3.27) ist eine Vitalitätsabnahme der Kultur mit 100 mg/l nach der 46. Stunde zu erkennen. Der Vitalitätsverlust der Kultur mit 50 mg/l ist bis zur 100. Stunde dem der Referenz vergleichbar, erst nach der 120. Stunde ist die Differenz größer als 20 %.

Für die nachfolgenden Kultivierungen werden anhand der vorliegenden Ergebnisse Konzentrationen bis 50 mg/l eingesetzt. So wird mit höchstmöglichen Phosphatidylcholin-Konzentrationen und dem damit erstrebten Scherstresseinfluss eine geringe bzw. keine wachstumshemmende Wirkung auf die Zellen verbunden.

Testosteron liegt als wasserlöslicher β -Cyclodextrin-Komplex vor. Mit einer Stammlösung von 5 g/l in Medium werden Konzentrationen von 2,5 bis 150 mg/l eingestellt.

In Abb. 3.28 zeigen die Lebendzellzahlen keine ausschlaggebenden Unterschiede bei den substituierten Kulturen und der Referenz. Ebenso kann keine klare Abhängigkeit der Testosteron-Konzentration in Bezug auf eine wachstumsbeeinflussende Wirkung auf die Zellen festgestellt werden. Die Lebendzellzahlen der Konzentrationen von 2,5 mg/l und 150 mg/l sind mit denen der Referenz vergleichbar. Sie liegen in der 69. Stunde um maximal 41 % unter der Referenz. In der 69. Stunde befindet sich ein Maximum der Lebendzellzahlen. Werden die Glukoseverbrauchsdaten (vgl. Abb. 3.29) näher betrachtet, ergeben sich keine Hinweise in Bezug auf eine negative Wirkung der verwendeten höheren Testosteron-Konzentrationen.

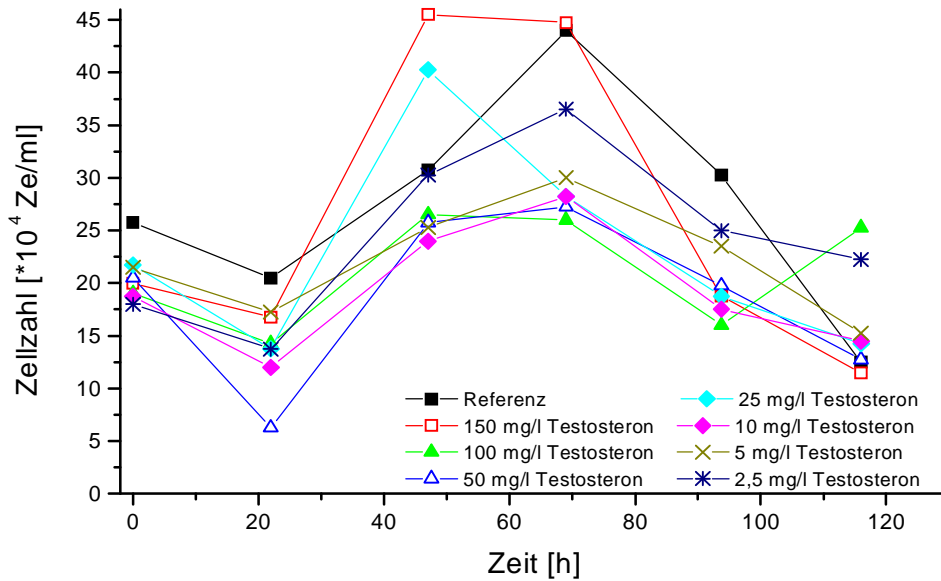


Abb. 3.28 Lebendzellzahl im Testosteron-Toxizitätstest

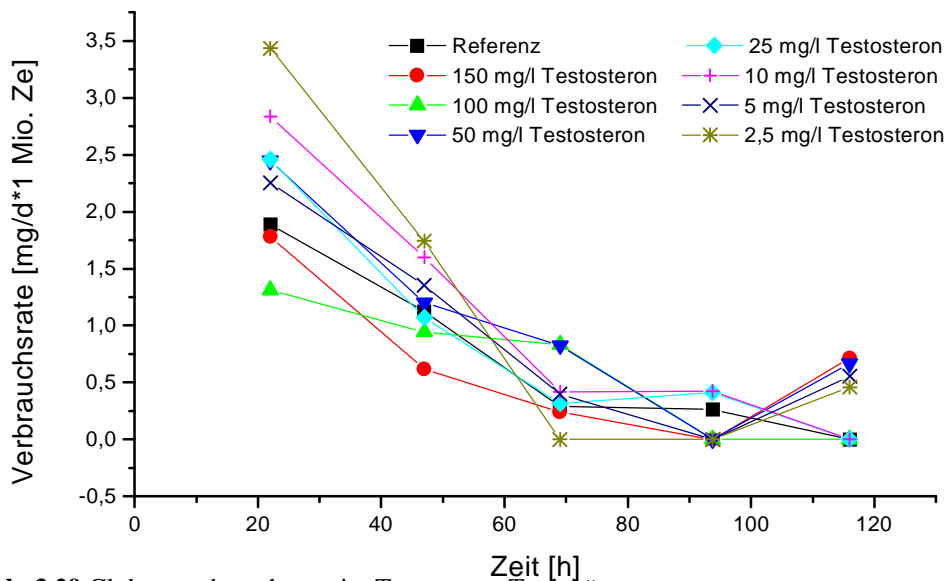


Abb. 3.29 Glukoseverbrauchsrate im Testosteron-Toxizitätstest

Die Verbrauchsrate der Kulturen mit den Testosteron-Konzentrationen von 100 und 150 mg/l ist gegenüber der Referenz in den ersten 47 Stunden niedriger. Es ist eine veränderte Stoffwechselaktivität der Zellen mit einer besseren Glukoseausnutzung denkbar. Eine eindeutige Zellschädigung ist nicht zu erkennen. Aus den Daten der Gesamt- sowie der Totzellzahl und der Vitalität der Kulturen ergeben sich keine neuen Erkenntnisse zur Zellschädigung im Versuchszeitraum. Aus diesem Grund werden für die geplanten Kultivierungen die Konzentrationen bis 100 mg/l eingesetzt, um für den zu untersuchenden Scherstresseinfluss auf die Zellen eine hohe Effizienz zu erreichen. Gleichzeitig soll hiermit ein negativer Einfluss auf das Zellwachstum ausgeschlossen werden.

Retinol wird wegen seiner Wasserunlöslichkeit in EtOH aufgelöst. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 15,9 g/l. Der zu untersuchende Konzentrationsbereich wird zwischen 50 und 300 mg/l festgelegt. Dies entspricht einem Konzentrationsbereich an EtOH von 0,31 bis 1,9 %. Um einen Einfluss des EtOHs auszuschließen, wird für jede Retinol-Kultur eine Referenz mit der gleichen EtOH-Konzentration angesetzt. Wie anhand der Lebendzellzahlen in Abb. 3.30 a und b zu erkennen ist, wirken die eingesetzten Konzentrationen negativ auf das Zellwachstum und führen bei Konzentrationen über 98 mg/l zum Zellsterben in den Kulturen innerhalb der ersten 22 Stunden. In den Kulturen ≥ 98 mg/l hat die EtOH-Konzentration Anteil am Zellsterben. Dies lässt sich den zugehörigen Referenzen mit EtOH-Konzentrationen $\geq 0,62$ % entnehmen.

Im zweiten Toxizitätstest wird der Konzentrationsbereich zwischen 20 und 100 mg/l untersucht. Hier zeigt sich bei den Lebendzellzahlen (vgl. Abb. 3.31 a u. b) eine gegenüber dem vorhergehenden Toxizitätstest geringere Abnahme der Zellzahl bei den Kulturen mit Konzentrationen über 33 mg/l. Die Lebendzellzahl der Kultur mit der geringsten Retinol-Konzentration nimmt nach der Lag-Phase wieder zu, erreicht die Zellzahlen der Referenz aber nicht. In der Kultur mit 100 mg/l ist die EtOH-Konzentration ein weiterer die Zellen negativ beeinflussender Faktor, wie die Lebend

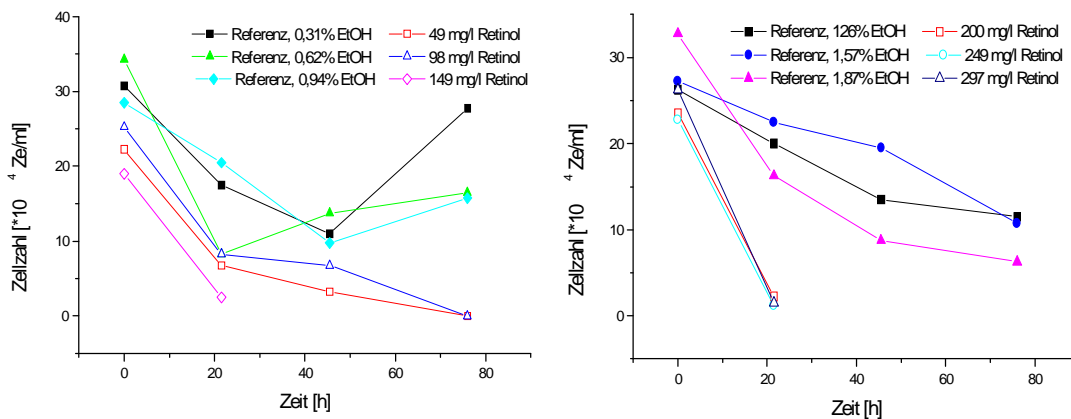


Abb. 3.30 a u. b Lebendzellzahl im ersten Retinol-Toxizitätstest

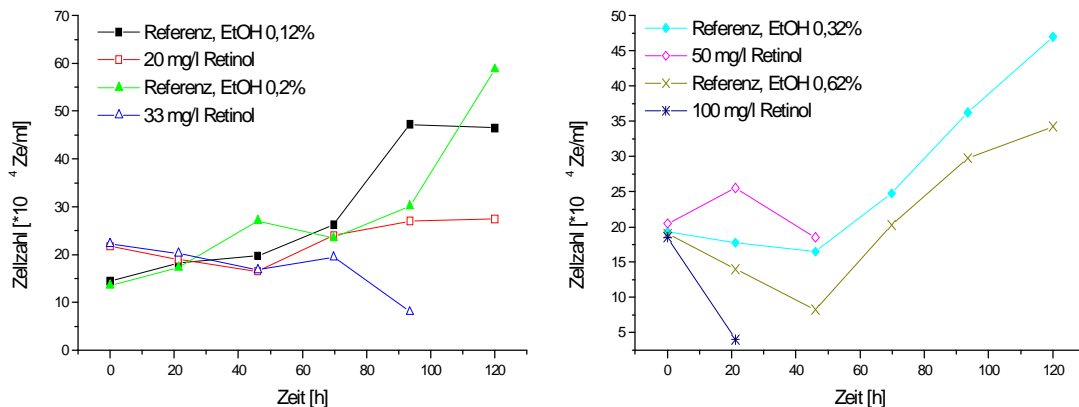


Abb. 3.31 a u. b Lebendzellzahl im zweiten Retinol-Toxizitätstest

zellzahlen der zugehörigen Referenz erkennen lassen.

Um bei den nachfolgenden Versuchen negative Auswirkungen auf das Zellwachstum auszuschließen, werden die Retinol-Konzentrationen kleiner als 20 mg/l gewählt. Es werden sicherheitshalber nur Konzentrationen bis 10 mg/l eingesetzt, um negativen Einflüssen des Retinols vorzubeugen.

3.1.5 Gruppe IV: β -Cyclodextrin, Methyl-Cyclodextrin

β -Cyclodextrin (β -CD) wird in 1 M NaOH gelöst, weil die Löslichkeit in Wasser zu gering ist. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 50 g/l. Die pH-Änderung, die durch die Zugabe der Stammlösung zu den Kulturen erfolgt, wird durch eine Zugabe des gleichen Volumens einer 1 M HCl ausgeglichen.

Für den Toxizitätstest werden Konzentrationen zwischen 50 und 200 mg/l eingestellt. Wie aus Abb. 3.32 und Abb. 3.33 ersichtlich ist, unterscheiden sich die mit β -Cyclodextrin versetzten Kulturen in ihrer Lebendzellzahl und ihrer Vitalität nicht von der Referenz. Ebenso ist die Glukoseverbrauchsrate der Kulturen im Versuchsverlauf vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von β -Cyclodextrin hat demzufolge keinerlei Einfluss auf das Zellwachstum und den Zellstoffwechsel. Eine toxische Konzentrationsgrenze ist nicht festzustellen.

Für die nachfolgenden Experimente werden Konzentrationen bis 100 mg/l eingesetzt, um eine große Wirkung auf die Scherstressempfindlichkeit der Zellen zu erzielen. Der gewählte Konzentrationsbereich ist mit den Bereichen der anderen verwendeten Substanzen vergleichbar.

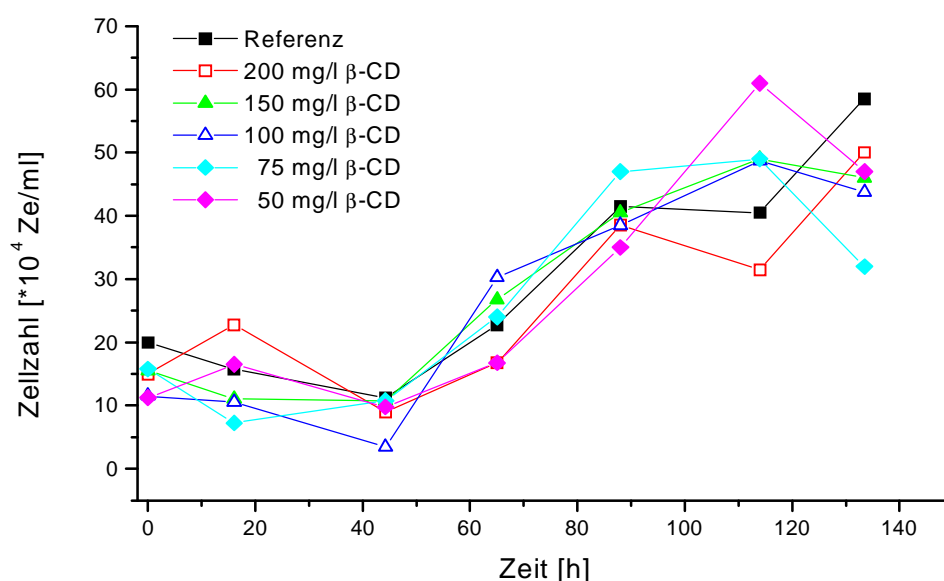


Abb. 3.32 Lebendzellzahl im β -Cyclodextrin-Toxizitätstest

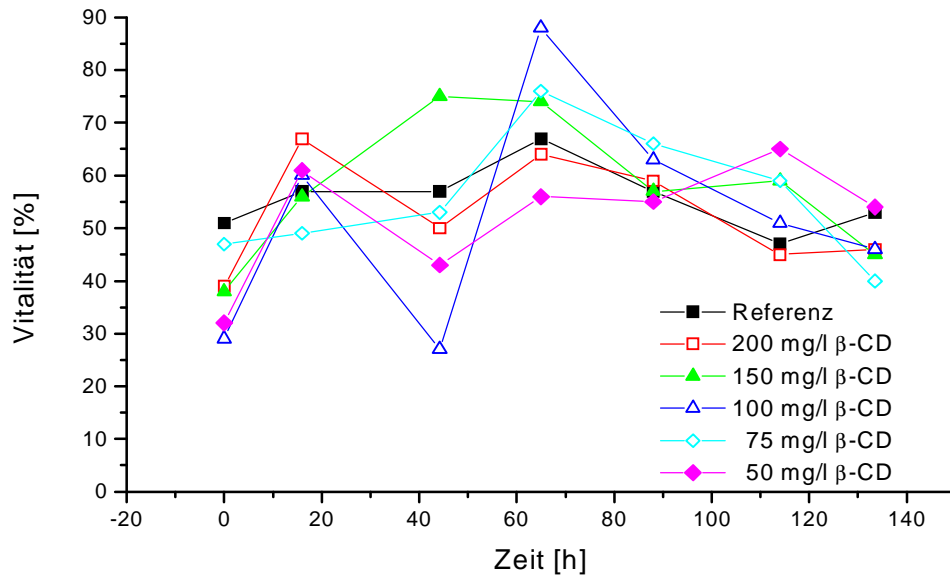


Abb. 3.33 Vitalität im β -Cyclodextrin-Toxizitätstest

Methyl-Cyclodextrin wird aufgrund seiner Löslichkeit in wässrigen Medien in Medium gelöst. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 50 g/l, wie die von β -Cyclodextrin. Es werden im Toxizitätstest Konzentrationen zwischen 50 und 200 mg/l eingestellt.

Die Auswirkungen der Methyl-Cyclodextrin Zugabe auf die Zellen sind äquivalent mit denen des β -Cyclodextrins. Das Zellwachstum wird nicht beeinträchtigt, wie an den Lebendzellzahlen zu erkennen ist (vgl. Abb. 3.34). Bei Betrachtung der Glukoseverbrauchsraten (vgl. Abb. 3.35) ergeben sich vor allem bei den geringeren Konzentrationen höhere Raten in der 45. und 65. Stunde. Zu diesen Zeitpunkten ist die Lebendzellzahl der niedriger konzentrierten Kulturen geringer. Ein Unterschied während der gesamten Kultivierung ist nicht ersichtlich. Eine toxische Konzentrationsgrenze kann nicht ermittelt werden

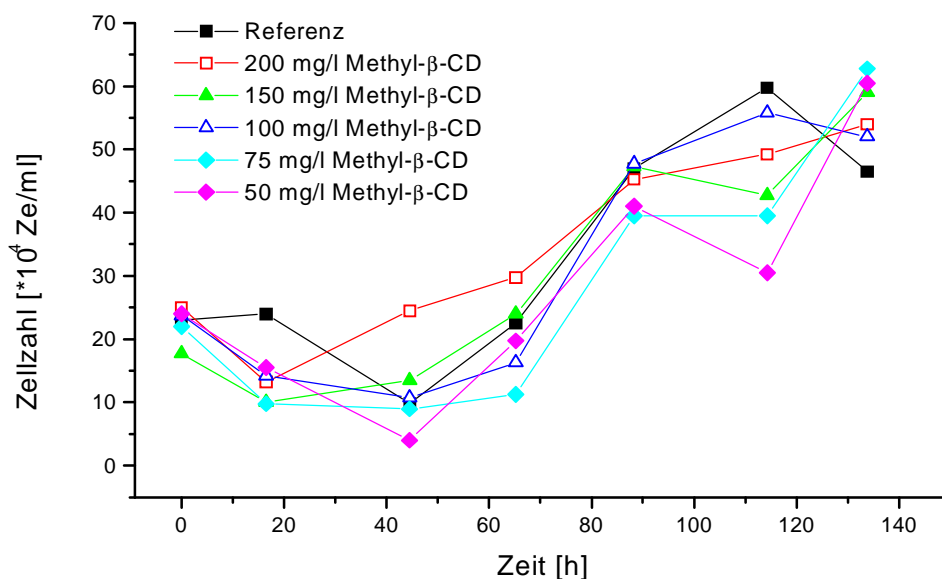


Abb. 3.34 Lebendzellzahl im Methyl-Cyclodextrin-Toxizitätstest

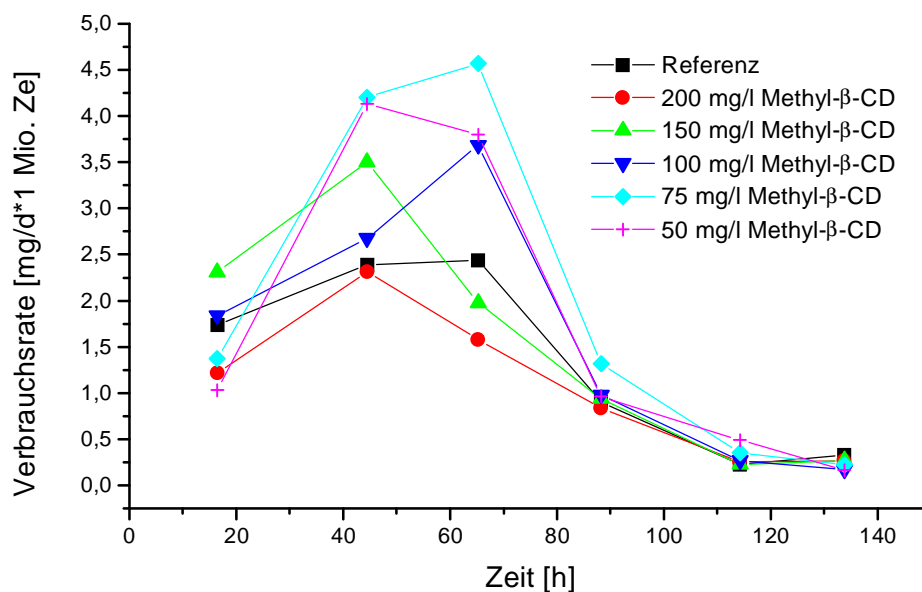


Abb. 3.35 Glukoseverbrauchsrate im Methyl-Cyclodextrin-Toxizitätstest

Die gleichen Gründe wie beim β -Cyclodextrin sprechen für den Einsatz in den nachfolgenden Kultivierungen und Scherstressversuchen in einem Konzentrationsbereich bis 100 mg/l.

3.1.6 Fazit der Toxizitätstests

Der geeignete Konzentrationsbereich der einzelnen Additive ist sehr unterschiedlich. Dabei gibt es selbst zwischen so ähnlichen Substanzen wie Cholsäure und Lithocholsäure große Differenzen. Auch spielt das verwendete Lösungsmittel eine nicht untergeordnete Rolle in der Auswahl des Konzentrationsbereichs. Die Konzentrationsbereiche werden hier zusammengefasst:

- Cholesterin bis 125 mg/l, löslich in Medium
- Ergosterin bis 20 mg/l, löslich in EtOH
- Cholsäure bis 50 mg/l, löslich in Medium
- Lithocholsäure nicht einsetzbar, die toxische Grenze liegt unter 0,5 mg/l
- Deoxycholsäure bis 10 mg/l, löslich in 0,2 M NaOH
- Phosphatidylcholin bis 50 mg/l, löslich in EtOH
- Testosteron bis 100 mg/l, löslich in Medium
- Retinol bis 5 mg/l, löslich in EtOH
- β -Cyclodextrin bis 100 mg/l, löslich in 1 M NaOH
- Methyl-Cyclodextrin bis 100 mg/l, löslich in Medium

3.2 Scherstressversuche

Die Scherstressversuche werden in vier Kategorien unterteilt. Zum einen werden sie nach ihrer Dauer in kurze (drei Stunden) und lange (24 Stunden) Experimente gegliedert. Die beiden Kategorien werden in diesem Abschnitt als erstes behandelt. Zum anderen werden sie in Kombinationsversuche, in denen zwei Additive den Kulturen kombiniert zugesetzt werden und in Temperaturversuche, für die die Temperatur von 37 °C auf 31 °C abgesenkt wird, unterteilt. Diese Versuche werden im zweiten und dritten Abschnitt dieses Kapitels behandelt. Die Abschnitte sind nach Gruppen gegliedert.

3.2.1 Kurz- und Langzeit-Scherstressexperimente

3.2.1.1 Gruppe I: Cholesterin und Ergosterin

Für eine Reihe kurzer **Cholesterin**-Scherexperimente werden folgende Kulturen angesetzt: Referenz, Kultur mit 100 mg/l Cholesterin (Kultur 100), Kultur mit 125 mg/l Cholesterin (Kultur 125). Es werden drei Kultivierungsreihen mit je vier Scherexperimenten durchgeführt. Stellvertretend für die drei Kultivierungen werden die Kultivierungsdaten der Kultur C07 dargestellt, da keine wesentlichen Unterschiede zwischen den untersuchten Kulturen bestehen.

Die Analyse der Cholesterin-Konzentration in den Kulturen ergibt eine durchschnittliche Konzentration von 5 mg/l in der Referenz, von 70 mg/l in Kultur 100 und von 90 mg/l in Kultur 125, die während der Kultivierung konstant nachzuweisen ist

Wie aus Abb. 3.36 zu entnehmen ist, differieren die Lebendzellzahlen der substituierten Kulturen um 13 bis 58 % im Vergleich zur Referenz. Sie sind aber im Versuchszeitraum mit dieser vergleichbar und erreichen die gleiche maximale Lebend-

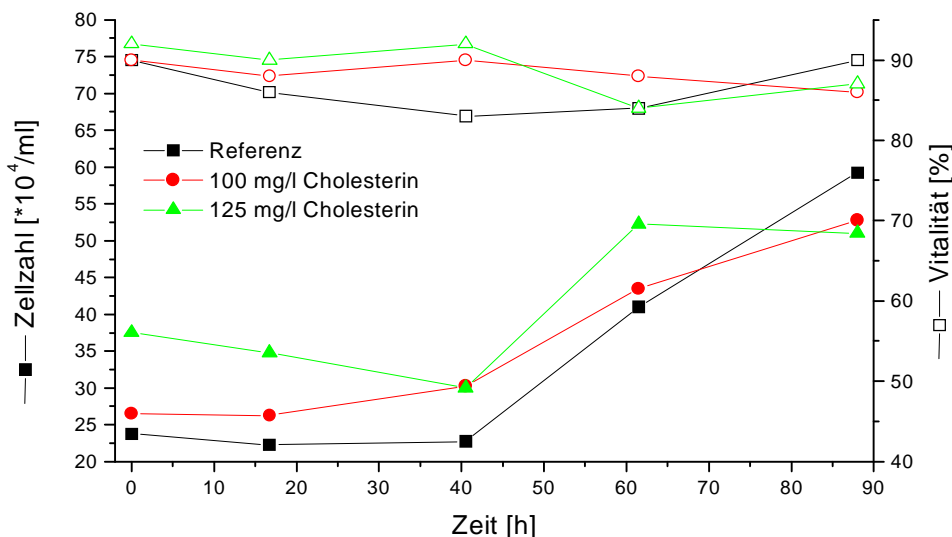


Abb. 3.36 Lebendzellzahl und Vitalität von C07

Zeit [h]	0	17	41	65	88
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze]Referenz	--	0,8	0,8	0,7	0,4
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	0,2	0,4	0,7	0,4
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 125	--	0,4	0,3	0,7	0,9
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	0,6	0,0	1,2	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	0,7	0,4	0,6	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 125	--	0,3	0,3	0,5	0,1

Tab. 3.1 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von C07

zellzahl. In der Vitalität unterscheiden sie sich nur geringfügig (vgl. Abb. 3.36). Die anfängliche Abnahme der Lebendzellzahl in der Kultur 125 könnte mit einem negativen Einfluss der hohen Cholesterin-Konzentration auf die Zellen begründet werden. Aufgrund der Toxizitätstests ist es jedoch auszuschließen. Es ist auch ein Einfluss von zelleigenen Substanzen denkbar, die während des Animpfens freigesetzt werden. Da in dieser Kultur die Animpfdichte um mehr als $10 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter höher ist als die der anderen Kulturen, werden mehr Metabolite freigesetzt, die eine stärkere Abnahme hervorrufen. In den beiden anderen Kulturen ist im gleichen Zeitraum das Wachstum verlangsamt bzw. ebenfalls eine Abnahme zu erkennen, was die Vermutung bestätigt.

Um Auswirkungen der Cholesterin-Zugabe auf den Stoffwechsel überprüfen zu können, werden Glukose- und Laktatkonzentration sowie Cholesterin-, Ammonium-, Protein-, Produkt- und Aminosäuren-Konzentration analysiert und Verbrauchs- und Produktionsraten berechnet.

Die Glukoseverbrauchsraten der substituierten Kulturen sind bis zur 41. Stunde niedriger als die der Referenz (vgl. Tab. 3.1). Die Ausnutzung der Glukose ist gegenüber der Referenz verbessert. Das kann auf vitalere Zellen der Referenz gegenüber zurückgeführt werden. Erst ab der 65. Stunde sind die Raten der Referenz mit denen der Kultur 100 zu vergleichen. Ab diesem Zeitpunkt steigt auch die Vitalität der Referenz

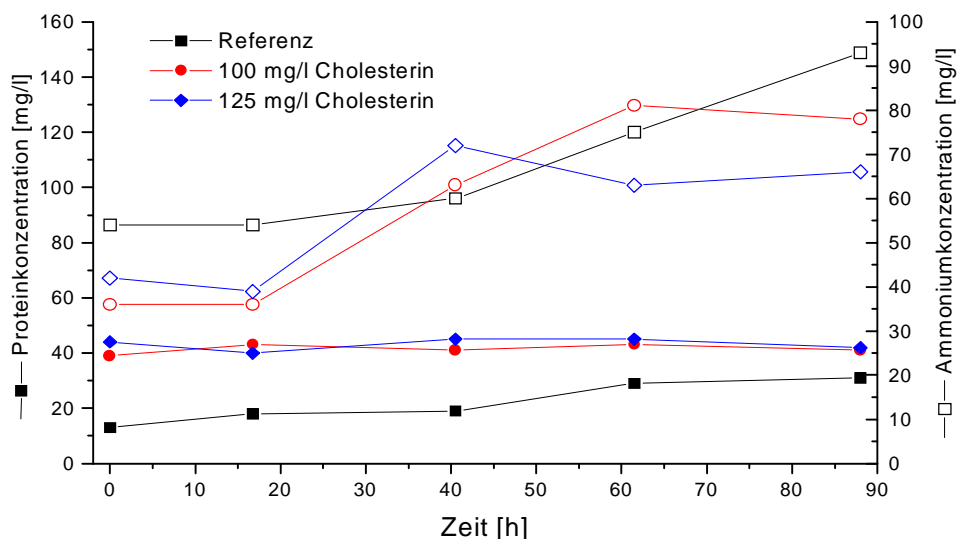


Abb. 3.37 Protein- und Ammoniumkonzentration von C07

Zeit [h]	0	17	41	65	88
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Referenz	--	0	27	54	33
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 100	--	0	97	56	0
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 125	--	0	103	0	5
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Referenz	--	455	175	189	203
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 100	--	627	263	327	190
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 125	--	114	31	312	153

Tab. 3.2 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate von C07

an und unterscheidet sich kaum noch von denen der substituierten Kulturen. Die Verbrauchsrate der Referenz sinkt im Versuchsverlauf, wohingegen die der Kultur 125 steigt.

Die Laktatproduktionsraten der substituierten Kulturen nehmen im Beobachtungszeitraum ab (vgl. Tab. 3.1). Die Produktionsrate der Referenz in der 17. und in der 88. Stunde ist mit der von Kultur 100 vergleichbar. Die Produktionsraten der Kultur 100 sind im Versuchszeitraum geringfügig höher als die von Kultur 125. Die größeren Abweichungen in der 17. und der 88. Stunde korrespondieren mit denen der Glukoseverbrauchsrate. Zu diesen Zeitpunkten ist steht einem geringen Glukoseverbrauch eine erhöhte Laktatproduktion gegenüber. Das heißt, es liegt keine optimale Umsetzung vor, was auf einen gestörten Stoffwechselablauf der Zellen hindeuten kann.

Wird die Proteinkonzentration während der Kultivierung (vgl. Abb. 3.2) betrachtet, fällt eine hohe Konzentration der substituierten Kulturen auf. Da es sich um ein proteinfreies Medium handelt, ist die hohe Konzentration nicht durch Proteine bedingt. Die scheinbare Proteinkonzentration wird durch die Cholesterin-Zugabe verursacht. Die geringe Proteinkonzentration des Referenzwertes und eine Standardreihe von Cholesterin bestätigen diese Annahme (Standardreihe s. Anhang). Den Proteingehalt auf anderem Wege zu bestimmen scheitert zum einen an der Zusammensetzung des Mediums, welches z.B. durch seine reduzierenden Inhaltsstoffe einen Bicinchoninic Acid (BCA)-Test und durch die vorhandenen K^+ -Ionen einen Lowry-Test unmöglich macht. Zum anderen kann sowohl im Photometer bei 280 nm als auch im Fluorometer bei einer Extinktion von 355 nm und einer Emission von 590 nm aufgrund von Schwankungen bis zu 10 % keine exakte Kalibrierung im Bereich bis 25 μg Protein pro Milliliter stattfinden. Verschiedene Ausfällungsmethoden sind wirkungslos, da die störende Substanz ebenfalls ausgefällt wird. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung der Proteine besteht darin, die störende Substanz durch eine Ultrazentrifugation mit 5 kDa-Grenze auszuschließen. Diese Methode wird aufgrund des unverhältnismäßigen Aufwands von Kosten und Zeit nicht angewandt. Durch eine Analyse der Proteinkonzentration können in diesem Fall keine Hinweise auf eine Stoffwechseleinwirkung der Cholesterin-Konzentrationen gewonnen werden.

Die Ammoniumkonzentration (vgl. Abb. 3.37) am Ende der Kultivierung liegt bei der Referenz bei 93 mg/l. Die Konzentrationen der substituierten Kulturen liegen mit 78 mg/l für Kultur 100 und 66 mg/l für Kultur 125 darunter. Die beiden substituierten

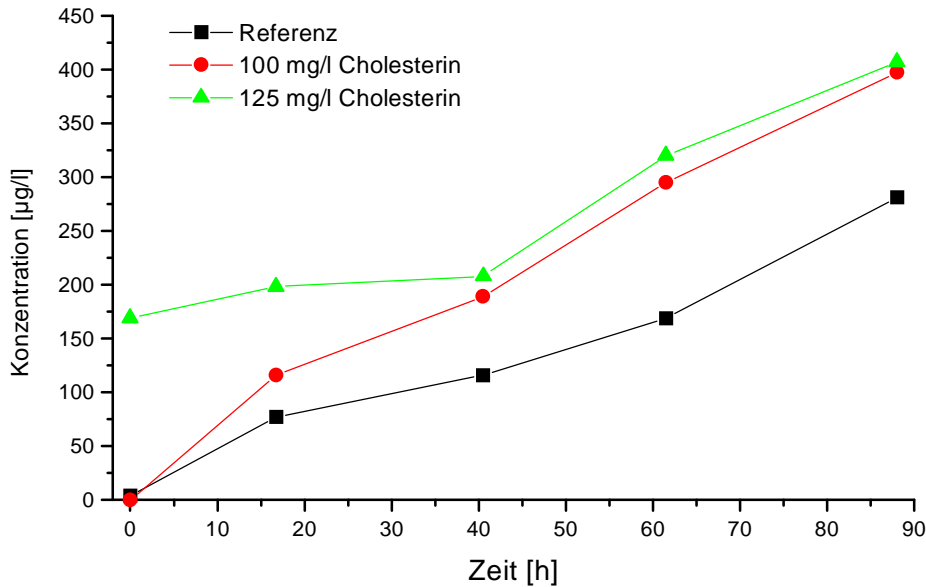


Abb. 3.38 t-PA-Konzentration von C07

Kulturen produzieren eine geringere Menge des toxischen Metaboliten. Dies bedeutet einen Vorteil für die Cholesterin-Kulturen, da Ammonium ab einer Konzentration von 36 bis 75 mg/l wachstumshemmend wirkt, bzw. ab 150 mg/l toxisch ist. Die hohe Anfangskonzentration des Ammonium ist eine Erklärung für die Lag-Phase der Kulturen bis zur 41. Stunde. Die Ammoniumproduktionsrate der substituierten Kulturen ist in den letzten 48. Stunden der Kultivierung kleiner gleich der Referenz (vgl. Tab. 3.2). Definitionsgemäß werden negative Produktionsraten gleich Null gesetzt.

Bei der Betrachtung der t-PA-Produktkonzentration ergeben sich Unterschiede von maximal 170 mg/l t-PA pro Milliliter (vgl. Abb. 3.38). Dabei fällt gleich zu Beginn des Versuches die hohe, bis zur 41. Stunde nur gering ansteigende, t-PA-Konzentration der Kultur 125 auf. Die Konzentrationen der Referenz und der Kultur 100 steigen dagegen konstant während der Kultivierung an. In der Referenz wird im Gegensatz zur Kultur 100 nur eine t-PA-Endkonzentration von 280 µg/l erreicht. Der Endwert der Konzentration beträgt in Kultur 100 410 µg/l bzw. in Kultur 125 400 µg/l. Die substituierten Kulturen sind demnach ab der 41. Stunde vergleichbar. Die hohen und konstanten Anfangskonzentrationen in Kultur 125 sind vermutlich durch die ebenfalls hohen anfänglichen Lebendzellzahlen bedingt. Ab der 41. Stunde ist die Lebendzellzahl mit der von Kultur 100 vergleichbar ebenso wie die t-PA-Konzentration.

Die Produktionsraten des t-PAs der drei Kulturen sind teilweise vergleichbar (vgl. Tab. 3.2). Die Produktionsraten der Kultur 100 liegen über denen der Referenz. Nur in der 88. Stunde sind sie identisch. Bei Kultur 125 sind ebenso wie die Konzentrationen nur die Raten ab der 65. Stunde mit der von Kultur 100 vergleichbar. Die zugefügten Cholesterin-Konzentrationen beeinflussen die t-PA-Produktion demnach, was besonders deutlich in Kultur 100 zu erkennen ist.

In den Konzentrationen der Aminosäuren unterscheiden sich die drei Kulturen nur geringfügig (Daten s. Anhang). Dies ist an der Abnahme der Glutaminkonzentration

am deutlichsten zu erkennen, weil diese Aminosäure in höherer Konzentration als die anderen Aminosäuren vorliegt und im Laufe einer Kultivierung fast vollständig verbraucht wird. Bei allen drei Kulturen ist der wichtige Energielieferant Glutamin in der 80. Stunde fast vollständig (Kultur 100 mit 4 mg/l) bzw. vollständig (Kultur 125 und Referenz) verstoffwechselt. Die Verstoffwechslung der aufgeführten Aminosäuren der Kultur 100 geschieht nicht langsamer, wie es im Vergleich zur Referenz und der Kultur 125 den Anschein hat, sondern ist durch die erhöhten Anfangskonzentrationen bedingt.

Zusammenfassend kann über die Kultivierungen der Cholesterin-Kulturen 100 und 125 gesagt werden, dass sie einen veränderten Glukoseverbrauch haben und eine der Referenz gegenüber konstantere Laktatproduktion aufweisen. Die Ammoniumproduktion ist in den ersten 40 Stunden höher, in den letzten Kultivierungsstunden geringer als die der Referenz. Die Produktion des t-PA ist höher. Die verwendeten Zellen können unter Berücksichtigung ihres Zustandes in den Scherexperimenten verglichen werden.

Als Ergebnis der **Kurzzeit-Scherexperimente** ist vor allem die Überlebensrate R_s von Bedeutung. Das heißt, dass der prozentuale Anteil der lebenden Zellen nach dem Experiment in Bezug auf die Lebendzellzahl zu Beginn ermittelt wird. Ebenso wichtig ist die ermittelte Schubspannung τ , die sich aus der eingestellten Stufe und der am Gerät abzulesenden Digitalanzeige berechnet (s. Kap. 2.4.11).

Zusätzlich zur Überlebensrate und Schubspannung werden Ammonium-, Proteinkonzentration und der relative LDH-Wert für kurze Scherexperimente untersucht. Bei langen Scherversuchen wird außerdem die t-PA-, Aminosäuren- sowie Glukose- und Laktatkonzentration ermittelt. Es werden Produktions- und Verbrauchsdaten bestimmt.

Zu drei Cholesterin-Kultivierungsreihen (C07, C08, C10) werden je vier Scherexperimente durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass R_s und τ innerhalb einer Kultur Abweichungen aufweisen. Um mit den erhaltenen Werten arbeiten zu können, werden zum einen die Extremwerte außen vor gelassen. Zum anderen werden die Werte gemittelt. Anhand der gemittelten Überlebensraten ist zu erkennen (vgl. Tab. 3.3), dass die Lebendzellzahl am Versuchsende der Kulturen 100 und 125 im Durchschnitt um mindestens 20 % höher ist als die der Referenz. Die Zellen aus den mit Cholesterin versetzten Kulturen scheinen scherunempfindlicher zu sein und haben eine größere Überlebenswahrscheinlichkeit. Die Schubspannung (vgl. Tab. 3.3) der Referenz ist identisch mit der von Kultur 100 und um $0,1 \text{ N/m}^2$ größer im Hinblick auf Kultur 125. Die Größe der Schubspannung entspricht der Größe der auf die Zellen wirkenden Kraft. Bei einem definierten Drehmoment sollte keine Änderung der

	Überlebensrate R_s [%]			Schubspannung τ [N/m ²]		
	Referenz	Kultur 100	Kultur 125	Referenz	Kultur 100	Kultur 125
Mittelwert	33	53	58	1,9	1,9	1,8

Tab. 3.3 gemittelte Überlebensrate und Schubspannung von C07, C08 und C10

Schubspannung auftreten. Bei einer genaueren Betrachtung kann festgestellt werden, dass es sich um Abweichungen von 5 % handelt. Diese würden im Rahmen einer Messungengenauigkeit des Geräts liegen. Jedoch kann die geringere Schubspannung auch auf den Zusatz des Cholesterins zurückgeführt werden. Bei einer definierten Energieeinwirkung sind die Zellen so einer verringerten Belastung ausgesetzt. Es fällt auf, dass Referenz und Kultur 100 bei gleicher Schubspannung unterschiedliche Überlebensraten besitzen. Die geringere Überlebensrate der Referenz ist nicht durch eine niedrigere Vitalität bedingt (s. Abb. 3.36). Eventuell kann die anfänglich höhere Ammoniumkonzentration in der Referenz die Zellen als zelltoxischer Metabolit geschwächt haben. Die Konzentration ist gegenüber der Kultur 100 um 26 % und gegenüber Kultur 125 um 50 % erhöht. Dies ist aber unwahrscheinlich, da zum einen dann auch die Überlebensrate gegenüber Kultur 125 um 50 % geringer sein sollte und zum die Ammoniumkonzentration nach der 17. Stunde mit denen der substituierten Kulturen vergleichbar ist. Eine dritte Möglichkeit für die höhere Überlebensrate der Kultur 100 ist der Einfluss des Cholesterins auf die Zellen.

Die beiden substituierten Kulturen besitzen bei einer ähnlichen Schubspannungen auch vergleichbare Überlebensraten. Die höher substituierte Kultur besitzt eine geringfügig höhere Überlebensrate bei um $0,1 \text{ N/m}^2$ kleinerer Schubspannung. Die höheren Überlebensraten können nicht durch eine höhere Vitalität oder anderes Zellwachstum erklärt werden (s. Tab. 3.3), jedoch durch die Zugabe von Cholesterin.

Die gemittelten Werte der Analysen (vgl. Tab. 3.4) lassen für die Referenz eine Abnahme der Totzellzahl um $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter erkennen, während die Totzellzahl in Kultur 100 und 125 um nur $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter abnimmt. Die Lebendzellzahlen nehmen bei allen Kulturen im Versuchszeitraum ab. Die Referenz ist mit $14 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter am stärksten betroffen. In der Kultur mit der höheren Cholesterin-Konzentration wird die Lebendzellzahl der Kultur 125 um $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter weniger dezimiert als in der Kultur 100. Die Abnahme der Gesamtzellzahl in der Referenz ist mit $15 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter fast doppelt so hoch wie in Kultur 100. Angesichts der Lebendzellzahlabnahme sollte eine Totzellzahlzunahme verzeichnet werden können. Die toten Zellen können jedoch durch die Schereinwirkung zerstört werden, so dass sie bei einer Zellzählung nicht erfasst werden können. Die Annahme, dass sich die Zellen auflösen, wird durch die Gesamtzellzahlabnahme

Änderung der/des	Referenz	Kultur 100	Kultur 125
... Totzellzahl [$\cdot 10^4$ Ze/ml]	-2	-1	-1
... Lebendzellzahl [$\cdot 10^4$ Ze/ml]	-14	-12	-10
... Gesamtzellzahl [$\cdot 10^4$ Ze/ml]	-15	-9	-10
... Vitalität [%]	-30	-22	-16
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	5	3	7
... Proteinkonzentration [mg/l]	8	9	14
... relativen LDH-Wertes [U/l]	77	76	69

Tab. 3.4 gemittelte Analysenwerte von C07, C08 und C10

und die Proteinkonzentrationszunahme bestätigt.

Ebenso wie die Lebendzellzahl nimmt die Vitalität in der Referenz stärker ab als in den substituierten Kulturen. Die Änderung liegt 36 bzw. 86 % über den Änderungen der Vitalität der substituierten Kulturen. Die Vitalität der substituierten Kulturen nimmt um maximal 22 % ab. Die Proteinkonzentration am Versuchsende ist bei der Referenz um 8 mg/l gestiegen. Die Konzentrationen der Kultur 100 und 125 sind bei Versuchsende mit 9 bzw. 14 mg/l geringfügig höher als die der Referenz. –Hier können sinnvolle Proteinkonzentrationen gemessen werden, da sich kein Cholesterin im Medium befindet und die Messung in den substituierten Kulturen nicht gestört wird (s. Kap. 2.3).– Die relativen LDH-Werte der substituierten Kulturen liegen geringfügig unter denen der Referenz. Es werden bei den LDH-Messungen keine absoluten Konzentrationen gemessen sondern nur die relativen Änderungen betrachtet.

Die Änderung der Ammoniumkonzentration ist in Referenz und den substituierten vergleichbar. Ein Einfluss des Cholesterins auf diese Änderungen ist nicht erkennbar.

Wird Tab. 3.4 insgesamt betrachtet, bestätigt sie die ermittelten Werte der in Tab. 3.3 aufgeführten Überlebensraten. Die Referenz weist am Versuchsende eine geringere Lebend- und Gesamtzellzahl sowie eine niedrigere Vitalität auf. Auf eine geringere Vitalität der Referenz oder ein anderes Wachstumsverhalten während der Kultivierung können die höheren Änderungen nicht zurückgeführt werden (s. Abb. 3.36). Durch den fehlenden Cholesterin-Zusatz können die Zellen kein zusätzliches Cholesterin in die Zellmembran einlagern. Dadurch hat die Referenz nicht die gleichen Bedingungen wie die substituierten Kulturen und ist folglich schererempfindlicher.

Die Proteinkonzentration ist gegen Ende in der Referenz minimal niedriger und der relative LDH-Wert minimal höher als in den Cholesterin-Kulturen. Bei der Ammoniumkonzentration fehlt eine Tendenz. Die Werte der drei gemessenen Substanzen sind vergleichbar.

Die Zugabe des Cholesterins bewirkt eine Abnahme der Schererempfindlichkeit. Die Zellen sind scherrerresistenter, was sich an den ermittelten Zellzahländerungen feststellen lässt, und haben eine größere Überlebenswahrscheinlichkeit gegenüber der unsubstituierten Referenz. Es ist keine Auswirkung des Cholesterins auf Änderungen der Protein-, und Ammoniumkonzentration sowie auf den relativen LDH-Wert zu erkennen. In der Kultivierung dagegen hat der Cholesterin-Zusatz nur geringe Auswirkungen auf die Ammoniumkonzentration sowie eine vorteilhafte Auswirkung auf die t-PA-Konzentration, da eine größere Menge des Produktes produziert wird. Cholesterin in als scherreduzierendes Additiv in Kultivierungen einsetzbar.

Das Mediumadditiv **Cholesterin** wird in einer weiteren Versuchsreihe abweichend vom im Kapitel Material und Methoden beschriebenen Ablauf eingesetzt. Dabei wird es den Kulturen schon drei Tage vor dem eigentlichen Versuchsstart in den für die Kultivierungsreihe vorgesehenen Cholesterin-Konzentrationen hinzugefügt. Die Versuche tragen in der Versuchsbezeichnung den Buchstaben V. Es werden drei Versuchsreihen durchgeführt. Stellvertretend werden die Daten der Kultivierungsreihe CV01 dargestellt, da sich die Kultivierungsreihen nicht wesentlich unterscheiden.

Die gemessene Cholesterin-Konzentration liegt bei der Referenz im Durchschnitt bei 6 mg/l, in Kultur 100 bei 77 mg/l und in Kultur 125 bei 92 mg/l.

Abbildung 3.39 fasst die Lebendzellzahlen und die Vitalität während der Kultivierungsreihe zusammen. Die Animpfdichten der Kulturen differieren um maximal $7 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Dieser Unterschied entspricht 24 % bezogen auf die Referenz. Die Vitalität unterscheidet sich um maximal 5 %. Durch die unterschiedlichen Vorkulturen ist das Verhalten der Zellen in Bezug auf die Vitalität und das Wachstum verschieden. So sind die Wachstumsphasen der Referenz mit der von Kultur 125 vergleichbar. Beide wachsen langsamer als Kultur 100 und zeigen in den ersten 17 Stunden eine Lebendzellzahlabnahme. Die verschiedenen Vorkulturen können auch für die unterschiedliche Entwicklung der Vitalität verantwortlich sein. Die Referenz, die von Beginn an eine im Rahmen der statistischen Abweichung liegende geringere Vitalität hat, behält die geringere Vitalität während der Kultivierung bei. Die Vitalität der Kultur 100 steigt ab der 17. Stunde stetig. In Kultur 125 fällt die Vitalität bis zum Versuchsende. Die substituierten Kulturen besitzen bis auf eine Ausnahme jeweils höhere Vitalitäten.

Die Glukoseverbrauchsrate der Kulturen unterscheiden sich am ersten Tag mit bis zu $0,3 \text{ mg/d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$ gravierend (vgl. Tab. 3.5). Dies liegt sowohl am unterschiedlichen Wachstum der Zellen (s. Abb. 3.39) als auch an der unterschiedlichen Abnahme der Glukosekonzentration. Das differenzierte Verhalten ist durch die verschiedenen

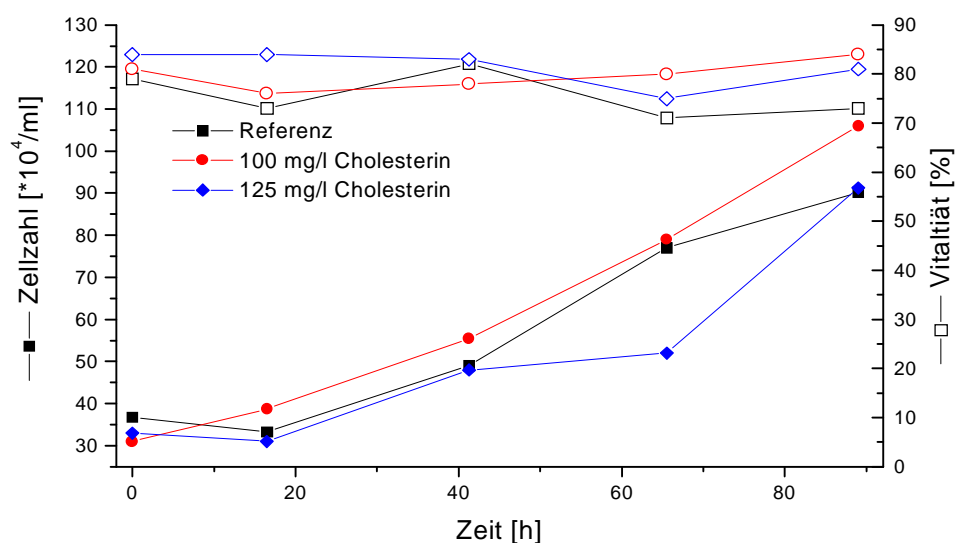


Abb. 3.39 Lebendzellzahl und Vitalität von CV01

Zeit [h]	0	17	41	66	89
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	0,6	0,6	0,6	0,3
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	0,4	0,7	0,5	0,3
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 125	--	0,3	0,7	0,7	0,4
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	0,6	0,7	0,4	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	0,7	0,5	0,4	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 125	--	0,6	0,6	0,5	0,3

Tab. 3.5 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von CV01

Zeit [h]	0	17	41	66	89
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	87	50	5	0
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	75	43	22	3
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 125	--	55	37	30	17
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	262	241	273	421
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	667	679	1007	412
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 125	--	45	535	1651	325

Tab. 3.6 Ammoniumproduktionsrate und t-PA-Produktionsrate von CV01

Vorkulturen bedingt. Vom zweiten Tag bis zum Versuchsende verhalten sich die Verbrauchsrate der Referenz und der Kultur 100 äquivalent. Die Verbrauchsrate der Kultur 125 liegt ab dem zweiten Tag mit je 0,2 mg/d* 1 Mio. Ze über der Rate der beiden anderen (vgl. Tab. 3.5). Das bedeutet, dass die Zellen die Glukose nicht so optimal nutzen wie in der Referenz, obwohl ähnliche Zellzahlen vorliegen. Dies kann sowohl durch die unterschiedliche Vorkultur bedingt sein oder durch die höhere Cholesterin-Konzentration. Ein nachteiliger Einfluss durch die Vorkultur kommt nur in Betracht, wenn dieser sowohl in der Vitalität als auch in den Zellzahlen und anderen Analysen in Erscheinung tritt. Das ist für die Vitalität und die Zellzahlen nicht der Fall. Ein Einfluss des Cholesterins kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Laktatproduktionsrate der Kultur 100 nimmt linear ab. Die Laktatproduktion der Referenz ist bis auf die 41. Stunde mit der von Kultur 100 vergleichbar. Die Produktionsrate der Kultur 125 ist ab der 66. Stunde höher als die der anderen beiden Kulturen. Obwohl die Lebendzellzahlen von Kultur 125 mit denen der Referenz vergleichbar sind, unterscheiden sich die Laktatproduktionsraten deutlich. Die Abnahme der Produktionsrate erfolgt langsamer als in der Referenz. Für die unterschiedlichen Werte der Kultur 125 gelten die gleichen Vermutungen wie bei der Glukoseverbrauchsrate (s.o.).

In Abb. 3.40 wird ersichtlich, dass die Ammoniumkonzentration der Kultur 125 bei Versuchsende die der Kultur 100 und der Referenz übersteigt. Die Produktion der Referenz erfolgt in den ersten beiden Tagen und nimmt ab dem zweiten Tag ab (vgl. Tab. 3.6). Dagegen produzieren Kultur 100 und 125 den toxischen Metaboliten in geringerem Umfang, dafür aber über einen längeren Zeitraum. Der höhere Endwert

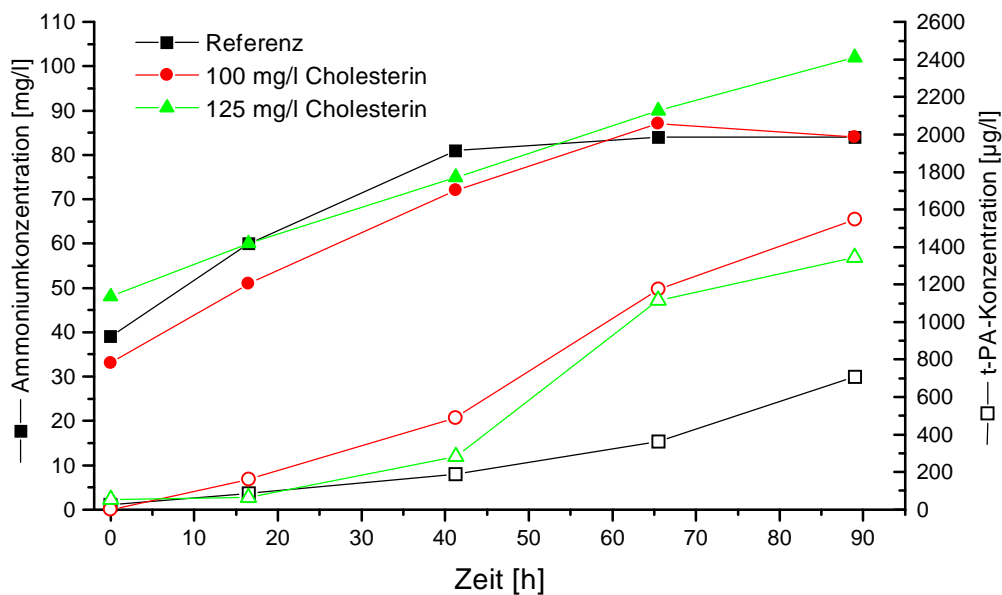


Abb. 3.40 Ammoniumkonzentration und t-PA-Konzentration von CV01

der Kultur 125 sowie die lang andauernde Produktion deuten wie schon die Glukose- und Laktatraten auf einen negativen Einfluss durch die Vorkultur hin.

Die Konzentration an t-PA (vgl. Abb. 3.40) ist nach Versuchsende in der Kultur 100 mit 1415 $\mu\text{g/l}$ am größten. Die Konzentration in der Referenz ist dagegen etwa halb so groß. Die Produktion der t-PA-Konzentrationen der Kulturen 100 und 125 ist im Gegensatz zur Referenz bis zur 66. Stunde ansteigend (vgl. Tab. 3.6). Nach diesem Zeitpunkt nimmt die Produktion ab. Die Referenz produziert das t-PA gleichmäßig. Die der Referenz gegenüber erhöhten Produktionsraten gleichen die nachteiligen Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten sowie die Ammoniumproduktionsrate von Kultur 125 aus. In Kultur 125 nutzen die Zellen die vorhandene Energie zwar nicht optimal aus bilden aber mehr t-PA als die Referenz, was in der industriellen Verwendung der Hauptzweck der Zellen ist. Ein Einfluss durch die Vorkultur mit Cholesterin ist denkbar.

Der Aminosäure-Stoffwechsel der Referenz verläuft scheinbar „intensiver“ als der der substituierten Kulturen. Das heißt, es werden in der Referenz bei einigen Konzentrationen der Aminosäuren höhere Maxima während der Kultivierung erreicht. Die Konzentration der Referenz bei der Alaninproduktion erreicht z.B. ein um 11 bzw. 19 mg/l höheres Maximum. Es wird 25 Stunden eher erreicht als bei Kultur 100 bzw. am gleichen Tag bei Kultur 125. Das Maximum der Glycinkonzentration ist bei der Referenz ebenfalls höher als in den substituierten Kulturen, was in Anbetracht der gleichen Abnahme der Serinkonzentration in Bezug auf Kultur 100 verwundert. Serin wird zur Produktion von Glycin verwendet. Im Fall der Kultur 100 führt wahrscheinlich ein anderer Stoffwechselweg zur Abnahme des Serins. Die Abnahme der Serinkonzentration ist in der Referenz der der Kultur 100 mit 98 bzw. 101 mg/l vergleichbar. In der Kultur 125 ist sie mit 69 mg/l geringer. Die vorliegende Glutaminsäurekonzentration der Referenz und der Kultur 125 wird im gleichen Zeitraum ver-

braucht wie die um 50 mg/l geringere Konzentration der Kultur 125. Dafür ist die maximale Glutaminsäure-Konzentration der Referenz höher. Es wird also mehr Glutamin als Glutamat gespeichert als in den substituierten Kulturen. Die Konzentrationsabnahme der Asparaginsäure beträgt bei der Referenz 101 mg/l, in der Kultur 100 99 mg/l. In der Kultur 125 beträgt sie 79 mg/l.

Der Stoffwechsel wird demnach durch die unterschiedlichen Vorkulturen und die nicht identischen Anfangskonzentrationen der Aminosäuren beeinträchtigt. Die Änderungen der Aminosäure-Konzentrationen der Referenz und der Kultur 100 sind sich ähnlicher als die Änderungen in Kultur 125.

Als Ergebnis der Kultivierung CV01 ist eine geringe Änderung des Stoffwechselverhaltens der Zellen in den Cholesterin-Kulturen festzustellen. Diese Änderung wirkt sich in Kultur 100 z.B. auf die Produktion von Ammoniak und t-PA aus. Dieses Verhalten kann im Fall des Ammoniak ein Nachteil sein, da eine längere Produktionsdauer vorliegt. Die Schädigung der Zellen durch den toxischen Stoffwechselmetaboliten ist gleichmäßig im Gegensatz zur Referenz, deren Produktionsraten am Kultivierungsanfang verstärkt sind. Eine steil ansteigende t-PA-Produktion zu Kultivierungsbeginn kann bei kurzfristigen Kultivierungen sinnvoll sein. Die Änderungen im Aminosäurehaushalt sind zu komplex, um an dieser Stelle Vor- oder Nachteile im Zusammenhang mit der Cholesterin-Konzentration herzuleiten. Solange die veränderte Verstoffwechslung keine relevanten Folgen für die Kultivierung hat, wie z.B. ein Absterben der Zellen, kann das Cholesterin den Kultivierungen weiter zugesetzt werden.

Die Ergebnisse der **Kurzzeit-Scherexperimente** von CV01-CV03 sind in Tab. 3.7 (Überlebensrate und Schubspannung) und in Tab. 3.8 (Analysen und Zellzahlen) zusammen gefasst. Aus Tab. 3.7 lässt sich, wie schon im ersten Cholesterin-Scherexperiment, ablesen, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit mit der Höhe der Cholesterin-Konzentration zunimmt. So überleben in Kultur 100 mit 46 % fast ein- einhalbmal so viele Zellen wie in der Referenz mit 30 %. Die Überlebensrate der Kultur 125 ist mit 57 % die höchste. Im vorherigen Experiment hatte die Referenz eine Überlebensrate von 30 %, die Kultur 100 eine von 53 % und die Kultur 125 eine von 58 %. Die Überlebensraten haben sich aufgrund der längeren Kultivierungsdauer mit Cholesterin nicht wesentlich verändert. Die größte Änderung liegt bei Kultur 100 mit 7 % vor. Die Dauer der Kultivierung hat demnach keinen gravierenden Einfluss auf die Überlebensraten.

Den gemittelten Schubspannungen kann die Höhe der Scherbelastung entnommen werden. Mit $2,0 \text{ N/m}^2$ herrscht in der Referenz die größte Belastung. Mit Zugabe von Cholesterin nimmt die Schubspannung ab. Die Schubspannung in den Cholesterin-

	Überlebensrate R_s [%]			Schubspannung τ [N/m^2]		
	Referenz	Kultur 100	Kultur 125	Referenz	Kultur 100	Kultur 125
Mittelwert	30	46	57	2,0	1,8	1,8

Tab. 3.7 gemittelte Überlebensrate und Schubspannung von CV01, CV02 und CV03

Änderung der/des	Referenz	Kultur 100	Kultur 125
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	1	-2	-1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-19	-12	-9
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-18	-14	-11
... Vitalität [%]	-25	-12	-6
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	0	2	0
... Proteinkonzentration [mg/l]	11	12	10
... relativen LDH-Wertes [U/l]	42	40	58

Tab. 3.8 gemittelte Analysenwerte von CV01, CV02 und CV03

Kulturen ist mit $1,8 \text{ N/m}^2$ identisch. Die Schubspannungen weichen bei Referenz und Kultur 100 im Vergleich zu den gemittelten Werten der Kulturen C07-C10 um $\pm 0,1 \text{ N/m}^2$ ab. Dieser Wert entspricht 5 % bezogen auf eine Schubspannung von $1,9 \text{ N/m}^2$ und liegt in der Größenordnung des Gerätemessfehlers. Die Schubspannung der Kultur 125 ist identisch mit der der vorherigen Versuche.

Die Veränderungen der untersuchten Parameter der Scherstressversuche sind in Tab. 3.8 zusammengefasst. Sie bestätigen die Ergebnisse der Überlebensrate und der Schubspannung in Tab. 3.7. Die Lebend- und Gesamtzellzahlen verringern sich im Versuchsverlauf bei allen Kulturen. Die Totzellzahl verzeichnet die geringsten Abnahmen. In den Kulturen 100 und 125 sind die Änderungen der Totzellzahlen mit denen der vorherigen Versuche vergleichbar (s. Tab. 3.4). Es tritt jeweils eine Abnahme von 1 bis $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter auf. Die Totzellzahlen der Referenz erfahren im Gegensatz zum vorherigen Versuch nur eine geringe Zunahme. Bei den Totzellzahländerungen hat der Zusatz und die Höhe der Cholesterin-Konzentration keinen Einfluss. Bei der Lebendzellzahl hingegen wird der Einfluss von Cholesterin in den Kulturen deutlich. Je größer die Konzentration an Cholesterin, desto geringer ist die Abnahme der Lebendzellzahlen im Versuchszeitraum (vgl. Tab. 3.8). Der Unterschied zwischen den einzelnen Kulturen tritt deutlicher hervor als in den vorangegangenen Versuchen. Hier besteht zwischen der Referenz und Kultur 100 eine Differenz von $7 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter und zwischen den Cholesterin-Kulturen eine Differenz von $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Die Differenz der vorherigen Versuche liegt bei $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter (Referenz-Kultur 100, Kultur 100-Kultur 125). Die Abnahme der Lebendzellzahl ist in diesem Versuch und im Versuch mit C07-C10 für die substituierten Kulturen vergleichbar.

Auch die Abnahme der Gesamtzellzahl nimmt mit der Höhe der Cholesterin-Konzentration ab. Die Abnahme in diesem Versuch ist nur für Kultur 125 gegenüber den vorausgegangenen Versuchen unverändert. Ansonsten liegt sie um 3 bis $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter höher. Eine längere Kultivierungsdauer mit Cholesterin scheint für die Gesamtzellzahländerungen nur für die höher konzentrierte Kultur von Bedeutung zu sein. Diese Kultur weicht jedoch im Verhalten von den anderen schon

bei der Kultivierung ab (s.o.). Deswegen sind Abweichungen auch bei den Scherstressexperimenten möglich.

Die Vitalitätsabnahme ist von der zugesetzten Menge an Cholesterin abhängig. Mit einem Verlust von 25 % ist die Vitalitätsabnahme der Referenz doppelt so hoch wie die der Kultur 100 mit 12 %. Kultur 125 verzeichnet nur einen Verlust von 6 % ihrer ursprünglichen Vitalität. Im Gegensatz zu dem vorherigen Versuch sind die Vitalitätsverluste bei den substituierten Kulturen deutlich geringer. Hier macht sich die längere Kultivierung mit Cholesterin erstmals bemerkbar.

Die Änderung der Proteinkonzentration wird ebenso wie die Ammoniumkonzentration und der relative LDH-Wert nicht oder nur sehr gering durch die Cholesterinzugabe beeinflusst, wie sich schon im vorangegangenen Versuch feststellen ließ.

Werden die Daten der Versuche mit Cholesterin versetzten Vorkulturen insgesamt betrachtet, sind durchaus positiven Ergebnisse zu erkennen. Der Stoffwechsel der Zellen wird gering beeinträchtigt. Dies wirkt sich positiv auf die t-PA-Produktion aus. Das zugesetzte Cholesterin hemmt weder das Zellwachstum noch führt es zu Vitalitätsverlusten. Es führt bei längerer Kultivierungsdauer zu geringeren Vitalitätsverlusten. Bei den Änderungen der Lebendzellzahl tritt eine größere Differenz gegenüber der Referenz auf, bei den Gesamtzellzahlen hingegen nicht. Die Veränderung bei der Totzellzahl unterscheidet sich kaum von der der vorausgegangenen Versuche. Das Cholesterin erhöht, wenn es den Zellen in den Konzentrationen von 100 bzw. 125 mg/l schon in der Vorkultur zugeführt wird, die Scherresistenz der Zellen um mehr als 15 % gegenüber der Referenz ähnlich der der vorherigen Versuche. Auch die Schubspannungen ähneln denen der vorherigen Versuche. Cholesterin erweist sich als geeignetes Additiv, welches seine Wirkung schon in kurzen Kultivierungszeiten entfaltet und nicht erst durch eine längere Kultivierungsdauer die Scherempfindlichkeit der Zellen senkt.

Es erfolgt eine längere Kultivierungsreihe von 151 Stunden mit Cholesterin (LC), die als Vorbereitung für die **Langzeit-Scherexperimente** fungiert. Die Cholesterin-Konzentration wird für diesen Versuch mit 100 mg/l angesetzt. Die tatsächlich gemessene Konzentration liegt bei durchschnittlich 75 mg/l.

Die Lebendzellzahlen der beiden Kulturen (vgl. Abb. 3.41) differieren bis zur 66. Stunde nur um maximal $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Nach diesem Zeitpunkt setzt sowohl in der Referenz als auch in Kultur 100 das exponentielle Wachstum ein. Dabei ist das Wachstum der Referenz höher als das der Kultur 100, wie anhand der Wachstumsraten zu erkennen ist (vgl. Tab. 3.10). Dies führt dazu, dass am Ende der Kultivierung die Referenz mit $92 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter eine um 16 % größere Lebendzellzahl besitzt. Da die beiden Kulturen aus der gleichen Vorkultur angeimpft wurden, kann der Unterschied in der Maximalzellzahl nicht hierauf beruhen, sondern muss andere Ursachen haben. Es kann sich z.B. um eine normale Abweichung während einer Kultivierung handeln, da Kulturen sich nie identisch verhalten. Zum anderen kann es sich aber auch um Einflüsse des Cholesterin, die erst sehr spät zu Tage treten, handeln.

Die Kultur 100 besitzt bis zur 79. Stunde eine höhere Vitalität gegenüber der Referenz (vgl. Abb. 3.41). Dieses Verhältnis kehrt sich in den letzten 72 Stunden um. Wird die Vitalität über den ganzen Versuchszeitraum betrachtet, kann eine Vitalitätszunahme in der Referenz und in Kultur 100 festgestellt werden. Ein Einfluss des Cholesterins ist nicht erkennbar. Aber die gegenüber der Referenz in den letzten 50 Stunden geringere Vitalität deutet auf weniger optimale Bedingungen für die Zellen der Kultur 100 hin und korrespondiert gut mit der geringeren exponentiellen Zunahme.

Die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten der Kulturen unterscheiden sich nicht (vgl. Tab. 3.9). Der Stoffwechsel von Glukose und Laktat wird nicht durch das zugegebene Cholesterin beeinflusst.

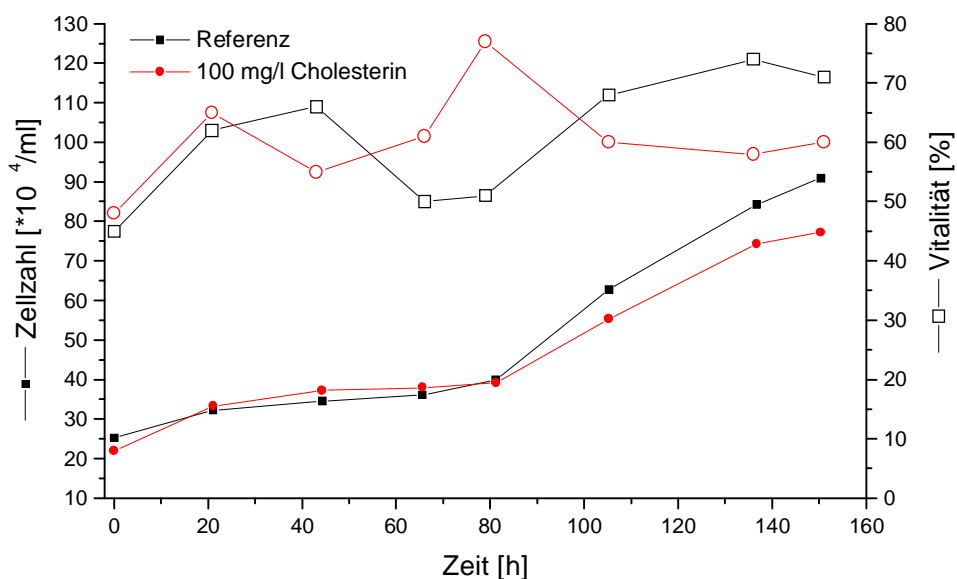


Abb. 3.41 Lebendzellzahl und Vitalität von LC

Zeit [h]	0	21	43	66	79	105	136	151
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,2	0,8	0,3	1,1	0,2	0,2	0,1
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	1,2	0,8	0,3	0,9	0,3	0,2	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,4	0,7	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	1,5	0,8	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1

Tab. 3.9 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von LC

Zeit [h]	0	21	43	66	79	105	136	151
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	45	49	21	58	0	6	0
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	59	25	36	34	0	0	11
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	483	177	495	607	154	136	48
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	576	524	306	643	224	62	0
Wachstumsrate [d⁻¹] Referenz	--	0,12	0,03	0,03	0,07	0,20	0,09	0,06
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 100	--	0,20	0,05	0,01	0,02	0,15	0,10	0,03

Tab. 3.10 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate sowie Wachstumsrate von LC

In der 79. Stunde befindet sich ein Maximum von 90 mg Ammonium pro Liter in beiden Kulturen. Bis zum Versuchsende sinkt die Konzentration auf 70 mg/l in der Referenz und 76 mg/l in Kultur 100 ab (vgl. Abb. 3.42). Auch hier unterscheiden sich die Produktionsraten nicht wesentlich (vgl. Tab. 3.10). Es ist demnach keine Auswirkung des Cholesterins auf den Ammoniumstoffwechsel festzustellen.

Wird die Konzentration von t-PA betrachtet (vgl. Abb. 3.42), fällt eine durchgehend höhere, von mindestens 10 bis maximal 140 µg/l reichende Konzentration der Kultur 100 auf. Die Konzentration der 151. Stunde bildet die einzige Ausnahme. Werden die Produktionsraten betrachtet, sind beide Kulturen im Versuchsabschnitt von der 66. bis zur 105. Stunde gleichwertig (vgl. Tab. 3. 11). Im ersten Kultivierungsabschnitt bis zur 43. Stunde ist die Produktionsrate der Kultur 100 höher, während sie im letzten Abschnitt geringer ist als die der Referenz. Dies erklärt sich aus der verringerten t-PA-Produktion. In Kultur 100 wird das t-PA vorwiegend in den ersten 79 Stunden gebildet. In der Referenz wird nach der 79. Stunde mehr t-PA gebildet als in Kultur 100.

Geringfügige Differenzen gibt es bei den Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren (Daten s. Anhang). Dass dies keine wesentlichen Änderungen sind, ist an der Konzentration des Glutamins zu erkennen. Das Glutamin wird von der Kultur 100 im gleichen Zeitraum wie in der Referenz bis zu einer nur um 2 mg/l differierenden Konzentration verstoffwechselt. Auch am Beispiel des Alanins können die geringen Abweichungen nachvollzogen werden. Mit einer Anfangskonzentration von 4 bzw. 5 mg/l der Kultur 100 bzw. der Referenz wird über ein Maximum von 30 bzw.

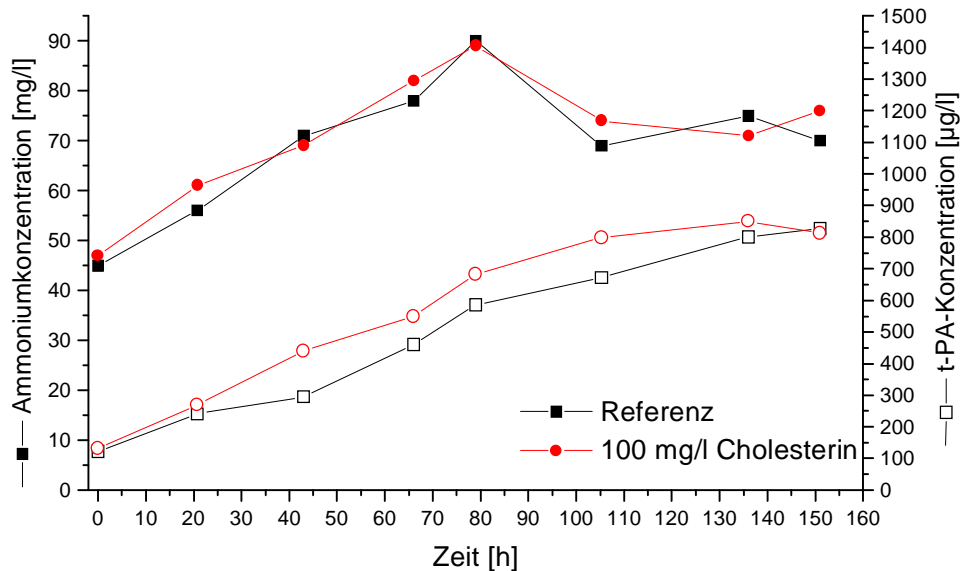


Abb. 3.42 Ammonium- und t-PA-Konzentration von LC

36 mg/l ein Endwert von 17 bzw. 24 mg/l erreicht. Das Maximum der Kultur 100 ist um 6 mg/l kleiner und tritt 26 Stunden früher auf. Aufgrund des niedrigeren Maximums ist auch der Endwert um 7 mg/l geringer als in der Referenz.

Auf den ersten Blick widersprechen sich die Ergebnisse von Zellzahlen und Analysen. Die t-PA-Konzentration der Referenz steigt nicht über die Konzentrationen der Kultur 100, obwohl die Lebendzellzahlen ab der 105. Stunde deutlich über denen der substituierten Kultur liegen. Dies lässt sich mit geringeren Produktionsraten der Referenz im beschriebenen Zeitraum erklären. Ebenso ist die Ammoniumkonzentration der beiden Kulturen vergleichbar. Ab dem Zeitpunkt, wo sich die Lebendzellzahlen der Kulturen unterscheiden wird kein Ammonium mehr produziert. Der rapide Abfall der Konzentration von der 79. zur 105. Stunde kann eventuell durch ein Ausgasen einer bestimmten Menge an Ammoniak hervorgerufen werden.

Die beiden Kulturen verhalten sich abgesehen von der Differenz der Lebendzellzahlen äquivalent. Die Vitalität ist ähnlich, Ammonium- und t-PA-Konzentration differieren nur wenig. In Bezug auf die Lebendzellzahlen sind die Kulturen ab der 105. Stunde nicht mehr vergleichbar.

Für die **Langzeit-Scherexperimente** wird der Versuch für die Referenz einmal, für die Cholesterin-Kultur dreimal durchgeführt. Die Ergebnisse der Cholesterin-Scherexperimente werden gemittelt.

In Tab. 3.11 sind Überlebensraten und Schubspannungen zusammengestellt. Die Überlebensrate der Referenz beträgt 0 %. Obwohl sich die Schubspannung der Referenz von der der Kultur 100 nur um $0,1 \text{ N/m}^2$ unterscheidet, wird eine Überlebensrate von 23 % in der Cholesterin-Kultur erzielt. Mit den Überlebensraten der Kurzzeit-Scherexperimente verglichen (s. Tab. 3.3 u. 3.7), sind die der Langzeit-Versuche um 23-33 % kleiner, was auf die längere Dauer des Experiments zurückzuführen ist. Die Schubspannung der Referenz ist den Kurzzeit-Experimenten gegenüber unverändert, ebenso die Schubspannung der Kultur 100.

LC	Referenz	Kultur 100
R_s [%]	0	23
τ [N/m ²]	2,0	1,9

Tab. 3.11 gemittelte Überlebensrate und Schubspannung von LC

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Kurzzeit-Scherexperimente werden bei den Langzeit-Versuchen Glukose und Laktat sowie t-PA und Aminosäuren bestimmt. Die entsprechenden Raten zur Konzentrationsänderung der einzelnen Stoffe und die Wachstumsrate werden ermittelt. In diesem Versuch kann aufgrund der Verwendung des Logarithmus in der Berechnung der Wachstumsrate die Rate der Referenz nicht bestimmt werden, weil der Logarithmus von Null nicht definiert ist. In der Referenz stirbt die gesamte Kultur im Scherexperiment ab.

Die Änderungen von Lebend- und Gesamtzellzahl sind bei der Referenz und bei Kultur 100 identisch, ebenso wie die Änderung der Totzellzahl (vgl. Tab. 3.12). Die geringere Vitalitätsabnahme sowie die kleinere Änderung des relativen LDH-Wertes sprechen für eine größere Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen in der substituierten Kultur. Die am Ende des Versuches mit durchschnittlich 0,11 g/l höhere Abnahme der Glukosekonzentration und die mit 0,25 g/l größere Laktatkonzentration belegen den Verbrauch bzw. die Produktion dieser beiden Produkte ebenso, wie die zugehörigen Raten (vgl. Tab. 3.13). Auch die Zunahme der t-PA-Konzentration während des Versuches bei beiden Kulturen deutet auf ein Funktionieren des Stoffwechsels in den Zellen und damit ein Überleben dieser hin. Im Fall der Kultur 100 ist diese Funktion um ein Vielfaches größer als bei der Referenz.

Ein Wachstum ist in beiden Kulturen nicht zu beobachten. Die Referenz stirbt während des Versuchs vollständig ab. Die Scherbelastung über 24 Stunden kann in den Zellen nicht kompensiert werden. In Kultur 100 ist die Wachstumsrate -1 d^{-1} , die Lebendzellzahlen nehmen geringfügig ab. Gegenüber der Referenz ist hier die Scherempfindlichkeit der Zellen geringer.

Änderung der/des	Referenz	Kultur 100
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	0	-1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-19	-19
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-18	-19
... Vitalität [%]	-53	-35
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	4	8
... Proteinkonzentration [mg/l]	15	10
... relativen LDH-Wertes [U/l]	164	63
... Glukosekonzentration [g/l]	0,0	-0,1
... Laktatkonzentration [g/l]	0,0	0,3
... t-PA-Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	14	47

Tab. 3.12 gemittelte Analysenwerte von LC

	Referenz	Kultur 100
Wachstumsrate [d^{-1}]	.*	-1
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	0,0	0,6
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	0,0	1,2
Ammoniumproduktionsrate [μ g/d*1 Mio. Ze]	43	42
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze]	148	235

Tab. 3.13 gemittelte Raten von LC; * die Wachstumsrate kann wegen der Lebendzellzahl – sie ist für die Referenz gleich Null nach dem Experiment – nicht ermittelt werden

Einen weiteren Hinweis auf Stoffwechselfvorgänge gibt die Analyse der Aminosäure-Konzentrationen (Daten s. Anhang). Die Konzentration von Glutamin nimmt in bei den Kulturen ab. Alanin wird im Zeitraum des Scherexperiments von beiden Kulturen produziert. Die Konzentrationsunterschiede sind hier gering, da der Zeitraum kurz bemessen ist.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Ergebnisse: in Kultur 100 findet eine der Referenz gegenüber erhöhte Bildung von Glukose bzw. ein erhöhter Verbrauch von Laktat statt. Dagegen ähnelt die Umsetzung der Aminosäuren in Kultur 100 der Umsetzung der Referenz. Die t-PA-Produktion während des Versuchs ist in Kultur größer als die der Referenz, wobei die „Produktion“ in der Referenz eher durch eine Freisetzung des in den Zellen gelagerten t-PAs hervorgerufen sein dürfte. Es liegt in Kultur 100 eine kleinere Änderung des relativen LDH-Wertes vor. Tot-, Lebend- und Gesamtzellzahl nehmen im gleichen Maß ab. Die Vitalitätsabnahme ist um knapp 20 % geringer als in der Referenz. Die Änderungen in der Proteinkonzentration und der Ammoniumkonzentration unterscheiden sich nur geringfügig voneinander.

Die Zugabe von Cholesterin ergibt in den Langzeit-Versuchen nur noch einen kleinen, aber immer noch bestehenden Vorteil für die in Kultur befindlichen Zellen. Die Veränderungen von Lebend- und Gesamtzellzahl nehmen zu und unterscheiden sich nicht mehr wesentlich von denen der Referenz. Die Schubspannungen der Cholesterin-Kultur und der Referenz unterscheiden sich nicht deutlich von denen der Kurzzeit-Experimente. Eine größere Überlebenswahrscheinlichkeit und ein kleinerer Vitalitätsverlust in Bezug auf die Referenz deuten aber auf bessere Bedingungen bei der Cholesterin-Kultur hin. Das Additiv kann in Langzeit-Versuchen eingesetzt werden.

Das zweite Additiv in der ersten Gruppe ist **Ergosterin**. Es werden drei Kultivierungsreihen durchgeführt. Zu den ersten beiden Reihen gehören Kulturen mit Ergosterin-Konzentrationen von 10 und 20 $\mu\text{g/}$ und zur dritten Kultur mit Konzentrationen von 2,5 (Kultur 2.5) und 5 mg/l (Kultur 5). Es werden die Kultivierungsdaten der dritten Reihe aufgeführt.

Die Lebendzellzahl in der Kultivierungsreihe E03 zeigt eine Abhängigkeit von der Ergosterin-Konzentration (vgl. Abb. 3.43), obwohl im Toxizitätstest keine Beeinflussung der Zellen durch Konzentrationen bis 20 mg/l Ergosterin festgestellt wird. Diese kann nicht durch die Ethanol-Zugabe verursacht sein, da alle drei Kulturen 0,04 % Ethanol enthalten. Die Abweichung kann durch das unterschiedliche Kultivierungssystem hervorgerufen werden. In den Toxizitätstests werden die Zellen nicht in Suspension gehalten und nicht durch einen Rührer aufgewirbelt. Die Zellzahlen sind zwar in dem Toxizitätstest von Ergosterin schwierig zu bewerten, unterscheiden sich aber nur gering (s. Abb. 3.10). Dass in der durchmischten Kultur die Zellzahlen ab der 41. Stunde in den substituierten Kulturen eindeutig niedriger sind, kann auf die ständige Belastung der Zellen durch die Rührbewegung zurückzuführen sein. Dies würde auf schereempfindlichere Zellen in den Ergosterin-Kulturen hindeuten. Sollte diese Theorie stimmen, müssten sich in den anschließenden Scherexperimenten Beweise finden.

Die höher konzentrierte Ergosterin-Kultur zeichnet sich durch ein geringeres Wachstum der Zellen aus. Die Kultur mit 5 mg/l hat ihre maximale Lebendzellzahl mit $22 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in der 41. Stunde. Das Maximum der Kultur 2,5 liegt ebenfalls in der 41. Stunde, jedoch mit $30 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter deutlich höher. Die Lebendzellzahl der Referenz nimmt stetig zu und erreicht einen Endwert von $37 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter, doppelt so hoch wie in den substituierten Kulturen.

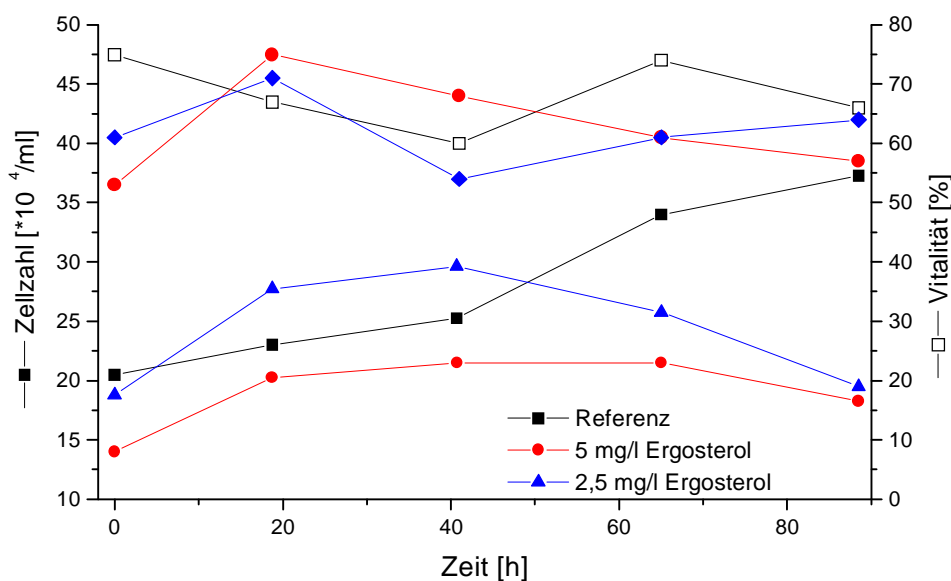


Abb. 3.43 Zellzahl und Vitalität von E03

Zeit [h]	0	19	41	65	89
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,9	0,7	0,6	0,4
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	2,6	1,7	1,4	1,0
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	1,3	0,8	0,9	0,6
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,6	0,9	0,3	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	2,7	2,0	1,2	1,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	1,5	1,1	0,6	0,6

Tab. 3.14 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von E03

Zeit [h]	0	19	41	65	89
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g/d*1 Mio. Ze}$] Referenz	--	0	98	14	9
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g/d*1 Mio. Ze}$] Kultur 5	--	22	52	0	21
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g/d*1 Mio. Ze}$] Kultur 2,5	--	110	0	47	5
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	359	402	486	444
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	531	98	88	134
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	473	380	7	68
Wachstumsrate [d^{-1}] Referenz	--	0,06	0,04	0,13	0,04
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 5	--	0,21	0,03	0	-0,07
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 2,5	--	0,22	0,03	-0,06	-0,12

Tab. 3.15 Ammoniumproduktionsrate, t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von E03

Die Wachstumsraten der substituierten Kulturen nehmen im Versuchsverlauf kontinuierlich ab. Die der Referenz zeigen ebenfalls eine Abnahme (vgl. Tab. 3.15). Lediglich die Rate in der 65. Stunde weist andeutungsweise eine exponentielle Phase auf. Mit einer Zunahme von kapp $8 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter ist das Wachstum für eine exponentielle Wachstumsphase aber zu gering.

Die Vitalität von Kultur 5 sinkt nach dem Höchststand der Lebendzellzahlen beständig bis auf 57 % bei Versuchsende (vgl. Abb. 3.43). Dagegen bleiben die Vitalitäten der Referenz und von Kultur 2,5 über den Versuchsverlauf konstant. Die Abnahme der Lebendzellzahlen in Kultur 2,5 geht folglich nicht mit einer Vitalitätsabnahme einher. Das bedeutet, dass sich die Totzellzahl im Verhältnis zur Lebendzellzahl nicht erhöht. Um die Zellzahl trotzdem zu verringern, muss die Gesamtzellzahl abnehmen und sollten die toten Zellen aufgelöst werden. Dies spricht wieder für schereempfindlichere Zellen in Kultur 2,5.

Bei der Betrachtung der Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten ist ein belasteter Stoffwechsel erkennbar (vgl. Tab. 3.14). Ungeachtet der niedrigeren Gesamt- und Lebendzellzahl ab der 41. (Kultur 5) bzw. der 65. (Kultur 2,5) Stunde wird von den substituierten Kulturen im gleichen Zeitraum eine höhere Konzentration an Glukose zu Laktat umgesetzt als bei der Referenz. Die Zellen der substituierten Kulturen

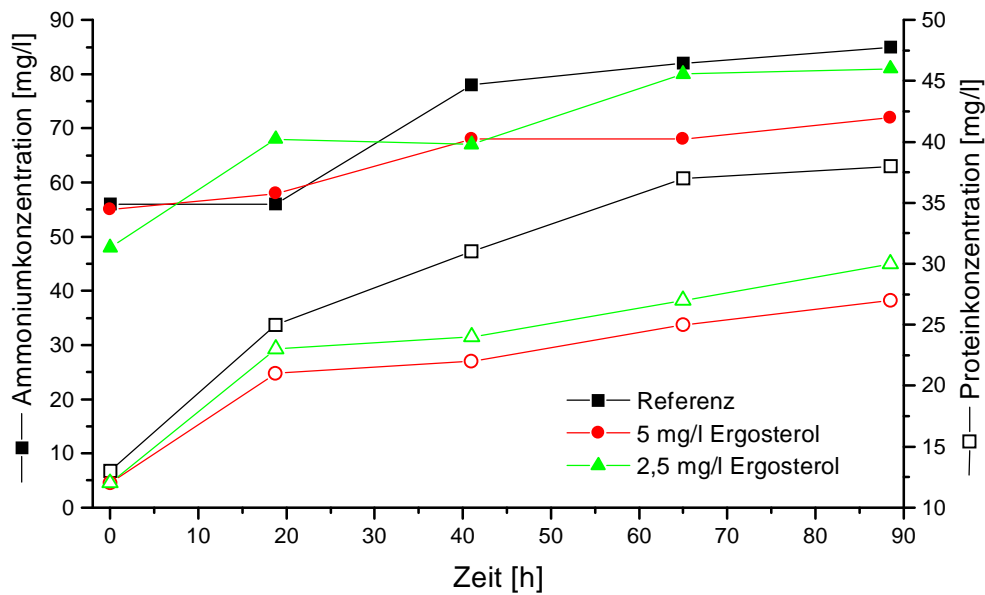


Abb. 3.44 Ammonium- und Proteinkonzentration von E03

werden durch die Ergosterin-Zugabe Stress ausgesetzt, der sich in der höheren Umsetzung von Glukose zu Laktat bemerkbar macht.

Die Proteinkonzentrationen liegen in Abhängigkeit von der Ergosterin-Konzentration unter denen der Referenz (vgl. Abb. 3.44). Obwohl die Lebendzellzahlen von Kultur 2,5 bis zur 41. Stunde größer gleich der Referenz sind, ist die Proteinkonzentration geringer. Dies deutet wiederum auf nicht optimale Bedingungen in der Ergosterin-Kultur hin.

Die Ammoniumkonzentration der Kultur 2,5 ist mit der der Referenz vergleichbar (vgl. Abb. 3.44). Wegen der unterschiedlichen Lebendzellzahlen sollte die Konzentration ab der 41. Stunde geringer sein. Es wird mehr Ammonium produziert als in der Referenz. Das lässt sich bei einem Vergleich der Produktionsraten in der 65. Stunde bzw. der Addition aller Produktionsraten über die gesamte Versuchsdauer feststellen (vgl. Tab. 3.15). Kultur 5 produziert dagegen weniger Ammonium, wie sich zum einen an der Konzentration (vgl. Abb. 3.44) und zum anderen an den über den Versuchszeitraum addierten Produktionsraten erkennen lässt.

Die Konzentration des t-PA ist bis zur 19. Stunde (Kultur 5) bzw. bis zur 41. Stunde (Kultur 2,5) mit der der Referenz identisch (vgl. Abb. 3.45). Nach diesem Zeitpunkt sind die Konzentrationen geringer. Sie entsprechen damit der Abnahme der Lebendzellzahlen. Die Produktionsraten der Ergosterin-Kulturen nehmen im Versuchsverlauf ab. Der Großteil des t-PAs wird innerhalb der ersten 19 Stunden (Kultur 5) bzw. innerhalb der ersten 41 Stunden (Kultur 2,5) produziert (vgl. Tab. 3.15). Es zeigt sich auch hier ein Nachteil, da in der Referenz die t-PA-Produktion gleichmäßig verläuft. Dieser Nachteil wird vermutlich durch das Ergosterin ausgelöst, da er nur in den beiden Ergosterin-Kulturen auftritt und alle Kulturen bis auf diesen Zusatz gleich behandelt werden.

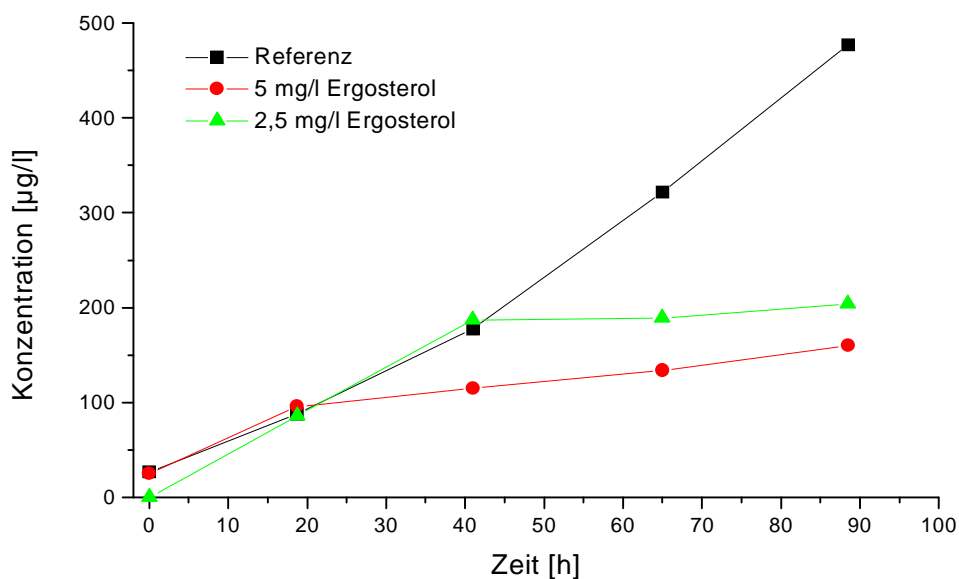


Abb. 3.45 t-PA-Konzentration von E03

In den Konzentrationen der Aminosäuren lassen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den substituierten Kulturen und der Referenz erkennen. Die Abnahme der Glutaminkonzentration beträgt bei der Referenz 106 mg/l bei Kultur 5 bereits nur noch 85 mg/l (Daten s. Anhang). Bei Kultur 2,5 beträgt sie 89 mg/l. Bei geringerer Abnahme der Glutaminkonzentration wird eine der Referenz ähnliche Zunahme der Glutaminsäure-Konzentration von 30 mg/l festgestellt. Das umgesetzte Glutamin wird demnach in den substituierten Kulturen als Glutaminsäure gespeichert, wohingegen das Glutamin in der Referenz der Energiegewinnung dient.

Die Alaninkonzentration am Ende der Kultivierungsreihe ähnelt sich in allen drei Kulturen. Die Konzentration liegt bei 40 mg/l. Die Ausgangskonzentration von Kultur 2,5 ist mit 13 mg/l jedoch doppelt so hoch wie die der Referenz und der Kultur 5, d.h. die Konzentrationszunahme ist geringer. Es wird in Kultur 5 eine ähnliche Zunahme wie in der Referenz verzeichnet, obwohl sich die Lebendzellzahlen ab der 19. Stunde deutlich unterscheiden.

Aufgrund der unterschiedlichen Zellzahlen sollten sich die Aminosäure-Konzentrationen deutlicher unterscheiden als es hier der Fall ist. Es kann daher von einer Beeinflussung der Umsetzung der Aminosäuren durch Ergosterin ausgegangen werden.

Das Additiv Ergosterin beeinflusst in den gewählten Konzentrationen von 2,5 und 5 mg/l das Zellwachstum der Zellen. Aus den schwierig zu bewertenden Toxizitätstests geht dies nicht hervor. Die Differenz zwischen Toxizitätstest und Kultivierung könnte auf den unterschiedlichen Systemen beruhen (mit und ohne Durchmischung). Dann wäre Ergosterin für eine Resistenzbildung gegen Scherstress ungeeignet. Möglich ist auch, dass der Einfluss des Ergosterins wegen der geringen Zellzahlen und der vermutlich auch geschädigten Zellen in den Toxizitätstests nicht erkennbar war.

In dieser Kultivierung zeigt sich ein negativer Einfluss auf die Umsetzung von Glukose zu Laktat, eine geringere und abnehmende t-PA-Produktion. Außerdem ergibt sich eine über den gesamten Versuch betrachtete erhöhte Ammoniumproduktion in Kultur 2,5.

Um die Vermutung, dass Ergosterin schon in einer Kultivierung ohne zusätzliche Einwirkungen die Scherempfindlichkeit der Zellen senkt zu bestätigen, werden Scherexperimente mit Ergosterin durchgeführt. Dabei werden auch die Konzentrationen von 10 und 20 mg/l aus den Reihen E01 und E02 berücksichtigt.

Es werden je zwei Scherexperimente von E01 und E02 und drei von E03 durchgeführt. Die Überlebensraten und Schubspannungen der **Kurzzeit-Scherexperimente** sind in Tab. 3.16 zusammengefasst. Auffällig ist das unterschiedliche Verhalten der Referenz. In den Versuchen E01 und E02 ist bei gleicher Schubspannung von $1,9 \text{ N/m}^2$ die Überlebensrate R_s 42 %, in E03 dagegen nur 24 %. Dies kann auf die unterschiedlichen Vorkulturen zurückgeführt werden. In den ersten beiden Versuchen liegt die Überlebensrate der Referenz über der von den Kulturen 10 und 20. Die Schubspannung der Referenz ist mit $1,9 \text{ N/m}^2$ um $0,1 \text{ N/m}^2$ größer als die der substituierten Kulturen. Das heisst, dass bei einer im Versuchsgefäß geringfügig niedrigeren Belastung für Kultur 10 und 20 ihre Überlebensraten in Bezug auf die Referenz kleiner sind. Es ist trotz „günstigerer“ Bedingungen keine höhere Überlebensrate vorhanden. Die Kulturen scheinen scherempfindlicher zu sein als die Zellen der Referenz. In E03 ist die Schubspannung der Referenz mit der der substituierten Kulturen identisch. Die Überlebensrate der Referenz liegt dagegen zwischen den substituierten Kulturen. Jedoch ist der Unterschied zu Kultur 2,5 mit 6 % gering. Kultur 5 besitzt mit 39 % eine eineinhalb mal so große Überlebensrate wie die Referenz mit 24 %. Kultur 5 scheint scherunempfindlicher als die Referenz zu sein. Ob dies zutrifft oder ob es eine andere Erklärung für die höhere Überlebensrate gibt, sollte den ermittelten Analysenwerten der Kulturen entnommen werden können (vgl. Tab. 3.17).

An den gemittelten Analysenwerten lässt sich erkennen, wie sich die Referenz in Bezug auf die substituierten Kulturen verhält. Dabei wird Versuch E03 gesondert betrachtet.

In Versuch E03 sind die Änderungen der Lebend- und Gesamtzellzahl sowie der Vitalität der Referenz bezogen auf die der substituierten Kulturen größer. Dabei wei-

	Überlebensrate R_s [%]					Schubspannung τ [N/m^2]				
	Referenz	Kultur				Referenz	Kultur			
		2,5	5	10	20		2,5	5	10	20
Mittelwert E01, E02	42	--	--	35	31	1,9	--	--	1,8	1,8
Mittelwert E03	24	18	39	--	--	1,9	1,9	1,9	--	--

Tab. 3.16 gemittelte Überlebensrate und Schubspannung von E01, E02, E03

chen sie in der Gesamtzellzahl und in der Vitalität nur gering von Kultur 2,5 ab. Die Veränderungen bei der Totzellzahl liegen zwischen den Werten für die substituierten Kulturen. Hier ähneln sie denen der Kultur 5.

Werden die Änderungen des relativen LDH-Wertes betrachtet, so lassen sich bei den substituierten Kulturen gering höhere Werte feststellen. Die Änderungen der Proteinkonzentration sind in allen Kulturen vergleichbar. Nicht so die Änderungen der Ammoniumkonzentration. Die Änderung in Kultur 5 ist höher als die der Referenz und der Kultur 2,5.

Die Analysenwerte von E03 sind schwierig zu bewerten. Einerseits lassen die höhere Abnahme der Zellzahlen und der Vitalität bei der Referenz eine geringere Überlebensrate als bei den substituierten Kulturen erwarten, was nur in Bezug auf Kultur 5 zutrifft. Andererseits sollte aufgrund der geringen Abweichungen zwischen den substituierten Kulturen auch die Überlebensrate nur gering abweichen. Das ist nicht der Fall. Bei den Änderungen werden nicht die absoluten Werten betrachtet, sondern nur die Differenzen gemessen. Sind die Zellzahlen am Beginn des Scherexperiments geringer, erhalten die Änderungen eine andere Bedeutung. Das trifft bei Kultur 2,5 zu. Die Zellzahlen sind um fast 20 % geringer. Dadurch können die ähnlichen Änderungen die Tendenz der Überlebensrate bestätigen.

Die höhere Überlebensrate der Kultur 5 stimmt gut mit den im Verhältnis zur Referenz und zur Kultur 2,5 ermittelten Änderungen überein, jedoch nicht mit den ermittelten Zellzahlen in der Kultivierung (s. Abb. 3.43). Aufgrund der geringeren Lebendzellzahlen und des den anderen Kulturen gegenüber schlechteren Wachstums ist eine geringe Überlebensrate zu erwarten gewesen. Nun kann es aber sein, dass die Zellen wegen der geringen Teilungsaktivitäten während der Kultivierung mehr Energie für die Regenerierung der Zellmembran zur Verfügung haben und so den gleichen Scherbelastungen besser widerstehen können. Das würde die höhere Überlebensrate erklären.

Die Ergebnisse der Versuche E01 und E02 sind eindeutiger. Die Referenz weist eine geringe Abnahme der Lebendzellzahl und der Vitalität in Bezug auf Kultur 10 und 20 auf. Die Gesamtzellzahlabnahme ist in den substituierten Kulturen gering höher als

Änderung der/des	Referenz		Kultur			
	E03	E01 E02	2,5	5	10	20
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	-1	-2	-4	0	3	2
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-25	-15	-19	-20	-20	-18
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-25	-16	-23	-20	-19	-17
... Vitalität [%]	-32	-22	-29	-21	-31	-33
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	0	2	0	9	1	3
... Proteinkonzentration [mg/l]	15	17	18	18	16	17
... relativen LDH-Wertes [U/l]	105	132	115	122	124	128

Tab. 3.17 gemittelte Analysenwerte von E01, E02 und E03

in der Referenz. Dagegen ist bei ihnen eine Zunahme der Totzellzahl zu verzeichnen. Diese nimmt in der Referenz ab. Die Änderungen der Protein- sowie der Ammoniumkonzentration zeigen keine Unterschiede.

In diesen Versuchen stimmt die Überlebensrate mit den Ergebnissen der Analysen überein. Die höhere Überlebensrate entspricht der geringsten Abnahme der Lebendzellzahl. Anzumerken ist dabei, dass der höheren Überlebensrate die höhere Schubspannung zuzuordnen ist. Für die substituierten Kulturen bedeutet dies, dass bei geringfügig günstigeren Bedingungen keine höheren sondern geringere Überlebensraten erreicht werden. Dies kann vermutlich auf die Auswirkungen des Ergosterins zurückgeführt werden.

Werden alle Ergebnisse für das Additiv Ergosterin zusammengefasst, ergibt sich bei geringerer Belastung für die Konzentrationen von 10 und 20 mg/l ein größerer Vitalitätsverlust als bei der Referenz. Diese Konzentrationen sind zum Senken der Scherempfindlichkeit ungeeignet. Die Konzentrationen von 2,5 und 5 mg/l weisen bei identischer Belastung ähnliche bzw. bessere Überlebensraten als die Referenz auf.

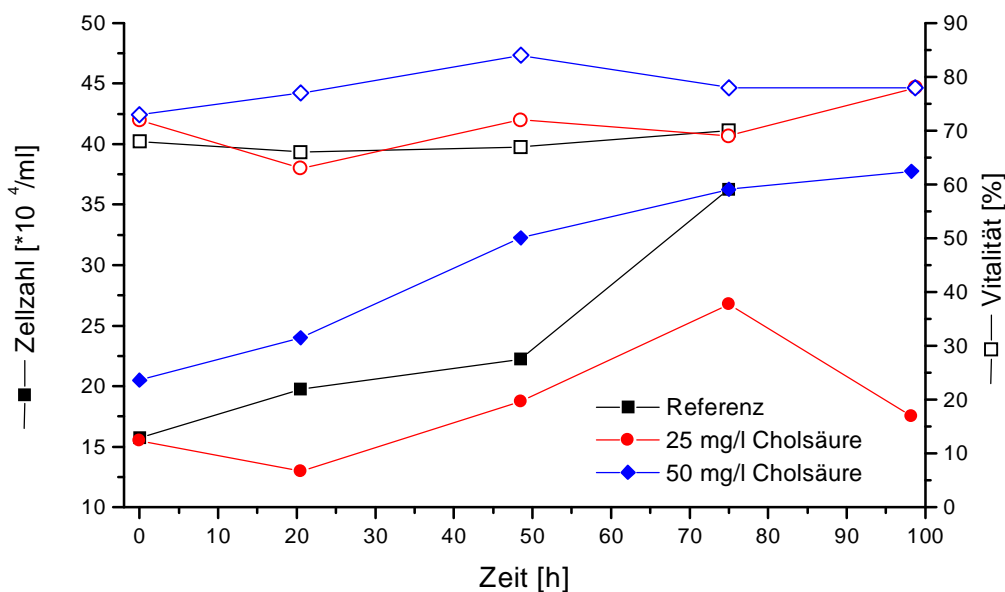
Das Additiv ist in den Konzentrationen von 10 bzw. 20 mg/l zur Senkung der Scherempfindlichkeit nicht geeignet. In den Konzentrationen von 2,5 bzw. 5 mg/l treten höhere Überlebensraten als in der Referenz auf. Das Additiv setzt die Scherempfindlichkeit herab. Wegen der Beeinträchtigung des Zellwachstums und wegen der ungünstigeren Ausnutzung der Glukose eignet es sich aber nicht zur dauerhaften Zugabe für eine Kultivierung.

3.2.1.2 Gruppe II: Cholsäure, Lithocholsäure, Deoxycholsäure

In dieser Gruppe wird die Lithocholsäure nicht weiter untersucht, weil sie sich in den verwendeten Konzentrationen im Toxizitätstest als toxisch erwiesen hat (s. Abb. 3.23).

Für die **Cholsäure**-Experimente werden vier Kultivierungsreihen durchgeführt. Zu den ersten drei Reihen gehören substituierte Kulturen mit Konzentrationen von 50 und 75 mg/l. Die vierte Reihe wird mit Konzentrationen von 25 und 50 mg/l Cholsäure durchgeführt. Es werden die Daten der vierten Reihe CH04 dargestellt.

Die Kulturen besitzen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Dies wird anhand der Lebendzellzahlen in Abb. 3.46 deutlich. Kultur 50 erfährt ein stetiges aber geringes Wachstum. Die Lebendzellzahlen nehmen um 84 % zu. Die Referenz durchläuft hingegen bis zur 49. Stunde eine Lag-Phase bevor ihr exponentielles Wachstum einsetzt. Hier nehmen die Lebendzellzahlen um 130 % zu. Ein ähnlicher Wachstumsverlauf ist in Kultur 25 zu beobachten. Bis zur 21. Stunde tritt eine Lag-Phase auf. Danach setzt eine nicht stark ausgeprägte exponentielle Wachstumsphase ein. Diese ähnelt dem Wachstum der Kultur 50. Zu Kultur 25 ist anzumerken, dass sie nach der 75. Stunde aufgrund geringer Volumina in ein 50 ml Monolayer-Kultivierungsgefäß überführt wird. Dies ist bei Betrachtung des letzten Messpunktes in den Analysen zu beachten. Die entsprechenden Daten sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Ein eindeutiger Einfluss der Cholsäure auf die Lebendzellzahlen ist nicht zu erkennen. Der abweichende Wachstumsverlauf der Kultur 50 kann auch durch die höhere Animpfdichte bedingt sein.



Tab. 3.46 Lebendzellzahl und Vitalität von CH04, Kultur 25 von der 75. zur 80. Stunde in Monolayer

Zeit [h]	0	21	49	75	98
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze]Referenz	--	0,7	0,6	0,6	--
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	0,9	0,9	0,5	0,6*
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	0,5	0,4	0,5	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	0,8	0,8	0,6	--
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,1	1,0	0,6	0,5*
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	0,7	0,5	0,4	0,3

Tab. 3.18 Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate von CH04, *Kultur 25 von der 75. zur 80. Stunde in Monolayer

Die Vitalität der Kultur 50 liegt während der gesamten Kultivierungsreihe bis zu 10 % über der von Kultur 25 und der Referenz (vgl. Abb. 3.46). Die Vitalitäten der Referenz und Kultur 25 sind vergleichbar. Auch hier ist kein Einfluss der Cholsäure auf die Vitalität der Kulturen erkennbar.

Glukose- und Laktatkonzentration differieren nicht im Versuchsverlauf (Daten nicht gezeigt). Weil die Zellzahlen der Kulturen sich unterscheiden, sind auch die Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate verschieden. Die Laktatproduktions- sowie Glukoseverbrauchsrate der Kultur 50 liegen unter denen der Kultur 25 und der Referenz. Die Raten von Kultur 25 sind in Bezug auf die Referenz höher (vgl. Tab. 3.18). Es kann keine durch die Cholsäure verursachte Stoffwechselbelastung festgestellt werden.

Werden die Protein- und die Ammoniumkonzentration betrachtet, fällt bei beiden die in Bezug auf die substituierten Kulturen hohe Konzentration in der Referenz auf (vgl. Abb. 3.47). In der Referenz ist die Proteinkonzentration in den ersten 21 Stunden mit der der substituierten Kulturen identisch. Nach diesem Zeitpunkt ist die Konzentration der beiden Kulturen um 6 bis 8 mg/l höher. Die Proteinkonzentrationen der substitu-

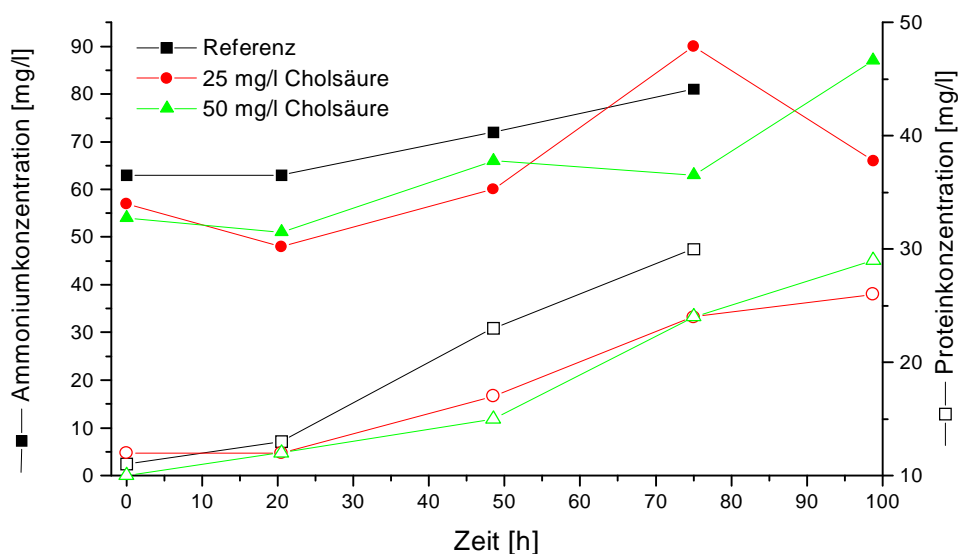


Abb. 3.47 Protein- und Ammoniumkonzentration von CH04, Kultur 25 von der 75. zur 80. Stunde in Monolayer

Zeit [h]	0	21	49	75	98
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	0	37	28	--
Referenz	--	0	65	119	0*
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	0	46	0	66
Kultur 25					
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	389	694	1034	--
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	140	837	756	566*
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	531	731	1713	145
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 50					

Tab. 3.19 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate von CH04, *Kultur 25 von der 75. zur 80. Stunde in Monolayer

ierten Kulturen sind äquivalent, obwohl die Lebendzellzahl der Kultur 50 größer ist und die Zellen deshalb auch eine größere Menge an Protein ins Medium abgeben sollten. Gleichmaßen verhält es sich mit der Ammoniumkonzentration. Die Konzentration der Referenz übersteigt die der substituierten Kulturen bereits am Animpftag. Während des Versuchs ist die Konzentration durchgehend höher als die von Kultur 25 und Kultur 50, wenngleich ihre Lebendzellzahl nicht die höchste ist. Anhand der Ammoniumproduktionsrate (vgl. Tab. 3.19) lässt sich aber erkennen, dass die Produktion in der Referenz gegenüber den substituierten Kulturen nicht erhöht ist. Im Gegenteil zeigt sich eine erhöhte Produktion in Kultur 25. Ein von der Cholsäure abhängiger Einfluss auf die Ammonium- und Proteinkonzentration ist nicht zu erkennen.

Dem Verlauf der Lebendzellzahl vergleichbar ist die Zunahme des t-PAs (vgl. Abb. 3.48). Hier ist die höchste t-PA-Konzentration in der Kultur mit der höchsten Lebendzellzahl (Kultur 50) zu finden. Die t-PA-Konzentrationen der Referenz und Kultur 25 sind bis zur 48. Stunde vergleichbar. Anhand der t-PA-Produktionsraten ist zu erkennen, dass die Produktion in der Referenz und der Kultur 50 analog verläuft

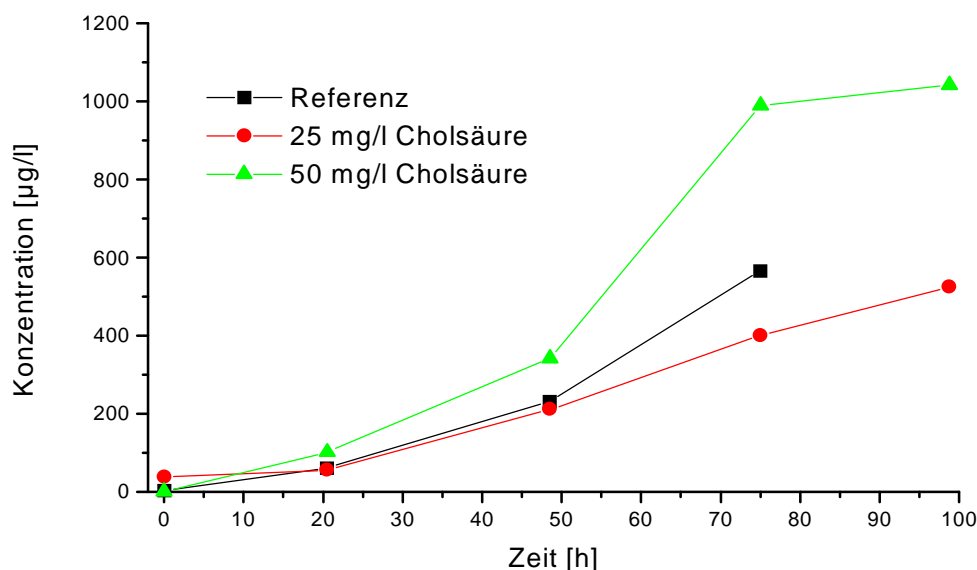


Abb. 3.48 t-PA-Konzentration von CH04, Kultur 25 von der 75. zur 80. Stunde in Monolayer

(vgl. Tab. 3.68). Die Produktionsrate in Kultur 25 ist in Bezug auf die Referenz geringer.

Ein sich unterscheidender Stoffwechsel der Kulturen von CH04 kann an den Aminosäure-Konzentrationen nicht festgestellt werden. So ist die Abnahme der Glutamin- und die Zunahme der Alaninkonzentration in allen drei Kulturen vergleichbar (Daten s. Anhang). Auffälligkeiten in den Konzentrationsänderungen der aufgeführten Aminosäuren sind nicht vorhanden.

Die Referenz und die Kultur 50 unterscheiden sich in den Kultivierungsdaten nicht. Dagegen weichen die Daten der Kultur 25 gering von denen der beiden anderen ab. Die zugesetzte Cholsäure kann nicht die Ursache sein, da in der Kultur 50 die doppelte Konzentration vorliegt. Denkbar wäre eine Schädigung der Zellen beim Animpfen der Kulturen. Sie würde das abweichende Verhalten erklären.

Es werden von Kultivierungsreihe CH01, CH02 und CH04 drei und von CH03 vier **Kurzzeit-Scherexperimente** durchgeführt. Die gemittelten Überlebensraten (vgl. Tab. 3.20) zeigen einen den substituierten Kulturen gegenüber geringen Wert von 44 % für die Referenz. Die substituierten Kulturen besitzen höhere Überlebensraten. Die mit 25 mg/l am geringsten konzentrierte Cholsäure-Kultur besitzt mit 88 % die höchste Überlebensrate. Mit steigender Cholsäure-Konzentration nehmen die Überlebensraten der Kulturen ab. Die Kultur 50 besitzt mit 70 % eine um 11 % höhere Überlebensrate als Kultur 75. Die Schubspannungen der mit Cholsäure versetzten Kulturen sind mit der Referenz identisch und liegen bei $1,9 \text{ N/m}^2$. Die Abnahme der Überlebensraten ist aus den Ergosterin-Experimenten bekannt (s. dort). Hier liegt der Grund jedoch nicht in der stärkeren Schädigung der Kulturen mit höheren Konzentrationen wie beim Ergosterin. Eine denkbare Erklärung für diese Erscheinung ist, dass die bei höherer Konzentration in die Membran eingelagerte Cholsäure die Membran zu sehr versteift. Auf diese Weise wird der vorteilhafte Schutz wieder verringert und die Überlebensraten werden geringer.

Die gemittelten Analysenwerte zeigen für die Totzellzahl der Referenz nur geringe Unterschiede. Dafür treten jedoch hohe Differenzen in der Abnahme der Lebendzellzahlen zwischen der Referenz und den substituierten Kulturen auf. Die Abnahme in der Referenz ist doppelt bis dreimal so hoch. Bei der Gesamtzellzahl verhält es sich ebenso. Dabei ist in Kultur 25 die Abnahmen am geringsten. Diese Ergebnisse werden durch die Überlebensraten bestätigt. Auch die Vitalitätsabnahme der Referenz ist mit 26 % doppelt bzw. sechsmal so hoch wie in den Cholsäure-Kulturen. Ein eindeutiger Einfluss der Cholsäure auf die Änderungen der Gesamt- und Lebendzellzahlen ist erkennbar.

	Überlebensrate R_s [%]				Schubspannung τ [N/m^2]			
	Referenz	Kultur			Referenz	Kultur		
		25	50	75		25	50	75
Mittelwert	44	88	70	59	1,9	1,9	1,9	1,9

Tab. 3.20 gemittelte Überlebensrate und Schubspannung von CH01, CH02, CH03 und CH04

Änderung der/des	Referenz	Kultur 25	Kultur 50	Kultur 75
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	0	1	0	1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-14	-3	-4	-6
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-13	-3	-6	-5
... Vitalität [%]	-26	-4	-4	-12
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	3	2	-2	1
... Proteinkonzentration [mg/l]	21	18	13	7
... relativen LDH-Wertes [U/l]	81	34	50	42

Tab. 3.21 gemittelte Analysenwerte von CH01, CH02, CH03 und CH04

Die Änderung der Ammoniumkonzentration wird nicht durch die Cholsäure-Zugabe beeinflusst. Sehr wohl dagegen die Änderung der Proteinkonzentration. Hier ist die größte Zunahme in der Referenz und die geringste in Kultur 25 zu verzeichnen. Die Zunahme ist abhängig von der Höhe der Cholsäure-Konzentration. In den höher konzentrierten Kulturen ist die Zunahme geringer. Die Höhe der Proteinkonzentration sollte mit der Höhe der Zellzahlabnahme einhergehen, da aus den sich auflösenden Zellen Protein freigesetzt wird. Demnach müsste Kultur 25 eine höhere Lebendzellzahlabnahme aufweisen als Kultur 50. Wie schon in der Kultivierung ist die Proteinkonzentration der Kultur 25 aber trotz geringerer Zellzahl genauso hoch wie in Kultur 50. In den höher konzentrierten Cholsäure-Kulturen scheint das Protein geringer ins Medium ausgeschleust zu werden. Hierdurch lässt sich auch die Änderung der Proteinkonzentration in den Scherexperimenten erklären. Die Zellen produzieren in den Experimenten genau wie in der Kultivierung Proteine, die sie anschließend teilweise ausschleusen. Die Änderung der Proteinkonzentration der Referenz dürfte dagegen auf die Zerstörung der Zellen und das dadurch freigesetzte Protein zurückzuführen sein.

Die hohe Änderung des relativen LDH-Wertes der Referenz in Bezug auf die substituierten Kulturen bestätigt die geringere Überlebensrate. Die Kultur 25 mit der geringsten Lebendzellzahlabnahme verzeichnet auch die geringste Änderung des LDH-Wertes. Hingegen ist das Verhältnis der Überlebensraten von Kultur 50 und 75 nicht auf die Änderungen des LDH-Wertes übertragbar. Der Unterschied bei dem LDH-Wert ist jedoch gering.

Der Zusatz von Cholsäure erweist sich als wirksames Mittel, um die Schereinwirkung auf Zellen herabzusetzen. Die Addition zum Medium hat keine nachteiligen Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel. Es werden im Vergleich zur Referenz geringere Zellzahlen bei einer Cholsäure-Konzentration von 25 mg/l erreicht, die Produktionsrate von t-PA bei einer Konzentration von 50 mg/l ist aber mit der der Referenz vergleichbar. Zum Einsatz in weiteren Versuchen ist aufgrund der besseren Produktivität eine Konzentration von 50 mg/l der von 25 mg/l vorzuziehen, auch wenn diese eine geringere Reduzierung der Scherempfindlichkeit bewirkt. Im Vergleich zum Additiv Cholesterin werden höhere Überlebensraten bei gleicher Schubspannung erzielt.

Für die **Langzeit-Scherexperimente** wird eine 140 Stunden dauernde Kultivierungsreihe von Cholsäure durchgeführt.

Die Lebendzellzahlen unterscheiden sich in den ersten 43 Stunden nur geringfügig (vgl. Abb. 3.49). Nach diesem Zeitpunkt steigen die Lebendzellzahlen der Referenz und der Kultur 25 kontinuierlich an. Dabei ist die Steigerung bei der Referenz größer als bei Kultur 25. Die Kultur 50 erfährt nach der 45. Stunde zunächst eine mit $32 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter hohe Zellzahlsteigerung. Ab der 68. Stunde ist die Zunahme geringer aber die Zellzahlen steigen auch hier kontinuierlich. Die erreichte Zelldichte der Referenz ist mit $68 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter am höchsten, die der Kultur 25 mit $55 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter am geringsten (81 % der Referenz). Die Zelldichte von Kultur 50 ist mit der der Referenz vergleichbar (96 % der Referenz). Es sind keine offensichtlich durch Cholsäure verursachten Differenzen in den Zellzahlen zu erkennen. Werden die Entwicklungen der Zellzahlen mit denen der Kurzzeit-Experimente von Cholsäure verglichen (s. Abb. 3.46), lässt sich die gleiche Tendenz bei den substituierten Kulturen feststellen. Eventuell sind das schnellere Ansteigen der Lebendzellzahlen in Kultur 50 und die geringere Zunahme der Kultur 25 in Bezug auf die Referenz doch durch Cholsäure bedingt. Das würde bedeuten, dass eine Konzentration von 25 mg/l wachstumshemmend und eine Konzentration von 50 mg/l wachstumsfördernd wirkt. Diese Erklärung ist jedoch unwahrscheinlich, da dann der geringeren Konzentration der toxische Einfluss zukommen würde. Ein einfacher Wirkmechanismus wäre bei diesem Einfluss ausgeschlossen.

Die Wachstumsraten unterliegen in den ersten 68 Stunden starken Schwankungen von über $0,20 \text{ d}^{-1}$. Nach der 68. Stunde liegen die Wachstumsraten der Cholsäure-Kulturen unter der der Referenz (vgl. Tab. 3.23).

Die Vitalität der Referenz ähnelt der von Kultur 25. Beide liegen unterhalb der Vitalität von Kultur 50, deren Wert maximal 14 % höher liegt (vgl. Abb. 3.49). Im Verlauf der Kultivierung sinken die Vitalitäten von Referenz und Kultur 25, während die Vitalität von Kultur 50 bis zur 93. Stunde ansteigt.

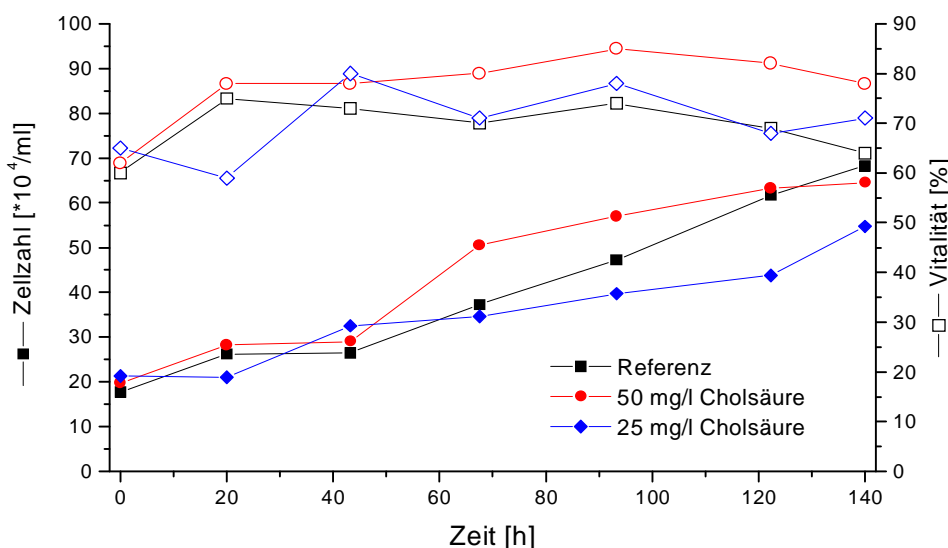


Abb. 3.49 Lebendzellzahl und Vitalität von LCH

Zeit [h]	0	20	43	68	93	122	140
Glukoseverbrauchsrate	--	1,1	0,8	0,7	0,6	0,4	0,5
[mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,0	0,8	0,5	0,4	0,4	0,4
Glukoseverbrauchsrate	--	1,3	0,7	0,2	0,5	0,3	0,5
[mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,1	0,8	0,5	0,2	0,0	0,2
Glukoseverbrauchsrate	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2
[mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,3	0,6	0,2	0,1	0,2	0,1
Glukoseverbrauchsrate	--	1,3	0,7	0,2	0,5	0,3	0,5
[mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,1	0,8	0,5	0,2	0,0	0,2
Laktatproduktionsrate	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2
[mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2
Laktatproduktionsrate	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2
[mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2
Laktatproduktionsrate	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2
[mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2
Laktatproduktionsrate	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2
[mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,1	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2

Tab. 3.22 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von LCH

Den Glukoseverbrauchsrate der drei Kulturen ist gemeinsam, dass sie nach einem ersten Absinken ab der 122. Stunde wieder ansteigen (vgl. Tab. 3.22). Die Referenz besitzt im Durchschnitt die höchsten Raten. Sie liegen, bis auf die der 20. Stunde, während der gesamten Kultivierung über denen von Kultur 25 und 50. Dies bedeutet vor allem für Kultur 50 eine gegenüber der Referenz effizientere Umsetzung der Glukose, da beide Kulturen vergleichbare maximale Zellzahlen erreichen. Die Laktatproduktionsrate der Referenz ähnelt der von Kultur 50 (vgl. Tab. 3.22). Beide zeigen die gleiche Abnahme der Produktionsrate und den anschließenden Wiederanstieg ab der 122. Stunde. Die Laktatproduktionsrate der Kultur 25 fällt mit einer höheren Abnahme auf. Aufgrund der vergleichbaren Verbrauchs- und Produktionsraten von Glukose und Laktat kann eine Belastung der Zellen durch die zugesetzte Cholsäure ausgeschlossen werden.

In den Ergebnissen der analysierten Stoffwechselprodukte Ammonium und Protein zeigen sich unterschiedliche Tendenzen. So ist die Konzentration von Ammonium (vgl. Abb. 3.50) in Kultur 25 am höchsten, was sich auch in der Ammoniumprodukti-

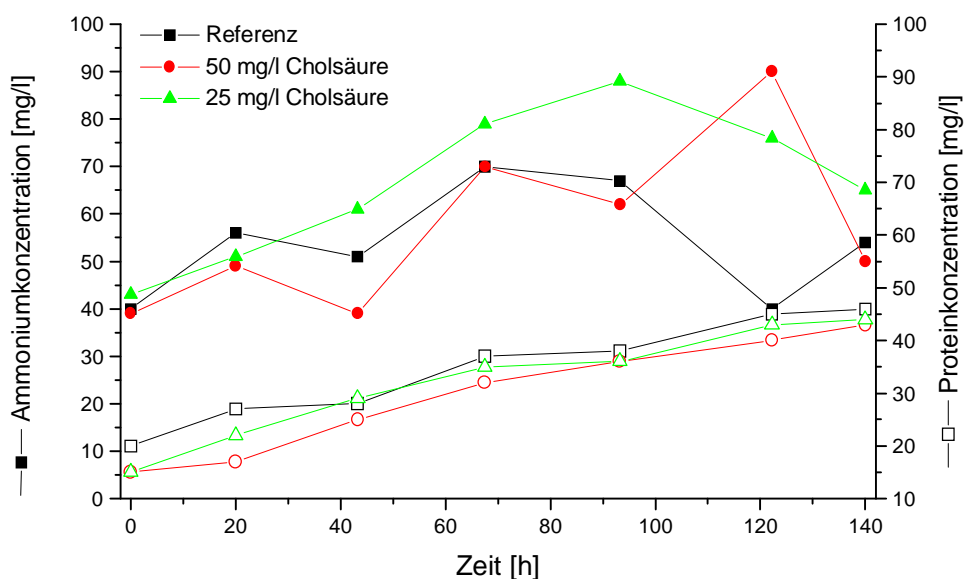


Abb. 3.50 Ammonium- und Proteinkonzentration von LCH

Zeit [h]	0	20	43	68	93	122	140
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Referenz	--	87	0	59	0	0	29
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 50	--	50	0	77	0	39	0
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 25	--	45	39	53	23	0	0
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Referenz	--	676	567	798	527	542	131
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 50	--	515	526	478	312	577	106
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 25	--	608	1069	766	674	595	393
Wachstumsrate [d^{-1}] Referenz	--	0,20	0,00	0,15	0,10	0,10	0,06
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 50	--	0,19	0,01	0,24	0,05	0,04	0,01
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 25	--	0,00	0,20	0,03	0,06	0,03	0,13

Tab. 3.23 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate sowie Wachstumsrate von LCH

onsrate widerspiegelt (vgl. Tab. 3.22). Die Konzentrationen der Referenz und von Kultur 50 sind bis 35 mg/l geringer. Ihre Produktionsraten sind vergleichbar, ähnlich wie ihre Lebendzellzahlen. Die höhere Ammoniumkonzentration kann in Kultur 25 die Ursache des geringeren Zellwachstums nach der 68. Stunde sein, da es sich um einen toxischen Zellmetaboliten handelt.

Wird die Proteinkonzentration betrachtet (vgl. Abb. 3.50), ist während der gesamten Versuchszeit eine in Bezug zu Kultur 25 und 50 vergleichbare Konzentration in der Referenz auffällig. Obwohl sich die Lebendzellzahlen ab der 68. Stunde deutlich unterscheiden, differiert die Konzentration nur gering. Dies kann z.B. durch eine Freisetzung von Protein aus toten Zellen bedingt sein, die unabhängig von der Lebendzellzahl zur Änderung der Konzentration beitragen kann.

Die t-PA-Konzentrationen der drei Kulturen sind bis zur 20. Stunde vergleichbar (vgl. Abb. 3.51). Ab diesem Zeitpunkt steigt die Konzentration der Kultur 25 bis zu einer Endkonzentration von 1400 $\mu\text{g}/\text{l}$ t-PA. Die Kultur 50 erreicht die geringste Endkonzentration mit 1170 $\mu\text{g}/\text{l}$ (84 % der Kultur 25). Die Endkonzentration der Referenz liegt bei 1280 $\mu\text{g}/\text{l}$ (91 % der Kultur 25). Aufgrund der Konzentrationsunterschiede ergeben sich verschiedene Produktionsraten. Die der Kultur 25 liegt mit einem anfänglichen Wert von 608 $\mu\text{g}/\text{l} \cdot \text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$ zwischen den Anfangswerten der Referenz und der Kultur 50. Im Versuchszeitraum sinken die Produktionsraten aller Kulturen. Ab der 43. Stunde liegen die Produktionsraten von Kultur 25 über denen der Referenz und von Kultur 50. Letztere besitzt die geringste Produktionsrate. Hier ähneln sich die Werte der Kultur 50 eher denen der Referenz als denen von Kultur 25.

Die im Anhang aufgeführten Konzentrationen der Aminosäuren zeigen am Ende des Experiments unterschiedliche Konzentrationen an Alanin und Glycin für die Referenz gegenüber den Cholsäure-Kulturen. So besitzt die Referenz in der 140. Stunde eine Alaninkonzentration von 11 mg/l, während die von Kultur 50 mit 34 mg/l mehr als

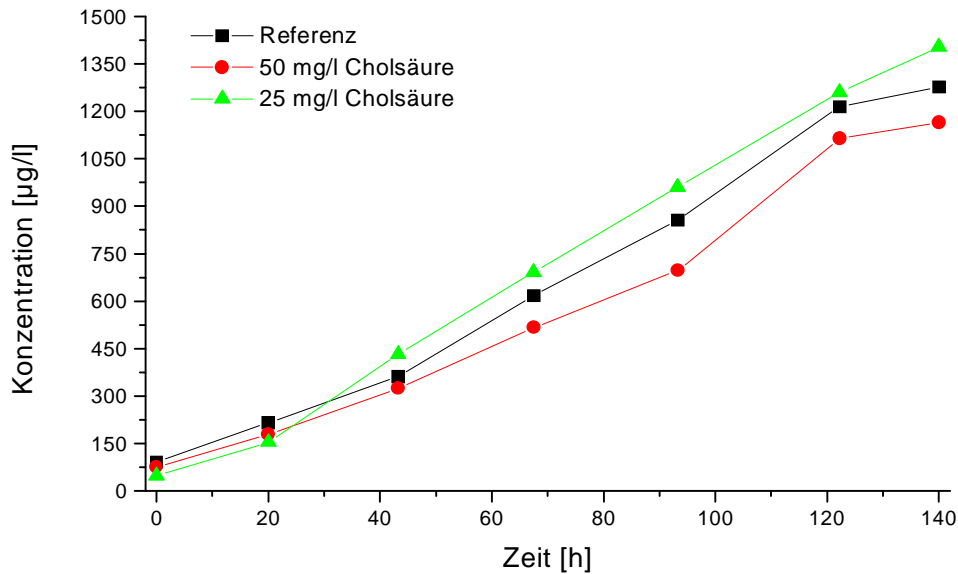


Abb. 3.51 t-PA-Konzentration von LCH

dreimal und die von Kultur 25 mit 27 mg/l mehr als zweimal so hoch ist. Umgekehrt ist es bei der Glycinkonzentration. Hier besitzt die Referenz mit 79 mg/l die höchste Konzentration. Die der Kultur 50 liegt bei 61 mg/l und die von Kultur 25 bei 59 mg/l am Versuchsende. Es gibt keine prägnanten Unterschiede bei der Abnahme der Glutaminkonzentration. Die Anfangskonzentrationen der Kultur 25 und der Referenz sind vergleichbar. Bei Betrachtung der Ab- bzw. Zunahmen der Konzentration der verschiedenen Aminosäuren sind die der substituierten Kulturen eher miteinander vergleichbar als mit der Referenz. Daraus kann auf einen geringfügig veränderten Stoffwechsel der Cholsäure-Kulturen in diesem Langzeit-Experiment geschlossen werden.

Es treten Differenzen in den Lebendzellzahlen auf. Es gibt geringfügige Abweichungen der Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten sowie eine höhere Ammoniumkonzentration in Kultur 25. Die Ergebnisse der anschließenden Langzeit-Scherexperimente können unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Es wird je ein **Langzeit-Scherexperiment** der drei Kulturen durchgeführt. Dabei ergeben sich für die Überlebensraten gravierende Unterschiede. Die Überlebensrate der Referenz ist mit 10 % sehr gering (vgl. Tab. 3.24). Trotzdem ist sie größer als die der Referenz aus Experiment LC mit 0 % (s. Tab. 3.11). Dieser Unterschied lässt sich mit der geringeren Schubspannung von $1,9 \text{ N/m}^2$ in diesem Experiment gegenüber der von $2,0 \text{ N/m}^2$ begründen. In diesem Versuch ist die Überlebensrate der Referenz größer als

	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
R_s [%]	10	0	66
τ [N/m^2]	1,9	2,3	1,9

Tab. 3.24 Überlebensrate und Schubspannung von LCH

Änderung der/des	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	3	1	-4
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-23	-14	-6
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-22	-14	-11
... Vitalität [%]	-60	-84	9
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	1	18	16
... Proteinkonzentration [mg/l]	10	4	-2
... relativen LDH-Wertes [U/l]	56	21	64
... Glukosekonzentration [g/l]	-0,1	0,0	-0,2
... Laktatkonzentration [g/l]	0,1	0,1	0,3
... t-PA-Konzentration [μ g/l]	23	0	152

Tab. 3.25 Analysenwerte von LCH

	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
Wachstumsrate [d^{-1}]	-1,01	--	-0,18
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	0,4	0,0	1,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	0,9	1,9	2,0
Ammoniumproduktionsrate [μ g/d*1 Mio. Ze]	7	253	101
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze]	164	0	963

Tab. 3.26 Raten von LCH

die der Kultur 50, die hier 0 % beträgt. Im Kurzzeit-Experiment ist sie um 26 % geringer (s. Tab. 3.20). Dort ist aber auch die Schubspannung um $0,4 \text{ N/m}^2$ geringer. Die hohe Schubspannung der Kultur 50 in diesem Experiment weicht deutlich von der der anderen Kulturen ab. Sie ist vermutlich auf eine verkehrte Geräteinstellung zurückzuführen und nicht repräsentativ. Infolgedessen sind die Ergebnisse der Kultur 50 nicht zu bewerten. Die größte Überlebensrate besitzt Kultur 25 mit 66 %. Ihre Schubspannung stimmt mit $1,9 \text{ N/m}^2$ mit der der Referenz überein.

Kultur 25 weist die geringste Abnahme der Lebend- und Gesamtzellzahlen auf (vgl. Tab. 3.25). Die Vitalität der Kultur nimmt zu. Außerdem besitzt sie eine der Referenz gegenüber höhere Glukoseverbrauchs-, Ammoniumproduktions- und t-PA-Produktionsrate (s. Tab. 3.26). Die Zellen überleben das Scherexperiment nicht nur, in der Kultur können sogar Raten ermittelt werden, die sich von denen unbelasteter Kultivierungen nur gering unterscheiden. Die Glukoseverbrauchsrate von $1,1 \text{ mg/d*1 Mio. Ze}$ ist der ersten Rate der Referenz mit $1,1 \text{ mg/d*1 Mio. Ze}$ in der Kultivierung äquivalent (s. Tab. 3.22) Die Laktatproduktionsrate ist jedoch doppelt so hoch, was ein deutlicher Hinweis auf den Scherstress, dem die Zellen ausgesetzt sind, ist. Ein weiterer Hinweis auf den Scherstress ist die negative Wachstumsrate, die damit nicht dem Wert in einer Kultivierung entspricht. Die Ammoniumproduktionsrate unterscheidet sich nur um $14 \mu\text{g/d*1 Mio. Ze}$ von der der Referenz in der Kultivierung (s. Tab. 3.23). Ebenso liegt die t-PA-Produktionsrate mit einem Unterschied von $287 \text{ ng/d*1 Mio. Ze}$ zu der Rate der Referenz während der Kultivierung in der glei-

chen Größenordnung (s. Tab. 3.24). Es findet während des Experiments ein den Kultivierungen vergleichbarer Stoffwechsel in den Zellen statt. Dieses trifft auf die Referenz nicht zu.

Anhand der Konzentrationen der Aminosäuren (Daten s. Anhang) ist eine Abnahme der Glutaminkonzentration in Kultur 25 zu erkennen, welche die Aussage über die Existenz von Umsetzungen innerhalb der Zellen und damit des Überlebens der Zellen unterstützt. Auch die Zunahme der Alaninkonzentration unterstützt diese Vermutung, da während einer Kultivierung ohne Scherbelastung die Alaninkonzentration ansteigt. In der Referenz hingegen sind die Änderungen der Konzentrationen dieser beiden Aminosäuren nicht erheblich.

Die Proteinkonzentration in der Referenz steigt vermutlich aufgrund der Freisetzung durch tote Zellen (vgl. Tab. 3.25). Dagegen bleibt die Konzentration in Kultur 25 konstant. Bei der Ammoniumkonzentration verhält es sich umgekehrt (vgl. Tab. 3.25). Weil die Zellen in der Referenz absterben, kann die Konzentration nur gering zunehmen. In Kultur 25 überleben die Zellen dagegen und produzieren während des gesamten Versuches Ammonium. Die Konzentrationszunahme ist dementsprechend hoch.

Eine Schädigung der Zellen ist aber auch in Kultur 25 vorhanden, wie an den vergleichbaren Änderungen des relativen LDH-Wertes zu erkennen ist (vgl. Tab. 3.25).

Die geringfügig nachteiligen Abweichungen der Kultur 25 von der Referenz in der Kultivierung werden im Scherexperiment nicht bestätigt. Sie können im Scherexperiment vernachlässigt werden.

Im Vergleich zu den Kurzzeit-Experimenten nehmen die Überlebensraten bei gleicher Schubspannung ab. Die Abnahmen der Lebend- und Gesamtzellzahlen sind im Langzeit-Experiment höher. Infolgedessen ist die Überlebensrate der Referenz um 44 % und der Kultur 25 um 22 % geringer. Die in den Kurzzeit-Experimenten erhaltenen Ergebnisse werden durch die der Langzeit-Experimente bestätigt.

Das Additiv Cholsäure erweist sich als geeignete Alternative zum Cholesterin hinsichtlich seiner Eigenschaft, die Scherbelastung von kultivierten Zellen zu senken. Beim Langzeit-Experiment wird mit Cholesterin eine Überlebensrate von 23 % erreicht. Mit Cholsäure werden bei geringerer Konzentration bessere Ergebnisse erzielt. Außerdem hat Cholsäure den Vorteil, in wässrigen Medien löslich zu sein und erfordert deswegen keinen Einsatz eines wasserlöslichen Derivates wie beim Cholesterin. Der Einfluss auf den Stoffwechsel der Zellen ist gering und die t-PA-Produktion wird nicht beeinträchtigt.

Es wird eine Kultivierungsreihe mit der dritten Substanz der Gruppe II, **Deoxycholsäure**, durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 4 und 10 mg/l.

Die Lebendzellzahlen der Kultivierungsreihe steigen nach einer Lag-Phase, die bis zur 41. Stunde dauert, zum Kultivierungsende an (vgl. Abb. 3.52). Dabei unterscheiden sich die Zellzahlen nur geringfügig. Die Referenz erreicht in der 89. Stunde die höchste Lebendzellzahl mit $27 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Die am höchsten substituierte Kultur erreicht dagegen eine Endkonzentration von $21 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter (74 % der Referenz). Die Lebendzellzahl beträgt zu dem Zeitpunkt in Kultur 4 $24 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter (90 % der Referenz). Wegen der gering differierenden Lebendzellzahlen weichen die Wachstumsraten voneinander nur in wenigen Punkten ab (vgl. Tab. 3.28). So ist z.B. die Wachstumsrate der Referenz mit $0,03 \text{ d}^{-1}$ gegenüber der von Kultur 10 und gegen Ende des Experiments mit $0,08 \text{ d}^{-1}$ gegenüber der von Kultur 4 größer. Die Wachstumsraten der Kulturen in der 41. und 65. Stunde sind äquivalent. Die Vitalitäten der Kulturen folgen verschiedenen Tendenzen (vgl. Abb. 3.52). Die Vitalität der Referenz und der Kultur 4 nehmen zur 41. Stunde erst ab und steigen zum Versuchsende wieder an. Die Vitalität von Kultur 10 steigt ohne zwischenzeitliche Abnahme zum Versuchsende an.

Die Glukosekonzentrationen differieren in Stunde 18 und 41 sowie in Stunde 89 voneinander (Daten nicht gezeigt). Während der Stunden 18 und 41 sind die Konzentrationen in den substituierten Kulturen bis 0,14 g/l geringer als die der Referenz. In der 89. Stunde ist die der Referenz um 0,25 g/l geringer. Die Glukoseverbrauchsrate liegt aus diesem Grund über denen der substituierten Kulturen (vgl. Tab. 3.27). Die Laktatkonzentration hingegen nimmt nach einem ähnlichen Anfangswert in Kultur 4 und 10 zur 18. Stunde um 0,02 bis 0,08 g/l mehr zu als bei der Referenz (Daten nicht gezeigt). Bereits in der 41. Stunde sind die Laktatkonzentrationen aller drei Kulturen

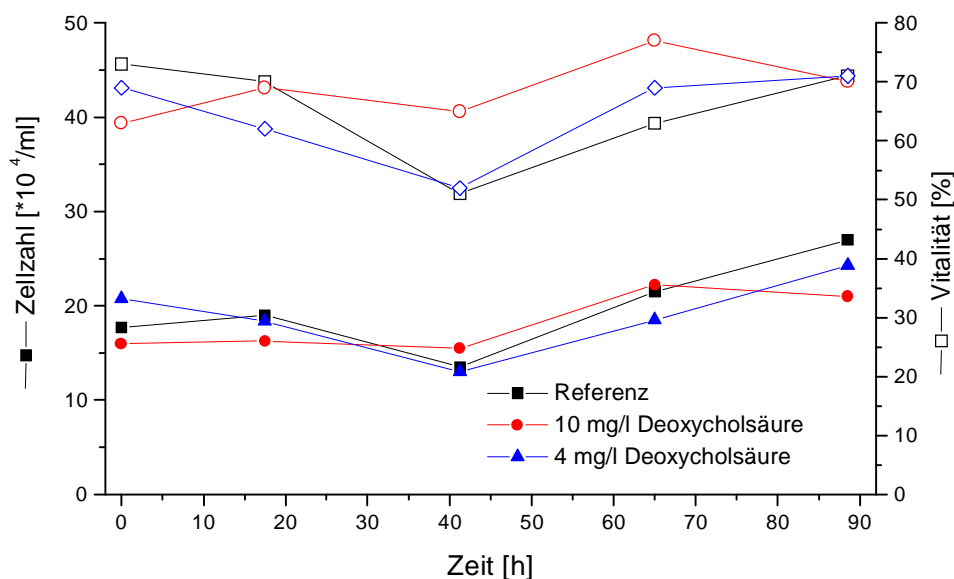


Abb. 3.52 Lebendzellzahl und Vitalität von D01

Zeit [h]	0	18	41	65	89
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,3	0,9	1,0	1,4
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 10	--	1,9	0,8	0,8	0,3
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 4	--	2,2	0,5	0,8	0,4
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,5	1,4	1,0	0,8
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 10	--	2,1	1,4	0,6	0,4
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 4	--	2,0	1,1	0,5	0,5

Tab. 3.27 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von D01

wieder identisch. Nach diesem Zeitpunkt steigt die Konzentration der Referenz auf einen Endwert von 0,81 g/l, wohingegen sie in den substituierten Kulturen einen Wert von 0,67 g/l erreicht. Dieses Verhalten lässt sich bei den Laktatproduktionsraten wiederfinden (vgl. Tab. 3.27). Bis auf den ersten Tag besitzt die Referenz die höchste Produktionsrate der Kulturen.

In Abb. 3.53 ist zu erkennen, dass die größte Ammoniumkonzentration in Kultur 4 vorhanden ist. Die Konzentration von Kultur 10 ist zwar geringer, liegt aber noch über der der Referenz und zeigt im Gegensatz zu dieser eine weiter ansteigende Tendenz. Folglich fällt die Ammoniumproduktionsrate der Referenz stetig ab. Die Produktionsrate der Kultur 4 sinkt im Versuchsverlauf genauso. Ihr Wert ist dabei höher als bei der Referenz. Die Produktionsrate der Kultur 10 variiert sehr stark so dass ihr keine bestimmte Tendenz entnommen werden kann.

Die Proteinkonzentration aller drei Kulturen steigt im Versuchsverlauf an (vgl. Abb. 3.54). Dabei sind die Konzentrationen von Kultur 4 und 10 identisch. Die Proteinkonzentration der Referenz ist um einen nahezu konstanten Betrag höher als die der substituierten Kulturen. Es kann sich hierbei um einen additiven Messfehler handeln.

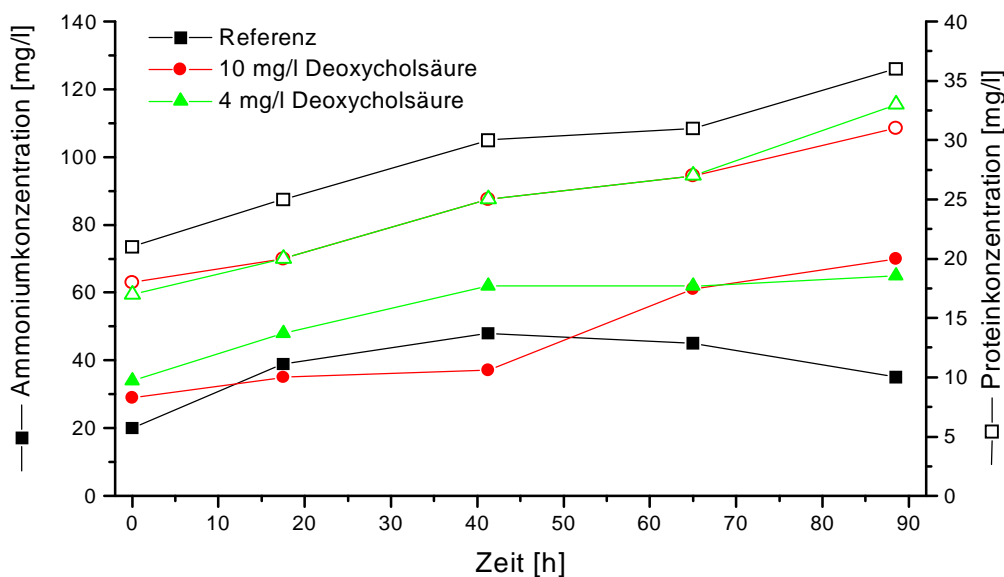


Abb. 3.53 Ammonium- und Proteinkonzentration von D01

Zeit [h]		0	18	41	65	89
Ammoniumproduktionsrate	[$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	-	142	56	0	0
Referenz						
Ammoniumproduktionsrate	[$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	-	51	13	128	43
Kultur 10						
Ammoniumproduktionsrate	[$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	-	98	90	0	14
Kultur 4						
t-PA-Produktionsrate	[$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	1367	168	935	1057
Referenz						
t-PA-Produktionsrate	[$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	383	0	1183	604
Kultur 10						
t-PA-Produktionsrate	[$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	0	1636	58	129
Kultur 4						
Wachstumsrate	[d^{-1}]	--	0,04	-0,15	0,20	0,10
Referenz						
Wachstumsrate	[d^{-1}]	--	0,01	0,16	0,24	-0,03
Kultur 10						
Wachstumsrate	[d^{-1}]	--	-0,07	0,16	0,03	0,12
Kultur 4						

Tab. 3.28 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von D01

Die t-PA-Konzentrationen steigen von der 0. zur 89. Stunde in allen drei Kulturen an (vgl. Abb. 3.54). Die Konzentration nimmt in der Referenz bis auf 522 $\mu\text{g}/\text{l}$ zu. Die der Kultur 10 besitzt in der 89. Stunde mit 265 $\mu\text{g}/\text{l}$ die Hälfte der Referenz. In Kultur 4 liegt die Konzentration bei Versuchsende bei 187 $\mu\text{g}/\text{l}$. Die Produktionsraten

sind wegen der unregelmäßigen Konzentrationszunahmen und Lebendzellzahlen genauso ungeordnet und unterliegen starken Schwankungen von bis zu 1678 $\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$ (vgl. Tab. 3.28). Trotzdem liegt hier aufgrund der durchgehend positiven Raten der Referenz eine konstante Produktion vor.

Bei den im Anhang aufgeführten Konzentrationen der Aminosäuren lassen sich verschiedene Endkonzentrationen bei Glutamin feststellen. Die Kulturen 4 und 10 verbrauchen im gleichen Zeitraum weniger Glutamin. Dagegen ist die Produktion von

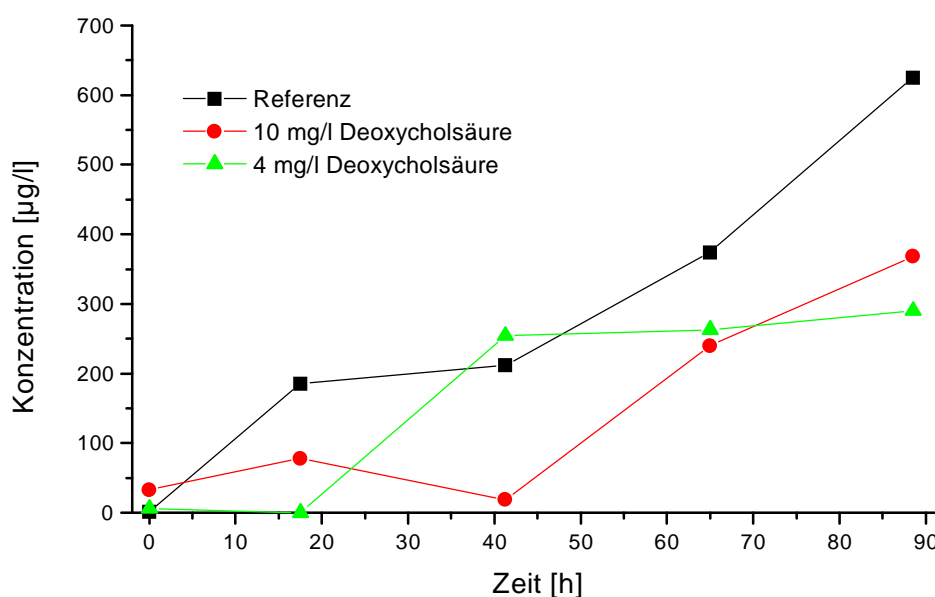


Abb. 3.54 t-PA-Konzentration von D01

Alanin bei den Kulturen vergleichbar. Die restlichen Konzentrationen unterscheiden sich charakteristisch nicht voneinander. Deoxycholsäure fördert die Bildung von Ammonium und scheint für eine geringere Protein- sowie t-PA-Konzentration verantwortlich zu sein. Gleichwohl ist keine relevante Stoffwechseländerung zu beobachten.

Es werden zur Kultivierungsreihe D01 je drei **Kurzzeit-Scherexperimente** durchgeführt. Die Referenz zeigt in diesem Experiment die geringste Überlebensrate mit 6 % (vgl. Tab. 3.29). Die substituierten Kulturen enthalten mit einer Überlebensrate von 29 % bei Kultur 10 und mit 41 % bei Kultur 4 eine höhere Lebendzellzahl nach Versuchsende. Auch hier korrespondiert die hohe Überlebensrate mit einer geringen Schubspannung. Die Schubspannung der Kultur 4 ist mit $1,9 \text{ N/m}^2$ die geringste der Kulturen. Die Referenz besitzt mit $2,0 \text{ N/m}^2$ die höchste Rate und gleichzeitig auch die niedrigste Überlebensrate. Die mit 10 mg/l höher substituierte Kultur besitzt mit einer Schubspannung von $1,9 \text{ N/m}^2$ nur eine Überlebensrate von 29 %. Die höhere Substitution führt hier nicht wie bei der Cholsäure zu einer höheren Überlebensrate.

Die Änderungen der gemittelten Analysenwerte bestätigen die Überlebensraten und Schubspannungen (vgl. Tab. 3.29). So verzeichnet die Kultur 4 mit der geringsten Lebendzellzahlabnahme auch die kleinste Gesamtzellzahlabnahme. Dagegen weist die Referenz in den beiden Bereichen die höchste Abnahme auf. Die Vitalitätsabnahme ist bei der Referenz ebenfalls am höchsten. In Kultur 4 ist sie am geringsten. Auch die Änderung des relativen LDH-Wertes steht in Wechselbeziehung zur Zellzahländerung und ergibt für die Referenz wieder die höchste Änderung.

Werden die Ergebnisse im Zusammenhang mit den Kultivierungsdaten der Kultur D01 betrachtet, so haben sich die anfänglichen Bedenken in Bezug auf die Einsatzfähigkeit der Deoxycholsäure zerstreut. Deoxycholsäure setzt die Scherempfindlichkeit der Zellen, wie in den Kurzzeit-Experimente ermittelt, herab. Zu beachten ist aber

	Referenz	Kultur 10	Kultur 4
Überlebensrate R_s [%]	6	29	41
Schubspannung τ [N/m^2]	2,0	1,9	1,9

Tab. 3.29 Überlebensrate und Schubspannung von D01

Änderung der/des	Referenz	Kultur 10	Kultur 4
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	1	0	-1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-27	-14	-11
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-26	-15	-12
... Vitalität [%]	-63	-29	-17
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	-3	4	7
... Proteinkonzentration [mg/l]	11	18	11
... relativen LDH-Wertes [U/l]	156	147	147

Tab. 3.30 gemittelte Analysenwerte von D01

noch immer die höhere Ammoniumkonzentration in Bezug auf die Referenz. Diese sammelt sich während der Kultivierung in den einzelnen Kulturen an und wird in längeren Versuchen Auswirkungen auf die Zellen haben. Die Annahme über die geringere t-PA-Produktionsrate bei einem Einsatz der Deoxycholsäure darf nicht außer Acht gelassen werden.

3.2.1.3 Gruppe III: Phosphatidylcholin, Testosteron, Retinol

Zur Kultivierungsreihe mit **Phosphatidylcholin** werden Konzentrationen von 25 und 50 mg/l eingesetzt. Es werden die Ergebnisse von PC01 dargestellt.

Die Lebendzellzahl der Referenz unterscheidet sich von denen der mit PC versetzten Kulturen in den in dieser Kultivierungsreihe bereits charakteristisch ab der 17. Stunde nach einer identischen Animpfdichte in der 0. Stunde (vgl. Abb. 3.55). In den substituierten Kulturen durchlaufen die Zellen, vermutlich aufgrund des zugesetzten PCs, zunächst eine Lag-Phase, die bis zur 65. Stunde andauert. Es werden in der 97. Stunde in den substituierten Kulturen 71 % (Kultur 50) bzw. 61 % (Kultur 25) der maximalen Lebendzellzahl der Referenz erreicht. In der Referenz ist eine Lag-Phase nicht zu beobachten. Diese Tatsache ist gut an der Wachstumsrate zu erkennen (vgl. Tab. 3.32). Die Referenz besitzt höhere und im Gegensatz zu den substituierten Kulturen überwiegend positive Wachstumsraten. Diese sind in den PC-Kulturen bis zur 65. Stunde negativ. Die Wachstumsraten der PC-Kulturen sind ab der 97. Stunde mit der Referenz vergleichbar. Die Vitalität verläuft in Übereinstimmung mit den Lebendzellzahlen (vgl. Abb. 3.55). Sie nimmt wie diese in den substituierten Kulturen bis zur 54. bzw. 65. Stunde auf 45 bzw. 41 % ab. Im folgenden steigt sie zur 97. Stunde auf 53 bzw. 57 % an.

Angesichts der geringen Vitalität in den Kulturen bei Versuchsbeginn sind die Bedingungen für die Zellen am Anfang der Kultivierungsreihe nicht optimal. Die Referenz entwickelt sich trotz dieser Umstände positiv: Die Lebendzellzahl nimmt zu und auch die Vitalität steigt. In den substituierten Kulturen findet keine positive Entwicklung statt. Statt dessen verringert sich die Lebendzellzahl und die Vitalität nimmt bis zur 54./65. Stunde ab. Dies kann durch die PC-Zugabe verursacht sein. Eine weitere Möglichkeit wäre die geringe Menge des zugesetzten Ethanol, die schädigend auf die Zellen einwirken könnte. Zwar ist diese Konzentration nicht toxisch, wie anhand des Ethanol-Toxizitätstest festgestellt wurde, jedoch kann bei Zellen mit geringer Vitalität ein Einfluss nicht ausgeschlossen werden.

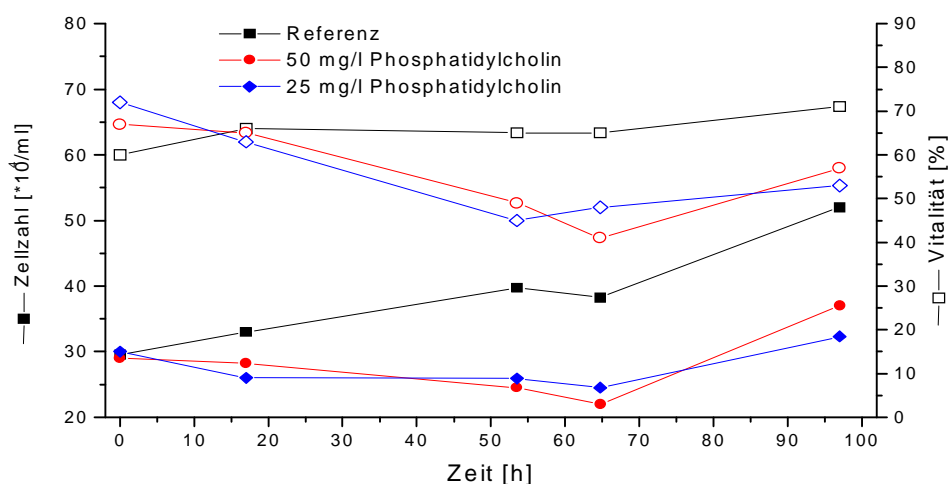


Abb. 3.55 Lebendzellzahl und Vitalität von PC01

Zeit [h]	0	17	54	65	97
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,6	0,8	0,3	0,2
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,8	1,0	0,0	0,6
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,7	1,2	0,7	0,4
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,2	0,8	0,1	0,0
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,8	1,1	0,6	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,9	1,1	0,6	0,2

Tab. 3.31 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von PC01

Die Glukoseverbrauchsrate der substituierten Kulturen sind bis auf zwei Ausnahmen durchgehend höher als die der Referenz (vgl. Tab. 3.31). In der 17. Stunde ist die Rate der Kultur 25 geringer, da die mittlere Zellzahl bei gleicher Differenz der Glukosekonzentration höher ist. Die andere Ausnahme ist die Verbrauchsrate der Kultur 50 zur 65. Stunde. Hier ist die Konzentrationsdifferenz der Glukose gleich Null. Die Zellen der PC-Kulturen benötigen gegenüber der Referenz eine höhere Menge an Glukose. Dieser Aspekt deutet wie die anfängliche Lag-Phase auf eine Belastung der Zellen durch das zugesetzte PC hin. Dadurch, dass sich die Laktatproduktionsraten ähnlich verhalten (vgl. Tab. 3.32), wird diese Annahme bestätigt.

Größere Differenzen in den Ammoniumkonzentrationen der Kulturen treten erst ab der 54. Stunde in Erscheinung (vgl. Abb. 3.56). Aufgrund der höheren Zellzahl in der Referenz ist die Ammoniumkonzentration höher. Das wird anhand der Ammoniumproduktionsrate der Referenz belegt, die im Zeitrahmen von der 54. bis zur 97. Stunde mit denen der substituierten Kulturen analog verläuft (vgl. Tab. 3.32). Anhand der Ammoniumproduktionsrate und -konzentration lässt sich keine Belastung feststellen.

Die Proteinkonzentration der Referenz ist mit der von Kultur 25 vergleichbar. Die Konzentration in der Kultur 50 ist dagegen ab der 17. Stunde gegenüber den anderen Kulturen wesentlich höher. Dies kann nicht auf eine Störung des Tests durch die vor

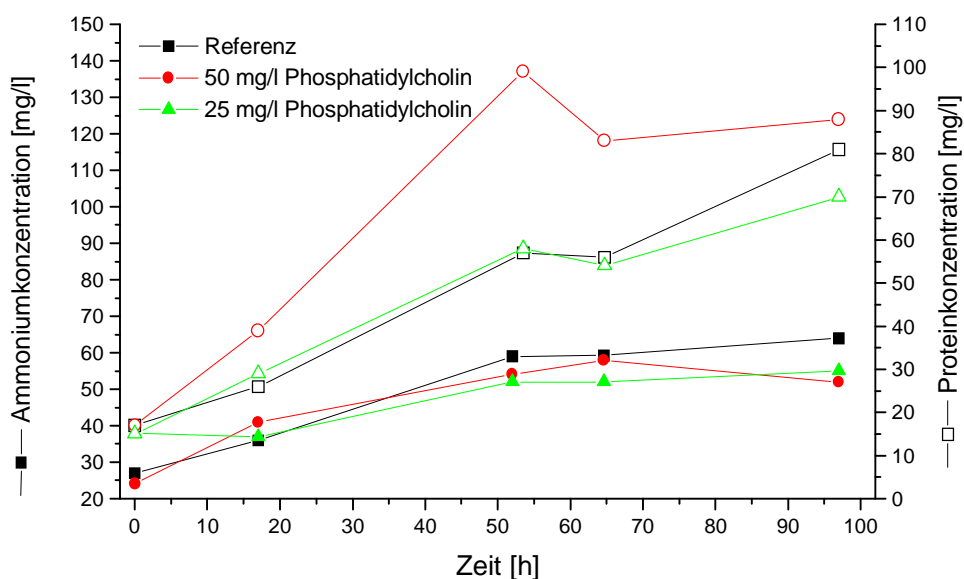


Abb. 3.56 Ammonium- und Proteinkonzentration von PC01

Zeit [h]	0	17	54	65	97
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	41	42	2	8
Referenz					
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	84	33	36	0
Kultur 50					
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	0	38	0	8
Kultur 25					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	921	965	1925	1174
Referenz					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	1198	835	505	0
Kultur 50					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	973	1693	0	1760
Kultur 25					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,07	0,05	-0,04	0,10
Referenz					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	-0,02	-0,04	-0,10	0,17
Kultur 50					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	-0,09	0,00	-0,05	0,09
Kultur 25					

Tab. 3.32 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von PC01

handene Konzentration an Ethanol zurückzuführen sein. Laut Herstellerangaben (Pierce 1998) sind bis zu 10 % Ethanol ohne Einfluss auf die Bestimmung der Proteinkonzentration. In Kultur 50 sind 0,1 % Ethanol vorhanden. Ein additiver Messfehler kann ebenfalls nicht vorliegen, weil zum einen die Anfangskonzentrationen der Kulturen identisch sind und zum anderen die Unterschiede dann um einen konstanten Betrag von denen der anderen Kulturen abweichen sollten. Die hohe Proteinkonzentration der Kultur 50 ist demnach durch die Zellen bedingt.

Die t-PA-Konzentration ist in den Kulturen bis zur 17. Stunde äquivalent (vgl. Abb. 3.60). Es treten nur geringe Unterschiede auf. Nach der 17. Stunde steigt die Konzentration in der Referenz bis auf 1905 $\mu\text{g}/\text{l}$ an. Dagegen sinkt die t-PA-Konzentration in Kultur 50 auf 443 $\mu\text{g}/\text{l}$ ab. Die weitere Produktion von t-PA wird demnach eingestellt (vgl. auch Tab. 3.32) bzw. vorhandenes t-PA vermutlich durch ins Medium gelangte intrazelluläre Proteasen abgebaut. In Kultur 25 findet wie in der Referenz eine Zunahme der t-PA-Konzentration statt. Der Endwert der Konzentration ist um 400 $\mu\text{g}/\text{l}$ bzw. 21 % (bezogen auf die Referenz) geringer als der der Referenz.

Die t-PA-Produktionsraten sind in der 17. Stunde vergleichbar (vgl. Tab. 3.32). Ab der 54. Stunde nimmt die Produktionsrate der Referenz bis auf ein Maximum von 1925 $\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$ zu, während sie in Kultur 50 auf 0 $\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$ absinkt. Die Produktionsrate der Kultur 25 ist im Vergleich zu der der Referenz größer. Die Menge an produziertem t-PA ist für die vorliegenden Zellzahlen dementsprechend höher als die der Referenz. Dies lässt sich auch durch einen Vergleich der Lebendzellzahlen belegen: bezogen auf die Referenz sind die Zellzahlen der Kultur 25 in der 97. Stunde um 39 %, die t-PA-Konzentration jedoch nur um 21 % bezogen auf die Referenz geringer.

Werden die Konzentrationen der Aminosäuren der Kulturen verglichen (Daten s. Anhang), ist die Glutaminkonzentration der Referenz aufgrund der höheren Zellzahlen elf Stunden vorher als in Kultur 50 verbraucht. Kultur 25 verstoffwechselt dagegen die gleiche Glutaminkonzentration innerhalb von 65 Stunden, obwohl weni-

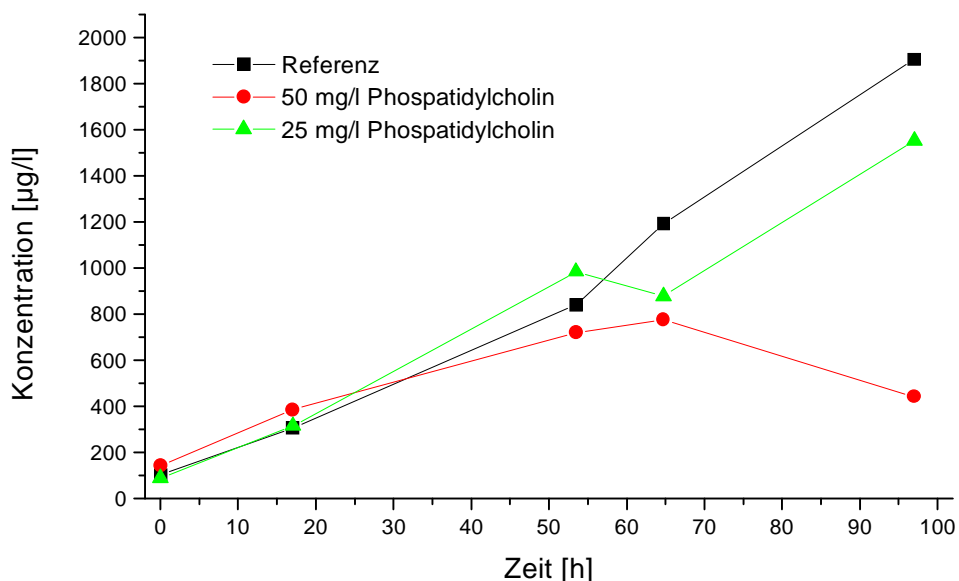


Abb. 3.57 t-PA-Konzentration von PC01

ger lebende Zellen in der Kultur vorhanden sind als in der Referenz. Das aufgenommene Glutamin wird als Glutaminsäure gespeichert. In Kultur 25 sowie in Kultur 50 ist die maximale Konzentrationen der Glutaminsäure um 33 bzw. 27 mg/l höher als die anfängliche. Bei der Referenz nimmt sie nur um 19 mg/l zu. Die Alaninproduktion in Kultur 25 setzt im Gegensatz zur Referenz und Kultur 50 erst in der 65. Stunde ein. In der Referenz und in Kultur 50 beginnt diese schon in der 17. Stunde. Hinweise auf einen Messfehler liegen nicht vor. Er kann aber aufgrund der ungewöhnlichen Konzentrationszunahme nicht ausgeschlossen werden.

Der Einsatz von PC zur Scherreduzierung für Zellen ist nicht unproblematisch. Das PC erzeugt eine verlängerte Lag-Phase, so dass die Zellzahlen in den ersten 65 Stunden einen Wert von $25 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter nicht übersteigen. In den Kulturen finden sich erhöhte Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten wieder, was ein Zeichen für eine Belastung der Zellen ist. Jedoch werden keine erhöhten Ammoniumproduktionsraten festgestellt. Die Konzentrationsänderungen der Aminosäuren der substituierten Kulturen zeigen den Stoffwechsel einer geringeren Zellpopulation, die in diesen Kulturen vorliegt. Die t-PA-Produktionsrate der Kultur 25 ist mit der der Referenz vergleichbar, so dass hier keine Auswirkungen des PCs festzustellen sind. In Kultur 50 ist diesbezüglich eine negative Auswirkung des zugesetzten PCs zu vermuten.

	PC01 A	PC01 B	PC01 C	Mittelwert
R_s [%] Referenz	58	(16)	28	34 (43)
R_s [%] Kultur 50	50	(0)	60	37 (55)
R_s [%] Kultur 25	47	(26)	72	48 (60)
τ [N/m^2] Referenz	1,7	(1,9)	1,9	1,8 (1,8)
τ [N/m^2] Kultur 50	2,0	(1,9)	2,1	2,0 (2,0)
τ [N/m^2] Kultur 25	1,8	(1,8)	1,9	1,8 (1,8)

Tab. 3.33 Überlebensraten- und Schubspannungen von PC01, () Berechnung ohne Versuch B

Es werden je drei **Kurzzeit-Scherexperimente** der Kultivierungsreihe PC01 durchgeführt. Dabei sind die Überlebensraten der Referenz und der Kultur 50 mit 34 und 37 % vergleichbar (vgl. Tab. 3.33). Ihre Schubspannungen differieren um $0,2 \text{ N/m}^2$. Die Referenz ist einer niedrigeren Scherbelastung ausgesetzt als die Kultur 50. Kultur 25 besitzt eine Überlebensrate von 48 % und eine mit der Referenz übereinstimmende Schubspannung. Bei gleicher Belastung ist die Lebendzellzahl in Kultur 25 höher als in der Referenz. Werden die drei durchgeführten Versuche betrachtet, fallen deutlich geringere Überlebensraten in Versuch B auf. Für eine Bewertung der Kulturen macht es keinen Unterschied, ob diese Daten (ebenso wie die gemittelten Analysenwerte) für diesen Versuch in die Mittelwerte einbezogen oder außen vor gelassen werden. Das Verhältnis der Ergebnisse zueinander ändert sich nicht. Mit Berücksichtigung der bereits durchgeführten Versuche, ist die Betrachtung der aus den Versuchen A und C gewonnenen Mittelwerte sinnvoller.

Ein deutlich positives Ergebnis lässt Kultur 25 hinsichtlich der Abnahme von Gesamt- und Lebendzellzahlen erkennen (vgl. Tab. 3.34). Die genannten Zellzahlabnahmen der Kultur 25 sind mit $9 \cdot 10^4$ und $10 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter im Gegensatz zu $18 \cdot 10^4$ und $13 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter bei Kultur 50 und $17 \cdot 10^4$ und $18 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter bei der Referenz geringer. Die geringste Vitalitätsabnahme liegt mit 15 % in Kultur 50 vor, die höchste verzeichnet mit 31 % die Referenz.. Die Änderung des relativen LDH-Wertes ist bei den Kulturen 25 und 50 identisch. Beide sind um einen Betrag von 7 U/l geringfügig höher als der Wert der Referenz.

Die Änderungen bei den Zellzahlen stützen die Aussage die den Überlebensraten entnommen werden kann. Wegen der LDH-Werte sollten vergleichbare Überlebensraten bzw. Vitalitätsänderungen zu erwarten sein, da auch die LDH-Änderungen vergleichbar sind. Eine mögliche Ursache der ähnlichen LDH-Differenzen bei verschiedenen Überlebensraten ist die unterschiedliche Menge an LDH in den einzelnen Zellen. Aufgrund des schnelleren und größeren Wachstums der Referenz wäre ein geringerer LDH-Gehalt in den einzelnen Zellen denkbar. Aus diesem Grund würde die LDH-Wert-Änderung bei der Zerstörung einer größeren Anzahl von Lebendzellen vergleichbar sein mit der einer Zerstörung von einer geringeren Anzahl langsam wachsender Zellen (mit einem höheren LDH-Gehalt).

Änderung der/des	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	2	-4	1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-18	-13	-10
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-17	-18	-9
... Vitalität [%]	-31	-15	-19
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	7	1	7
... Proteinkonzentration [mg/l]	10	6	19
... relativen LDH-Wertes [U/l]	80	87	87

Tab. 3.34 gemittelte Analysenwerte von PC01

Die Änderung der Ammoniumkonzentration ist in Kultur 25 und in der Referenz gleich, in Kultur 50 dagegen liegt keine Änderung vor. Es treten keine durch die Zugabe von PC bedingten Unterschiede auf.

Die höchste Änderung der Proteinkonzentration mit 19 mg/l weist Kultur 25 auf. Demnach sollte in dieser Kultur auch die Zerstörung der Zellen am höchsten sein. Vermutlich geben hier die Zellen, da sie anhand der ermittelten Zellzahlen sichtlich nicht zerstört werden, einen höheren Anteil an Protein ins Medium ab, um hierdurch eventuell den Scherstress zu senken.

Angesichts der deutlich höheren Überlebensrate der Kultur 25 sollten die gemittelten Analysenwerte in positiver Hinsicht stärker von denen der anderen Kulturen abweichen, z.B. durch eine niedrigere Vitalitätsabnahme. Aufgrund der teilweise widersprüchlichen Daten der Überlebensraten und der Analysenwerten kann keine eindeutige Aussage über eine Reduzierung der Scherempfindlichkeit der Zellen durch PC getroffen werden. Aus diesem Grund wird zur besseren Beurteilung eine längere Kultivierungsreihe für ein Langzeit-Scherexperiment durchgeführt, so dass entweder die Aussagen für oder gegen eine Reduzierung der Scherempfindlichkeit gestärkt werden können.

Die Kultivierungsreihe LPC01 dauert 158 Stunden für die **Langzeit-Scherexperimente**. Es werden PC-Konzentrationen von 25 und 50 mg/l eingesetzt.

In Abb. 3.58 sind die Lebendzellzahlen der Kulturen dargestellt. In allen drei Kulturen sind die Lebendzellzahlen bis zur 85. Stunde äquivalent. In den substituierten Kulturen tritt nach dem Animpfen keine durch PC verursachte Abnahme der Lebendzellzahlen wie dies in Kultur PC01 der Fall ist (s. Abb. 3.55). Der Rückgang der Zellzahlen gegen Ende des Versuches ist in allen Kulturen ähnlich. Nach der 85. Stunde setzt das exponentielle Wachstum in den Kulturen ein. Dabei ist die höchste Zunahme der Lebendzellzahl in der Referenz zu verzeichnen. Sie erreicht in der 140. Stunde ein Maximum von $90 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Zur gleichen Zeit sind Maxima der Lebendzellzahlen in den substituierten Kulturen zu erkennen. Die Kultur 50 besitzt mit $54 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter das kleinste Maximum (60 % der Referenz), das der Kultur 25 liegt bei $68 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter (76 % der Referenz). Die Wachstumsraten der einzelnen Kulturen variieren über einen Bereich von $-0,195$ bis $0,338 \text{ d}^{-1}$ (vgl. Tab. 3.35). Dabei steigen sie nach einer Abnahme in der 36. Stunde für die Referenz und Kultur 50 bis zur 113. bzw. 85. Stunde an. Danach nimmt die Wachstumsrate wieder ab. In Kultur 25 ist die Wachstumsrate in der 16. Stunde negativ. Nach diesem Zeitpunkt schwanken die Werte für die Wachstumsrate innerhalb eines positiven Bereich. Die höchste Wachstumsrate weist die Referenz in der 113. Stunde auf. Zum gleichen Zeitpunkt erreicht auch Kultur 25 ihre maximale Wachstumsrate. Die geringste maximale Wachstumsrate ist in Kultur 50 in der 59. Stunde zu finden. Die unterschiedliche Höhe der Wachstumsraten kann auf einen Einfluss des PCs hindeuten. Ebenso können die verschiedenen maximalen Lebendzellzahlen durch die Zugabe von

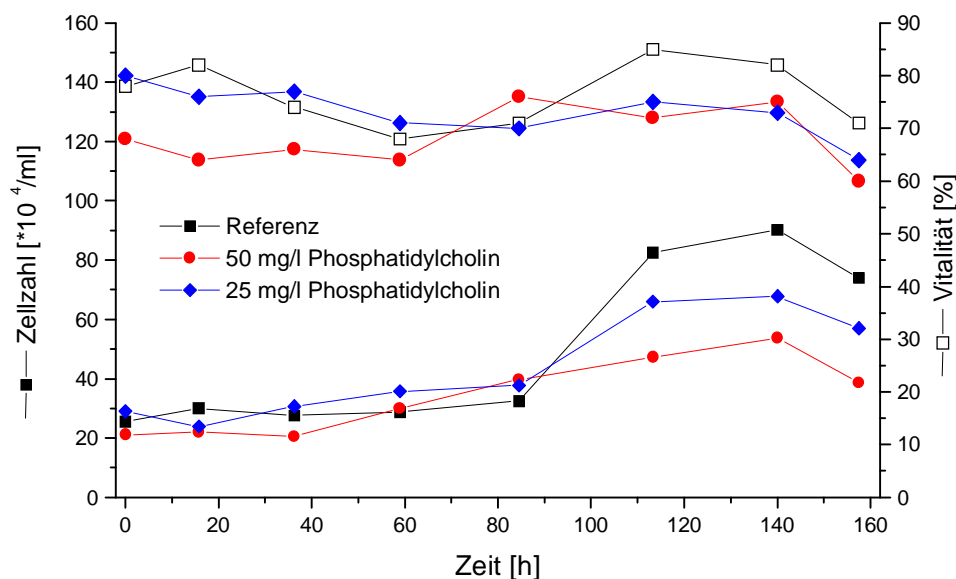


Abb. 3.58 Lebendzellzahl und Vitalität von LPC01

PC bedingt sein. Mit der Höhe der zugegebenen Menge an PC nehmen maximale Lebendzellzahl und Wachstumsrate ab.

Die Vitalität von Kultur 25 ist in den ersten 85. Stunden mit der der Referenz vergleichbar. Ihre Vitalität ist in diesem Abschnitt größer als die der Kultur 50. Ab der 113. Stunde ähnelt die Vitalität von Kultur 25 der von Kultur 50. In diesem zweiten Kultivierungsabschnitt liegen beide unter der Vitalität der Referenz. In Kultur 25 tritt während der Kultivierung ein Vitalitätsverlust auf. Die Vitalitäten der Kultur 50 und der Referenz bewegen sich um einen mittleren Wert von 67 bzw. 77 %. Die geringere Vitalität im zweiten Abschnitt kann durch das zugegebene PC verursacht sein.

Die Glukoseverbrauchsrate der Kulturen 25 und 50 liegen zwischen der 36. und der 113. Stunde unter der der Referenz (vgl. Tab. 3.35), weichen aber nur unerheblich von ihr ab. Ihre Laktatproduktionsraten sind der der Referenz vergleichbar (vgl. Tab.3.35). Aufgrund der geringen Abweichungen ist die Kultur 25 der Referenz ähnlicher als die Kultur 50. Es treten keine durch PC verursachten höheren Raten auf.

Zeit [h]	0	16	36	59	85	113	140	158
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,6	0,9	1,1	0,4	0,8	0,4	0,3
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,8	0,9	0,8	0,2	0,2	0,6	0,6
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,8	0,6	0,9	0,3	0,6	0,5	0,4
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,6	1,3	0,3	0,2	0,6	0,3	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,9	1,4	0,5	0,1	-0,1	0,4	0,5
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,4	1,3	0,4	-0,1	0,5	0,3	0,3

Tab. 3.35 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von LPC01

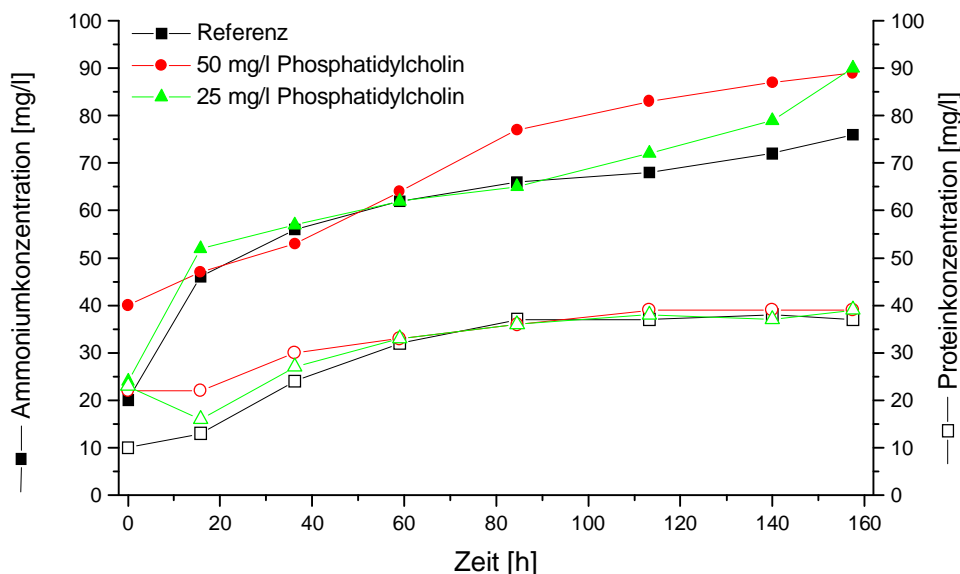


Abb. 3.59 Ammonium- und Proteinkonzentration von LPC01

Die Ammoniumkonzentration ist mit Ausnahme des Anfangswertes bis zur 59. Stunde ähnlich (vgl. Abb. 3.59). Ab Stunde 85 bzw. 113 ist in den substituierten Kulturen die Ammoniumkonzentration höher als in der Referenz. Die Produktionsrate der Referenz nimmt kontinuierlich ab. Die Ammoniumproduktionsrate der Kultur 25 nimmt bis zur 85. Stunde ebenfalls ab und liegt im Bereich zwischen der 36. und der 85. Stunde unter der der Referenz. Danach steigt die Produktionsrate wieder an. Bis zum Kultivierungsende liegt sie über der Produktionsrate der Referenz. Die Produktionsrate der Kultur 50 liegt zwischen der 36. und der 140. Stunde über der der Referenz. Die höheren Ammoniumproduktionsraten der substituierten Kulturen lassen auf einen Einfluss des PC schließen.

Zeit [h]	0	16	36	59	85	113	140	158
Ammoniumproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	143	41	22	12	3	4	7
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	50	33	46	35	12	7	6
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	161	21	16	8	11	9	24
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	692	0	146	104	212	9	90
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	865	22	84	24	104	43	59
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	29	249	64	49	63	19	310
Wachstumsrate [d⁻¹] Referenz	--	0,10	-0,04	0,02	0,05	0,34	0,04	-0,12
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 50	--	0,03	-0,04	0,17	0,12	0,06	0,05	-0,20
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 25	--	-0,13	0,13	0,07	0,02	0,20	0,01	-0,10

Tab. 3.36 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von LPC01

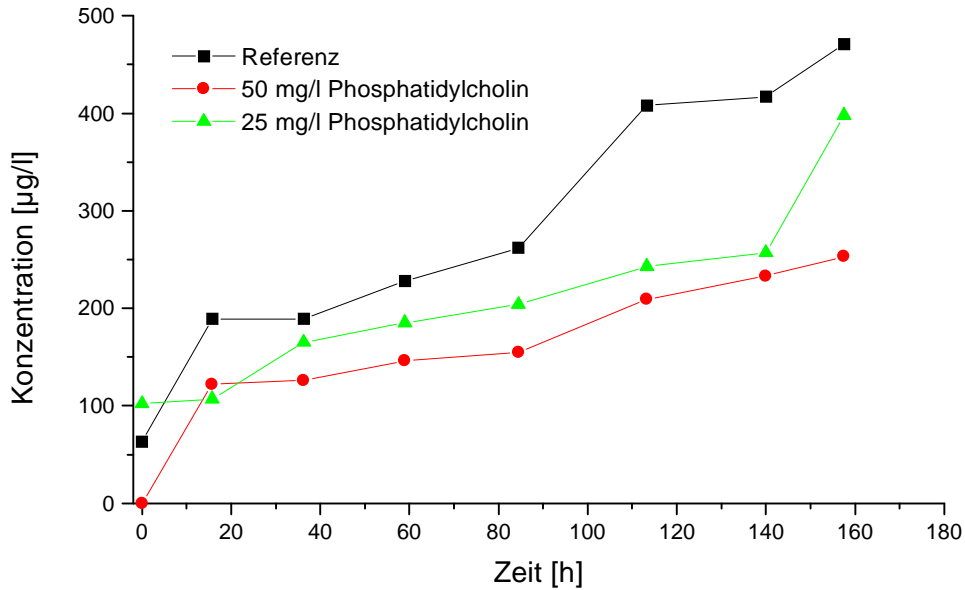


Abb. 3.60 t-PA-Konzentration von LPC01

Die Proteinkonzentrationen differieren nur bis zur 36. Stunde. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Konzentrationen der substituierten Kulturen um bis zu 12 mg/l höher als die der Referenz. Ab Stunde 59 ist kein gravierender Unterschied mehr wahrnehmbar. Trotz der unterschiedlichen Zellzahlen ist keine Änderung der Konzentration zu erkennen. Dies lässt auf eine hohe Produktion in den Kulturen mit den geringeren Zellzahlen schließen bzw. auf eine geringe Proteinproduktion in der Referenz. Das PC als Stressfaktor kann der Auslöser für die höhere Produktion sein.

Die t-PA-Konzentration ist in der Referenz am höchsten (vgl. Abb. 3.60). Die Konzentrationen der substituierten Kulturen liegen bis zum Kultivierungsende darunter. In Kultur 25 werden 85 % und in Kultur 50 nur 54 % der Konzentration der Referenz erreicht. Ein Einfluss des PCs ist aufgrund dessen nicht auszuschließen und scheint von der Höhe der zugegebenen PC-Konzentration abhängig zu sein. Die Produktionsraten der drei Kulturen differieren um bis zu 1204 ng/d*1 Mio. Ze (vgl. Tab. 3.36). Die Raten der Referenz liegen überwiegend über denen der substituierten Kulturen bzw. sind ihnen vergleichbar.

Bei den Konzentrationen der Aminosäuren sind Unterschiede bei der Glutaminsäure-Konzentration festzustellen (Daten s. Anhang). In der Referenz wird hier ein Maximalwert von 40 mg/l in der 36. Stunde erreicht. Die Kulturen 25 bzw. 50 erreichen dagegen eine Glutaminsäure-Konzentration von maximal 29 mg/l in der 36. bzw. 59. Stunde. Das heißt also, das verstoffwechselte Glutamin wird nicht als Glutaminsäure gespeichert, sondern gleich weiter zur Energiegewinnung umgesetzt. Eine mögliche Ursache kann das zugesetzte PC sein. Dies ist aber aufgrund der vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten der einzelnen Aminosäuren schwierig zu beurteilen und könnte auch durch die unterschiedlichen Anfangskonzentrationen des Glutamins bedingt sein. Die Änderung der Glutamin- und Alaninkonzentration der Kulturen ist vergleichbar.

In dieser Kultivierungsreihe sind die Lebendzellzahlen der Kulturen in den ersten Stunden äquivalent. Die substituierten Kulturen erreichen nicht die Zellzahlen wie die Referenz. Ihre Vitalitäten sind gegen Ende des Experiments geringer als die der Referenz. Die Laktatproduktionsraten sind am Versuchsbeginn geringfügig höher. Es wird in den substituierten Kulturen eine höhere Ammoniumkonzentration erreicht. Die t-PA-Produktionsrate ist teilweise geringer.

Durch den Zusatz von PC werden die sonst möglichen Zellzahldichten nicht erreicht. Die wahrscheinlich durch PC bedingte niedrigere t-PA-Produktionsrate ist ebenfalls ein negativer Faktor in Bezug auf eine Optimierung des Kultivierungsprozesses. Trotz dieses Hinweises auf ein verändertes Stoffwechselverhalten sind keine relevanten Änderungen in den Konzentrationen der Aminosäuren zu beobachten, die unterschiedlichen Maxima der Glutaminsäure ausgenommen.

Es werden vier **Langzeit-Scherexperimente** durchgeführt. Das Experiment mit Kultur 25 wird zweimal durchgeführt, um einen zusätzlichen Vergleichswert zu erhalten, und die Werte werden gemittelt. In diesem Experiment sind die Überlebensraten der substituierten Kulturen sehr gering (vgl. Tab. 3.37). Die Überlebensrate der Referenz liegt mit 10 % deutlich höher. Interessant ist, dass bei gleicher Schubspannung für die Referenz und Kultur 50 die Überlebensrate der Referenz um das Fünffache höher ist. In Kultur 25 ist die Belastung der Zellen bei einer Schubspannung von $2,0 \text{ N/m}^2$ geringer, trotzdem überleben weniger Zellen. Im Vergleich zum Kurzzeit-Scherexperiment sind die Überlebensraten geringer und die Scherbelastung ist geringfügig höher (s. Tab. 3.33). Darüber hinaus sind die Überlebensraten der substituierten Kulturen im Langzeit-Experiment geringer als die der Referenz, was sich schon in den Analyseergebnissen der Kurzzeit-Experimente angedeutet hat (s. dort).

Die Abnahme der Lebendzellzahlen ist mit $29 \cdot 10^4$ bzw. $28 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter bei der Referenz und Kultur 50 in den Experimenten vergleichbar (vgl. Tab. 3.38). Die Abnahme in Kultur 25 ist um $4 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter höher. Bei der Abnahme der Gesamtzellzahl liegen die substituierten Kulturen mit $39 \cdot 10^4$ und $37 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter über der Abnahme der Referenz. Auffällig ist die hohe Vitalitätsabnahme in den substituierten Kulturen. Die Vitalitätsabnahme der Referenz beträgt 42 %, die der Kultur 50 dagegen 57 % und Kultur 25 besitzt eine Vitalitätsabnahme von 67 %. Dies lässt auf gegenüber Scherstress anfälligere Zellen in den substituierten Kulturen schließen. Auch die bei den substituierten Kulturen höhere Änderung der Ammoniumkonzentration zeigt, dass die Zellen bei gleicher Belastung wie in der Referenz dem Scherstress in geringerem Maße

	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
R_s [%]	10	0	2
τ [N/m^2]	2,1	2,1	2,0

Tab. 3.37 Überlebensraten und Schubspannungen von LPC01

Änderung der/des	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	-3	-7	1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-29	-28	-32
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-31	-39	-37
... Vitalität [%]	-42	-57	-68
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	6	25	15
... Proteinkonzentration [mg/l]	5	6	22
... relativen LDH-Wertes [U/l]	40	6	121
... Glukosekonzentration [g/l]	0,0	0,0	0,0
... Laktatkonzentration [g/l]	0,1	0,1	0,1
... t-PA-Konzentration [μ g/l]	0	0	95

Tab. 3.38 Analysenwerte von LPC01

	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
Wachstumsrate [d^{-1}]	-0,99	--*	-0,78
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	0	0	0
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	0,7	0,5	0,6
Ammoniumproduktionsrate [μ g/d*1 Mio. Ze]	34	177	92
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze]	0	0	537

Tab. 3.39 Raten von LPC01, * keine Berechnung möglich

widerstehen können. Eine höhere Produktion ist meist Ausdruck von chemischem (z.B. PC) bzw. physikalischem (z.B. Schereinwirkung) Stress (vgl. Tab. 3.39).

Die Glukosekonzentration ändert sich während des Experiments in allen drei Kulturen nicht. Dementsprechend ist auch die Glukoseverbrauchsrate gleich Null. Die Änderung der Laktatkonzentrationen sowie der Produktionsraten sind in den Kulturen gleich bzw. ähnlich. Es treten keine von PC abhängigen Änderungen auf.

Bei der Änderung der Proteinkonzentration fallen für Kultur 50 und die Referenz geringe Werte, für Kultur 25 dagegen hohe Werte auf. Es scheint, dass Kultur 25 unter der Schereinwirkung mehr Protein produziert als die anderen Kulturen. Diese Tendenz ließ sich bereits dem Kurzzeit-Experiment entnehmen (s. Tab. 3.34). Die Änderungen der Proteinkonzentration in den anderen beiden Kulturen ist mit den schon besprochenen vergleichbar (s. dort).

Bei der Änderung des relativen LDH-Wertes fällt ebenfalls ein sehr hoher Wert bei Kultur 25 auf. Die geringste Änderung weist Kultur 50 auf. Dies widerspricht der geringen Überlebensrate der Kultur 50. Wird angenommen, dass die Zellen in Kultur 50 im Gegensatz zu Kultur 25 relativ schnell im Scherexperiment absterben, löst sich der Widerspruch auf. In diesem Fall wäre die ins Medium gelangte Menge an LDH über einen längeren Zeitraum der Zersetzung ausgesetzt als das LDH in Kultur 25. Auch würde diese Annahme die geringe Änderung der Proteine erklären, da das Protein in

diesem Zeitraum durch Proteasen abgebaut werden könnte. Demnach wäre die hohe LDH-Änderung bei Kultur 25 nicht außergewöhnlich, sondern nur durch eine langsameres Absterben der Zellen bedingt. Der mittlere Wert der Referenz entspricht einer vorhandenen langsamen Zellzerstörung, die gegenüber Kultur 25 geringer ist.

Die t-PA-Produktionsrate der Kultur 25 ist wie die Änderung der t-PA-Konzentration am größten. Hierbei kann es sich um das produzierte t-PA handeln, das in den Zellen vorhanden ist und durch die Zellauflösung ins Medium gelangt. Demnach sollte aufgrund der Zerstörung der Zellen die Änderung der t-PA-Konzentration in Kultur 50 größer sein. Auch hier kann wieder mit der schnelleren Zerstörung der Zellen in Kultur 50 argumentiert werden. In diesem Fall gilt wie für die Änderung der Proteinkonzentration der Abbau des t-PAs durch Proteasen. In der Referenz halten sich Zellzerstörung und t-PA-Freisetzung sowie der t-PA-Abbau die Waage. Es wird keine Zunahme der t-PA-Konzentration verzeichnet.

Die Konzentrationen der Aminosäuren geben keinen weiteren Aufschluss über Stoffwechselforgänge in den Zellen (Daten s. Anhang). Die Änderungen der Aminosäuren sind zu gering um genaue Aussagen treffen zu können.

Anhand der ermittelten Überlebensraten sowie der festgestellten Änderungen der Gesamtzellzahl und der Vitalität sowie der Ammonium und der Proteinkonzentration kann ein Zusatz mit Phosphatidylcholin nicht empfohlen werden. Auch zeigen sich in der Kultivierung bei den Lebendzellzahlen Unterschiede, die wahrscheinlich auf die Einwirkung des PCs zurückzuführen sind. Daher wird PC nicht in den Temperatur-Experimenten eingesetzt. Weil es aber neben dem Cholesterin als einziges Lipid in der Zellmembran vorkommt, wird es in den Kombinationsversuchen verwendet.

Die zweite Substanz der Gruppe III ist **Testosteron**. Es wird eine Kultivierungsreihe T01 mit den Konzentrationen von 75 und 150 mg/l Testosteron durchgeführt. Da in der Kultivierungsreihe T01 die Referenz nach der 19. Stunde nicht mehr zur Verfügung steht, werden die relevanten Daten mit denen der Referenz der schon beschriebenen Kultur LC verglichen, da diese die gleiche Animpfdichte besitzt. Bei der Beurteilung der Werte wird dieses mit berücksichtigt.

Die Lebendzellzahl der Kultur 150 durchläuft von der 0. zur 19. Stunde eine Lag-Phase (vgl. Abb. 3.61). Die Zellzahl sinkt dabei gering um $1 \cdot 10^4$ Ze/ml ab. Die Lebendzellzahl der Kultur 75 durchläuft keine Lag-Phase sondern wächst geringfügig bis zur 44. bzw. 70. Stunde mit einem Maximum von $28 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Die Zellzahl der Kultur 150 erreicht in der 70. Stunde eine höhere Dichte mit $40 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Die Lebendzellzahlen beider Kulturen sinken zur 93. Stunde auf $19 \cdot 10^4$ bzw. $22 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Die Zellzahlen der Referenz liegen in der gleichen Größenordnung wie die der substituierten Kulturen. Die Zellzahlen nehmen nach einer anfänglicher Zunahme um $15 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter gering ab und liegen in der weiteren Kultivierung um einen Wert von $36 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Die Lebendzellzahlen der substituierten Kulturen unterscheiden sich nicht gravierend von der Referenz von LC, so dass nicht von einer Beeinflussung durch Testosteron gesprochen werden kann.

Die Wachstumsraten der Kulturen differieren deutlich in der 19. und in der 93. Stunde (vgl. Tab. 3.41). In der 44. und der 70. Stunde sind die Abweichungen geringer. Während die Wachstumsrate der Kultur 75 stetig sinkt, sinkt die Rate der Kultur 150 erst ab der 44. Stunde. Die Rate der Referenz steigt zum Kultivierungsende im Gegensatz zu den substituierten Kulturen an.

Die Vitalitäten der substituierten Kulturen sinken zum Ende des Experiments auf 63 % (Kultur 150) bzw. 53 % (Kultur 75) ab. Die Vitalität der Referenz am Ende des

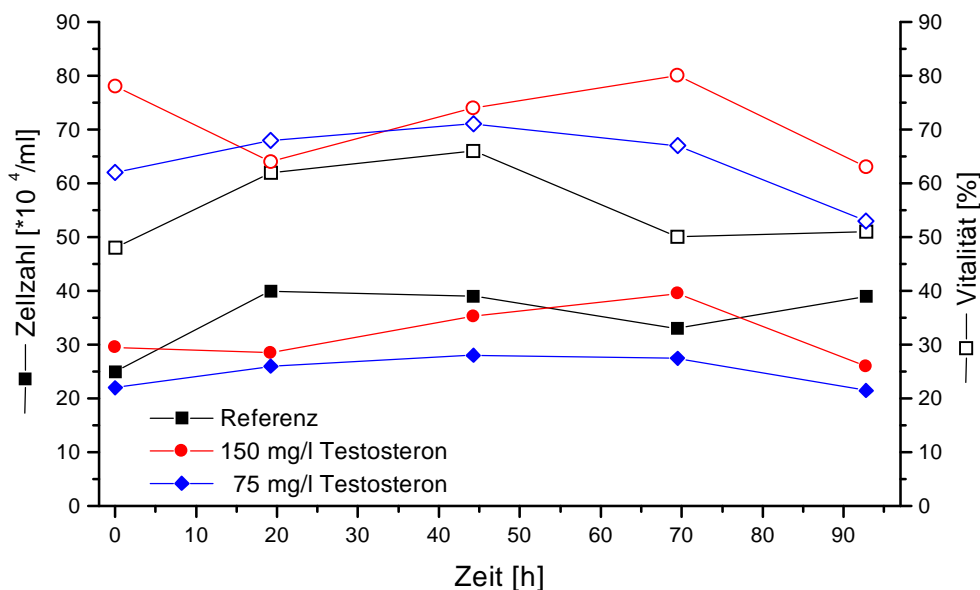


Abb. 3.61 Lebendzellzahl und Vitalität von T01, Referenz von LC

Zeit [h]	0	19	44	70	93
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,2	0,8	0,3	1,1
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 150	--	1,0	1,7	0,6	0,6
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75	--	2,2	1,7	0,9	0,8
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,4	0,7	0,2	0,0
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 150	--	3,0	2,8	1,3	0,6
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75	--	3,8	3,1	1,6	1,4

Tab. 3.40 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von T01, Referenz von LC

Experimentes liegt bei 51 %, so dass auch hier keine durch Testosteron verursachten Vitalitätsverluste auftreten. Im Gegenteil zeichnen sich die substituierten Kulturen über die gesamte Versuchsdauer durch eine höhere Vitalität aus. Dies liegt u.a. an der geringen Startvitalität der Vergleichsreferenz.

Die Werte der Laktatproduktionsrate der Kultur 150 liegen unter denen der Kultur 75 ebenso wie die Werte der Glukoseverbrauchsrate (vgl. Tab. 3.40). Beide sind sich aber im Verlauf ähnlich. Die Glukoseverbrauchsrate der 19. Stunde von Kultur 150 bildet die Ausnahme. Die Laktatproduktionsraten der Referenz sind über die gesamte Versuchsdauer geringer als die der substituierten Kulturen genau wie die Glukoseverbrauchsraten. Eine Ausnahme bilden der Anfangswert der Referenz, er liegt über dem der Kultur 150, und der Wert der 93. Stunde, er liegt über denen der beiden substituierten Kulturen. Eine Beeinflussung der Umsetzung der Glukose zum Laktat durch das Testosteron ist denkbar.

Die Anfangskonzentrationen des Ammoniums in den substituierten Kulturen weichen um 10 bis 27 mg/l von der der Referenz ab (vgl. Abb. 3.62). Der Anfangswert der Referenz liegt mit 45 mg/l sehr hoch. Wenn bedacht wird, dass schon eine Kon-

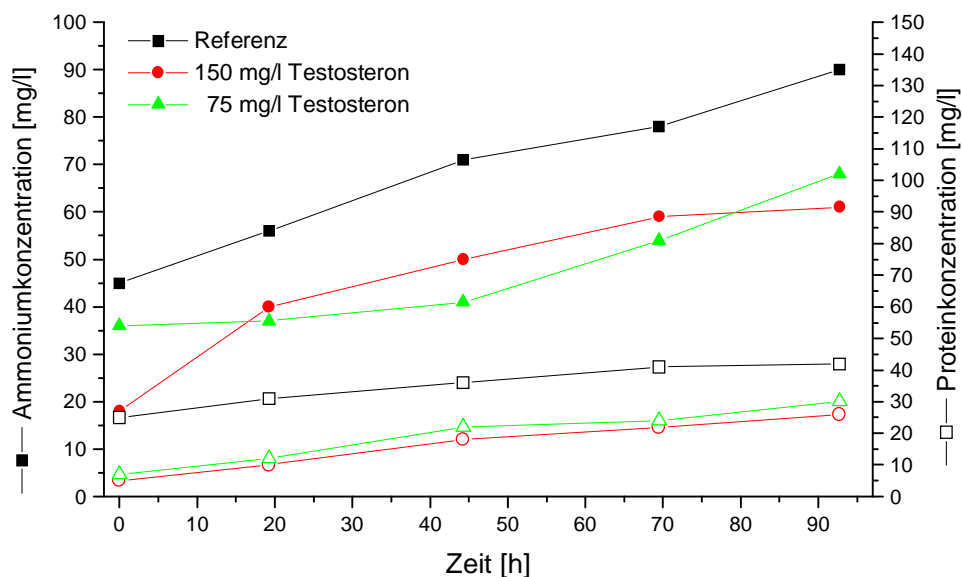


Abb. 3.62 Ammonium- und Proteinkonzentration von T01, Referenz von LC

Zeit [h]	0	19	44	70	93
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	42	36	18	34
Referenz	--	95	30	23	6
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	5	14	45	59
Kultur 150	--	483	177	495	607
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	258	473	407	391
Kultur 75	--	873	544	103	400
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	0,25	-0,01	-0,07	0,07
Referenz	--	-0,02	0,09	0,05	-0,19
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	0,09	0,03	-0,01	-0,11
Kultur 150	--	0,09	0,03	-0,01	-0,11
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,09	0,03	-0,01	-0,11
Referenz	--	0,09	0,03	-0,01	-0,11
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,09	0,03	-0,01	-0,11
Kultur 150	--	0,09	0,03	-0,01	-0,11
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,09	0,03	-0,01	-0,11
Kultur 75	--	0,09	0,03	-0,01	-0,11

Tab. 3.41 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von T01, Referenz von LC

zentration von knapp 35 mg/l wachstumshemmend wirkt, können die geringen Zellzahländerungen der Referenz hierauf zurückgeführt werden. In den drei Kulturen ist die Zunahme der Ammoniumkonzentration während der Kultivierung vergleichbar. Die Konzentration der Referenz liegt dabei um 10 bis 30 mg/l höher als die der Testosteron-Kulturen. Deren Konzentrationen sind ab der 19. Stunde äquivalent. Es ist keine durch die Testosteron-Zugabe erhöhte Ammoniumkonzentration erkennbar.

Die Ammoniumproduktionsrate der Kultur 75 steigt im Verlauf der Kultivierung (vgl. Tab. 3.41). Die Rate der Kultur 150 fällt dagegen im gleichen Zeitraum. Ebenso fällt die Produktionsrate der Referenz bis zur 70. Stunde, steigt dann aber im Gegensatz zu dieser zur 93. Stunde an. Ein Testosteron-Einfluss auf die Ammoniumproduktionsrate ist nicht ersichtlich.

Die Proteinkonzentration der Referenz nimmt im Versuchsverlauf um 17 mg/l zu, in den substituierten Kulturen um 23 mg/l (Kultur 75) bzw. um 21 mg/l (Kultur 150) (vgl. Abb. 3.62). Sie sind in dieser Hinsicht sehr ähnlich. Aufgrund der verschiedenen Vorkulturen ist der Startwert der Referenz mit 25 mg/l mehr als dreimal so hoch, wie der der substituierten Kulturen. Die Anfangsdifferenz wird gegenüber den substituierten Kulturen während der gesamten Kultivierung beibehalten. Hier lässt sich kein Einfluss des Testosterons ermitteln.

Die t-PA-Konzentration ist in Kultur 75 bis zur 70. Stunde um bis zu 200 $\mu\text{g}/\text{l}$ höher als in Kultur 150 (vgl. Abb. 3.63). Die t-PA-Konzentration ist der Referenz liegt bis zur 44. Stunde über der von Kultur 150. Den Kulturen ist die stetige Zunahme der Konzentration und ein vergleichbarer Endwert um 550 $\mu\text{g}/\text{l}$ gemeinsam. Anhand der Produktionsraten kann keine Tendenz festgestellt werden (vgl. Tab. 3.41). Sowohl bei der t-PA-Konzentration als auch bei den t-PA-Produktionsraten ist ein Einfluss des Testosterons nicht zu erkennen.

Die Aminosäure-Konzentrationen der substituierten Kulturen können nicht mit denen der Referenz von Kultivierungsreihe LC verglichen werden, da die Anfangskonzentrationen sehr unterschiedlich sind (Daten s. Anhang). Die Konzentrationen der

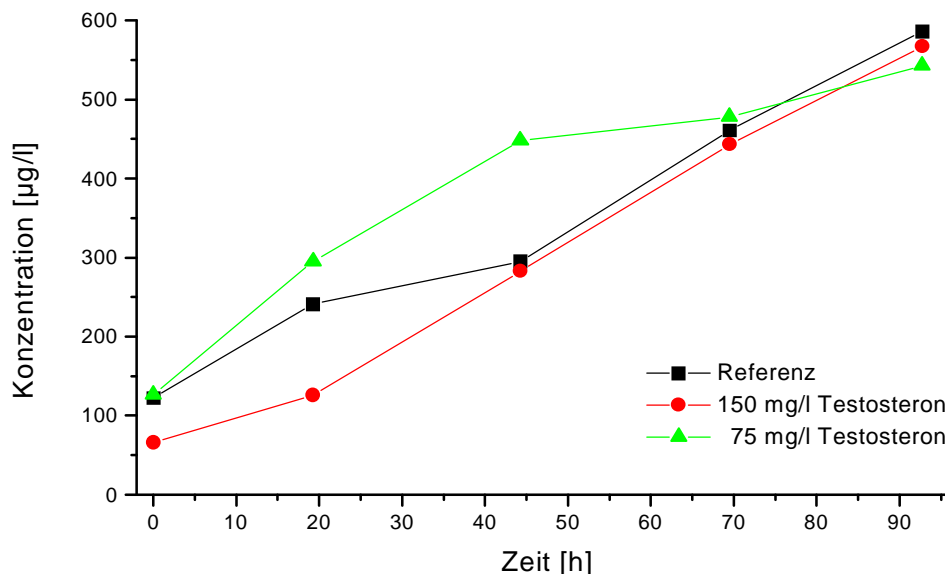


Abb. 3.63 t-PA-Konzentration von T01, Referenz von LC

Aminosäuren der substituierten Kulturen unterscheiden sich nur geringfügig. Ein von der Höhe der zugegebenen Testosteron-Konzentration abhängiger Einfluss wird nicht festgestellt.

Die substituierten Kulturen können in den Scherexperimenten miteinander verglichen werden, da die Abweichungen gering sind (s. Abb. 3.63, s. Tab. 3.41). Die Daten der Referenz der Kultivierungsreihe LC werden nicht aufgeführt, da es sich um ein Langzeit-Experiment handelt. Stattdessen werden die Daten des einzigen Scherversuches der Referenz von T01 dargestellt, aufgrund ihrer extremen Werte aber nicht mit in die Bewertung miteinbezogen.

Es werden je vier **Kurzzeit-Scherexperimente** mit den substituierten Kulturen und eines mit der Referenz durchgeführt. Die Überlebensraten und Schubspannungen sind in Tab. 3.42 zusammengestellt. Dabei zeigt sich für die Referenz eine Überlebensrate von 0 %. Diese wird nicht gewertet, da der Versuch nur einmal durchgeführt wurde und die Referenz auch nicht mehr in der Kultivierungsreihe zur Verfügung steht. Die Kultur 150 besitzt eine Überlebensrate von 23 % und die niedriger-substituierte Kultur 75 eine von 57 %. Dabei ist die Null-Rate der Referenz auf die hohe Scherbelastung zurückzuführen. Interessant ist, dass die Kultur 75 trotz der höheren Schubspannung der substituierten Kulturen ($1,9 \text{ N/m}^2$) mit der höheren Überlebensrate verknüpft ist. Dies bedeutet für die Zellen der Kultur 75 eine höhere Widerstandsfähigkeit in Bezug auf die Schereinwirkung als sie die Zellen in Kultur 150 bei geringer Scher

	Referenz	Kultur 150	Kultur 75
Überlebensrate R_s [%]	(0)	23	57
Schubspannung τ [N/m^2]	(2,3)	1,9	1,9

Tab. 3.42 Überlebensrate und Schubspannung von T01, () keine Bewertung

Änderung der/des	Referenz	Kultur 150	Kultur 75
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	(3)	-1	-4
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	(-21)	-18	-8
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	(-24)	-19	-12
... Vitalität [%]	(-81)	-22	-8
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	(13)	-1	2
... Proteinkonzentration [mg/l]	(18)	13	15
... relativen LDH-Wertes [U/l]	(135)	102	100

Tab. 3.43 gemittelte Analysenwerte von T01, () keine Bewertung

belastung aufweisen. Der Unterschied zwischen den beiden substituierten Kulturen in der Überlebensrate kann durch das Zellwachstum begründet werden. Befinden sich die Zellen in einer Wachstumsphase, wird die Energie hauptsächlich zur Teilung der Zellen verwendet. In dieser Phase ist die Scherempfindlichkeit höher. Werden die Lebendzellzahlen und Wachstumsraten der beiden Kulturen miteinander verglichen, ist das Wachstum in Kultur 150 höher als in Kultur 75. Die Zellen reagieren somit empfindlicher auf Scherstress.

Aus Tab. 3.43 ist ersichtlich, dass die Totzellzahl der substituierten Kulturen abnimmt. Dabei verringert sich die Totzellzahl in Kultur 75 mehr als in Kultur 150. Die Abnahme der Lebend- und Gesamtzellzahl sowie der Vitalität ist in Kultur 75 am geringsten. Dies bestätigt die höhere Überlebensrate. Die Änderung der Ammoniumkonzentration ist bei den substituierten Kulturen vergleichbar und zeigt keine Abhängigkeit von der Testosteron-Konzentration. Das gleiche gilt für die Proteinkonzentration und den relativen LDH-Wert. Obwohl die Zellzahlabnahme in Kultur 150 höher ist als in Kultur 75 sind die Werte von Proteinkonzentration und relativem LDH-Wert ähnlich. Dies kann zum einen auf einem unterschiedlichen Gehalt in den Zellen der Kulturen beruhen, zum anderen kann aber auch der verstärkte Abbau von Protein und LDH in Kultur 150 aufgrund der durch die hohe Zellzerstörung bedingten Proteasenfreesetzung hierfür ursächlich sein.

Die ermittelten Daten lassen auf die Möglichkeit schließen, dass die mit 75 mg/l substituierte Kultur die Scherempfindlichkeit der Zellen senken kann. Eine Senkung der Scherempfindlichkeit kann bei Kultur 150 nicht festgestellt werden. Zwar überleben 23 % der Zellen, jedoch ist die Überlebensrate für eine eindeutige Aussage zur Scherstresssenkung zu gering, zumal kein Vergleich mit einer Referenz gezogen werden kann. Es wird vermutet, dass der Vorteil der hohen Konzentrationen durch die Membranversteifung zum Nachteil wird und die Zellmembran sich leichter zerstören lässt.

Werden die Änderungen der Zellzahlen als Grundlage genommen, kann davon ausgegangen werden, dass die Scherempfindlichkeit der Zellen durch Testosteron gesenkt werden kann.

Für ein **Langzeit-Scherexperiment** wird eine 157 Stunden dauernde Kultivierungsreihe LT01 durchgeführt. Es werden **Testosteron**-Konzentrationen von 75 und 150 mg/l eingesetzt. Die Kultur 150 wird nach einer Infektion zur 19. Stunde neu angesetzt. Ebenso wird die Kultur 75 I nach einer Infektion nach der 41. Stunde durch die Kultur 75 II ersetzt. Aus diesem Grund sind nur Kultur 75 I und die Referenz aus der gleichen Vorkultur. Die beiden neu angesetzten Kulturen entstammen zwar ebenfalls aus der selben Vorkultur, jedoch treten Unterschiede auf, da auch die Vorkultur sich weiterentwickelt. Um einen Eindruck von diesen Differenzen zu erhalten, werden die Daten der Kultur 75 II aufgeführt.

Die Kulturen besitzen eine Animpfdichte von 30 bis $47 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter (vgl. Abb. 3.64). Nach einer Lag-Phase der Referenz und Kultur 75 I bis zur 19. Stunde steigen die Lebendzellzahlen in den genannten Kulturen an. Die Lebendzellzahl der Kultur 75 II sinkt nach dem Animpfen von 30 auf $14 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter ab. Die Lebendzellzahl der Kultur 150 sinkt bis zur 19. Stunde und bleibt bis zur 114. Stunde konstant. Eine geringe Abnahme ist zur 145. Stunde zu verzeichnen. Die maximalen Lebendzellzahlen unterscheiden sich bedeutend in den einzelnen Kulturen. Die maximale Lebendzellzahl in der Referenz liegt in der 157. Stunde bei $91 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Die der Kultur 150 erreicht mit $28 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter (31 % der Referenz) ihren Höchstwert in der 89. Stunde. In Kultur 75 II kann kein Zellzahlmaximum festgestellt werden. Kultur 75 I ist aufgrund der Kürze der Kultivierung schwer zu bewerten. Für die Lebendzellzahl kann im Gegensatz zu Kultur 150 ein Anstieg festgestellt werden. Für eine aussagekräftige Beurteilung fehlen jedoch mehrere Werte. Die Lebendzellzahl scheint abhängig von einer Testosteron-Zugabe zu sein. Es muss aber die Tatsache beachtet werden, dass die Testosteron-Kulturen mit einem zeitlichen Unterschied aus der gleichen Vorkultur angeimpft werden und dass Kultur 75 I, die auch zeitlich aus der gleichen Vorkultur wie die Referenz angeimpft wird, geringere Differenzen aufweist. Eine Abhängigkeit ist nicht zu bestreiten, jedoch ist der Einfluss geringer als die Kulturen 75 II und 150 suggerieren.

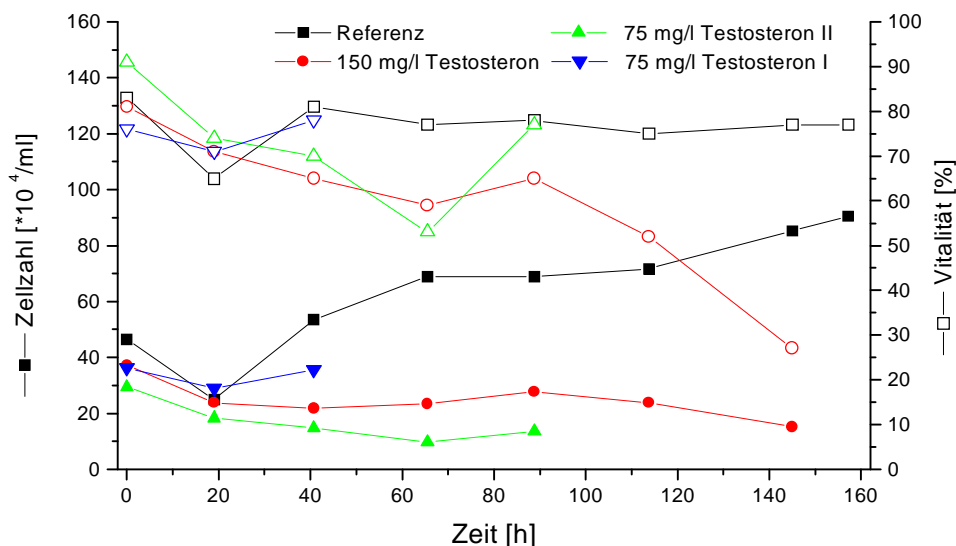


Abb. 3.64 Lebendzellzahl und Vitalität von LT01

Zeit [h]	0	19	41	66	89	114	145	157
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	2,3	0,7	0,5	0,2	0,3	0,2	0,2
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 150	--	2,8	1,7	1,1	0,6	0,5	0,5	--
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75 II	--	1,6	1,9	2,1	0,5	--	--	--
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75 I	--	2,3	1,4	--	--	--	--	--
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,5	1,3	0,2	-0,2	0,0	-0,1	-0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 150	--	2,3	2,8	1,1	0,3	0,3	0,2	--
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75 II	--	1,7	2,4	2,0	0,5	--	--	--
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75 I	--	2,3	1,7	--	--	--	--	--

Tab. 3.44 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von LT01

Die Wachstumsraten der Kulturen 75 II und 150 steigen bis zur 89. Stunde an (vgl. Tab. 3.45). Die Raten der Referenz fallen in diesem Zeitraum von $0,37$ auf 0 d^{-1} ab, wird der Anfangswert bei den genannten Kulturen außer Acht gelassen. Nach der 89. Stunde steigt die Wachstumsrate der Referenz, während sie in Kultur 150 fällt. In Kultur 75 I zeigt sich nach dem anfänglichen Absinken der Wachstumsrate im Gegensatz zu den beiden anderen Testosteron-Kulturen ein positiver Trend, ähnlich dem der Referenz. Es gilt wie für die Lebendzellzahl, dass ein Einfluss des Testosterons vorhanden ist, allerdings geringer als die Kulturen 75 II und 150 erkennen lassen. Der Einfluss ist abhängig vom Zustand der Zellen zum Kultivierungsbeginn.

Die Vitalität der Referenz bewegt sich gleichbleibend um einem Wert von 77 % (vgl. Abb. 3.64). Die Vitalität der Kultur 150 nimmt im Versuchsverlauf dagegen ab. In Kultur 75 II sinkt der Wert der Vitalität zunächst ab und behält annähernd einen Wert von 70 % mit einem Ausreißer in der 89. Stunde. Die Vitalität von Kultur 75 I entwickelt sich ähnlich der der Referenz, was wieder auf die Thematik der zeitlich versetzten Animpfphasen führt. An der Anfangsvitalität kann ein derart unterschiedlicher Verlauf der Lebendzellzahlen und der Vitalitäten nicht liegen, jedoch womöglich an den verschiedenen Wachstumsphasen. Zum Beispiel kann, wenn die Zellen gerade in der exponentiellen Phase sind und vermehrt Stoffe aus dem Medium zur Energiegewinnung und zum Membranaufbau aufnehmen, eine vermehrte Einlagerung von Testosteron erfolgen und so zu einem veränderten Wachstumsverhalten u.a. führen.

Die Glukoseverbrauchsrate der Kulturen mit Testosteron-Zusatz liegen über denen der Referenz (vgl. Tab. 3.44). Dabei steigt die Glukoseverbrauchsrate der Kultur 75 II bis zur 66. Stunde an. Bei den anderen Kulturen sinkt sie im Versuchsverlauf ab. Die substituierten Kulturen verbrauchen mehr Glukose, was als eine Art Stressreaktion auf die Testosteron-Zugabe gewertet werden kann, da sich der Verbrauch nicht in einer Erhöhung der Lebendzellzahl, d.h. als Energiegewinnung zur Zellteilung, ausdrückt.

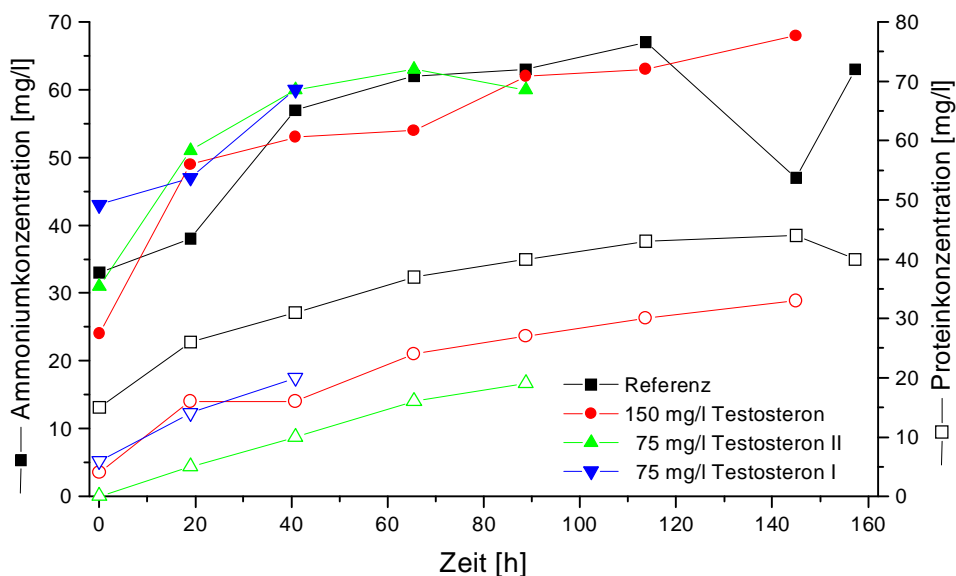


Abb. 3.65 Ammonium- und Proteinkonzentration von LT01

Dabei ist der Glukoseverbrauch der Kultur 150 höher als der von Kultur 75 I. Auch die Laktatproduktionsraten der Testosteron-Kulturen sind höher als die der Referenz (vgl. Tab. 3.44). Die Raten von Kultur 75 II und 150 steigen erst zur 41. Stunde an und fallen im weiteren Kultivierungsverlauf ab. Dagegen fallen die Produktionsraten der Referenz und von Kultur 75 I von der 19. Stunde bis zum Kultivierungsende ab. Anhand der Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten kann eindeutig eine Belastung der Testosteron-Kulturen festgestellt werden.

Die Ammoniumkonzentration steigt in allen Kulturen während der Kultivierung an (vgl. Abb. 3.65). Die Konzentrationen unterscheiden sich nur unwesentlich. Die Produktionsraten der Kulturen 75 II und 150 liegen bis zur 66. bzw. 89. Stunde über der der Referenz und Kultur 75 I. Es erfolgt in allen Kulturen eine Abnahme der Produktionsrate. Da trotz der unterschiedlichen Zellzahlen die Ammoniumkonzentrationen sehr ähnlich sind, muss eine höhere Produktionsrate in den Kulturen mit den geringeren Zellzahlen vorliegen. Hier sind es die substituierten Kulturen. Das Testosteron scheint die Ammoniumproduktion zu beeinflussen.

Die Proteinkonzentration der Referenz liegt in der gesamten Kultivierungszeit um einen Betrag von 10 bis 15 mg/l über der von Kultur 75 I und 150 (vgl. Abb. 3.65). Die Proteinkonzentration von Kultur 75 II ist während der Kultivierung am geringsten. Zur Referenz beträgt der Unterschied 15 bis 20 mg/l. Die Höhe der Proteinkonzentration ist von der Höhe der Lebendzellzahl abhängig. Das zugegebene Testosteron hat keine sichtbaren Abweichungen der Proteinkonzentration gegenüber der Referenz zur Folge.

Die t-PA-Konzentrationen der einzelnen Kulturen unterscheiden sich schon in der 19. Stunde gravierend (vgl. Abb.3.66). Die Konzentration erreicht in der Referenz einen Endwert von 3900 µg/l. Dagegen sind die Konzentrationen der Kultur 75 I und 150 mit einem maximalen Wert von 300 µg/l bzw. 780 µg/l ein Fünftel bzw. ein

Zeit [h]	0	19	41	66	89	114	145	157
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Referenz	--	18	53	8	1	5	0	36
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 150	--	104	19	4	32	4	20	--
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 75 II	--	106	60	24	0	--	--	--
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 75 I	--	15	44	--	--	--	--	--
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Referenz	--	1219	1744	1369	1114	505	8974	221
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 150	--	965	1004	394	483	198	685	--
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 75 II	--	243	468	831	0	--	--	--
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 75 I	--	635	722	--	--	--	--	--
Wachstumsrate [d^{-1}] Referenz	--	-0,34	0,37	0,11	0,00	0,02	0,06	0,05
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 150	--	-0,25	-0,04	0,03	0,08	-0,07	-0,15	--
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 75 II	--	-0,26	-0,10	-0,17	0,15	--	--	--
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 75 I	--	-0,12	0,10	--	--	--	--	--

Tab. 3.45 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von LT01

Dreizehntel der Referenz. Die geringsten t-PA-Konzentrationen enthält Kultur 75 II (ein Achtzehntel der Referenz). Die Produktionsraten der substituierten Kulturen sind ebenfalls geringer als die der Referenz (vgl. Tab. 3.45). Die Raten der Kulturen 75 I und II sind bis zur 41. Stunde geringer als die der Kultur 150. Aufgrund der geringeren Produktionsraten ist eine Beeinflussung der t-PA-Produktion durch das zugegebene Testosteron wahrscheinlich. Auch in der Vergleichskultur 75 I zeichnet sich eine geringere Konzentration sowie Produktion von t-PA als in der Referenz ab.

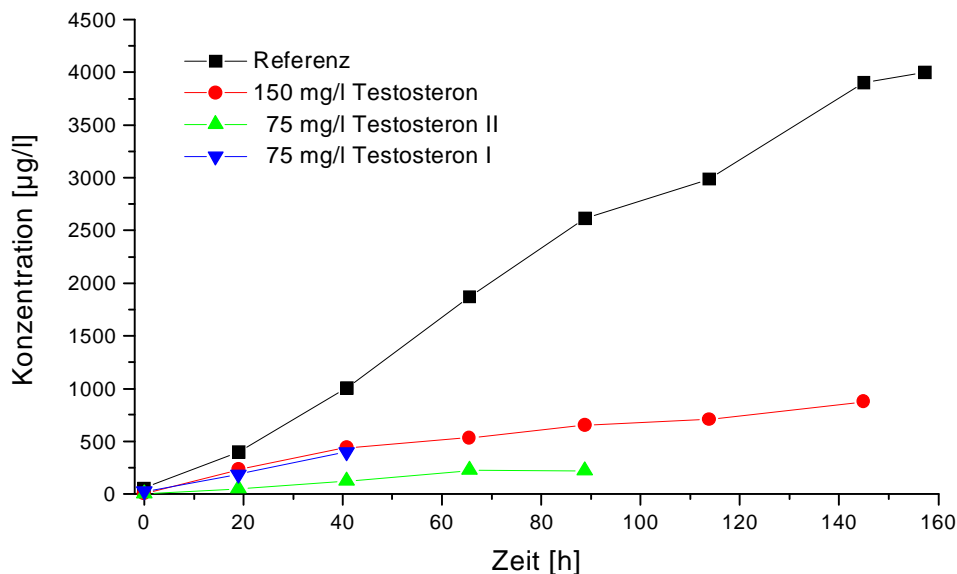


Abb. 3.66 t-PA-Konzentration von LT01

Die Konzentrationen der Aminosäuren unterscheiden sich bei Glycin, Glutaminsäure, Glutamin, Alanin und Asparaginsäure (Daten s. Anhang). Die Glutaminkonzentration nimmt in der Referenz innerhalb der ersten 41 Stunden auf 0 g/l ab. In Kultur 75 II ist aufgrund der geringen Kultivierungsdauer keine Abnahme bis auf 0 g/l zu beobachten. Wegen der niedrigen Lebendzellzahlen in diesen Kulturen erfolgt nur eine langsame Abnahme. In Kultur 150 sinkt die Glutaminkonzentration genauso langsam. Hier erreicht sie aber wegen der höheren Lebendzellzahl in Bezug auf die Kultur 75 II einen Endwert von 0 g/l nach 89. Stunden. Im Gegensatz zu der durch die unterschiedlichen Zellzahlen und die unterschiedliche Kultivierungsdauer begründeten Differenz der Glutaminkonzentration sind die Änderungen der anderen oben genannten Konzentrationen wahrscheinlich durch die Testosteron-Zugabe bedingt. Die Konzentration von Asparaginsäure nimmt in der Referenz im Versuchsverlauf nach dem Verbrauch von Glutamin und der Abnahme von Glutaminsäure in der 41. Stunde ab. Diese Abnahme ist in den substituierten Kulturen nicht zu beobachten, da noch Glutamin sowie Glutaminsäure vorhanden sind. In der Referenz steigt die Konzentration von Glutaminsäure zunächst auf 40 mg/l in der 41. Stunde an und nimmt danach bis auf 4 mg/l ab. Der Anstieg ist in den substituierten Kulturen mit maximal 62 mg/l höher. Das Maximum liegt hier in der 89. Stunde. Die Konzentration fällt langsam, so dass am Kultivierungsende noch eine Konzentration von 57 mg/l vorhanden ist. Es erfolgt somit eine Speicherung der durch den Glutaminabbau gewonnenen Energie. Ebenso ist eine höhere Alanin- sowie Glycinkonzentration in den substituierten Kulturen nachzuweisen, da die vorhandene Konzentration von Asparagin noch nicht verstoffwechselt ist. Es wird eine Beeinflussung des Zellstoffwechsel durch Testosteron angenommen. Die substituierten Kulturen produzieren Alanin, Glycin und Glutaminsäure in höheren Konzentrationen als die Referenz, was nur zum Teil auf den schnelleren Verbrauch von Glutamin in der Referenz zurückzuführen ist.

Es werden fünf **Langzeit-Scherexperimente** von LT01 durchgeführt. Dabei werden die Experimente von Kultur 75 II und 150 je einmal wiederholt. In Tab. 3.46 sind die Überlebensraten der Kulturen aufgeführt. In dieser Experimentreihe sind die Überlebensraten der Kulturen alle unter 10 %. Sie verhalten sich äquivalent. Die Schubspannung sind ebenso vergleichbar.

Werden die Änderungen der gemittelten Analysenwerte betrachtet, fällt auf, dass die Werte von Kultur 75 II, mit Ausnahme der Änderung der Ammoniumkonzentration sowie bei den Änderungen von Glukose und Laktat und den daraus resultierenden Raten, mit den Werten der Referenz besser übereinstimmen als mit Kultur 150 (vgl. Tab. 3.47 und 3.48). Die mittlere Überlebensrate der Kultur 75 II entspricht mit 7 % ebenfalls eher der Überlebensrate der Referenz als der mittleren Überlebensrate der

	Referenz	Kultur 150	Kultur 75 II
Überlebensrate R_s [%]	8	5	7
Schubspannung τ [N/m ²]	2,2	2,2	2,3

Tab. 3.46 Überlebensrate und Schubspannung von LT01

Änderung der/des	Referenz	Kultur 150	Kultur 75 II
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	-4	-9	-1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-21	-27	-15
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-25	-36	-16
... Vitalität [%]	-45	-54	-47
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	15	7	6
... Proteinkonzentration [mg/l]	7	13	8
... relativen LDH-Wertes [U/l]	55	105	21
... Glukosekonzentration [g/l]	-0,3	-0,1	0,0
... Laktatkonzentration [g/l]	0,3	0,2	0,0
... t-PA-Konzentration [μ g/l]	0	0	0

Tab. 3.47 gemittelte Analysenwerte von LT01

	Referenz	Kultur 150	Kultur 75 II
Wachstumsrate [d^{-1}]	-1,11	-1,39	-1,20
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	2,2	0,8	0,0
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	2,5	1,7	0,0
Ammoniumproduktionsrate [μ g/d*1 Mio. Ze]	122	44	68
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze]	0	0	0

Tab. 3.48 gemittelte Raten von LT01

Kultur 150 mit 5 %. Das zugegebene Testosteron bewirkt demnach keine Erhöhung der Überlebensrate, sondern es werden mit der Referenz vergleichbare Ergebnisse erzielt. Im Fall von Kultur 150 wird sogar eine Verringerung der Überlebensrate durch die Testosteron-Zugabe erzeugt.

Testosteron erweist sich als unbrauchbares Additiv im Langzeit-Experiment. In den Kurzzeit-Experimenten erreichen die Überlebensraten Werte bis 57 %, während im Langzeit-Experiment nur Ergebnisse ähnlich der Referenz erzielt werden können. In der hier durchgeführten Kultivierung zeigen sich außerdem gravierende Unterschiede in den Lebendzellzahlen, die in den Toxizitätstests nicht zu erkennen sind (s. Kap. 3.1.4), sowie daraus resultierende stark unterschiedliche t-PA-Konzentration. Die Produktionsrate von Ammonium sowie Laktat und Glukose ist höher als die der Referenz. Durch die Testosteron-Zugabe werden negative Veränderungen im Zellstoffwechsel hervorgerufen, die im Langzeit-Experiment im Gegensatz zum Kurzzeit-Experiment nicht durch eine hohe Überlebensrate kompensiert werden können.

Als dritte Substanz der Gruppe III werden **Retinol**-Kultivierungsreihen mit Konzentrationen von 2,5, 5, 10 und 20 mg/l eingesetzt. Es werden die Ergebnisse von Kultivierungsreihe R05 mit den Konzentrationen 2,5 und 5 mg/l beschrieben.

Die Lebendzellzahlen der Kulturen zeigen keine relevanten Unterschiede auf (vgl. Abb. 3.67). Ebenso sind die Wachstumsraten und die Vitalitäten der Kulturen äquivalent (vgl. Tab. 3.50 u. Abb. 3.67). Das zugefügte Retinol hat keine Auswirkungen auf Lebendzellzahl, Wachstumsrate und Vitalität der substituierten Kulturen.

Die in Tab. 3.49 aufgeführten Glukoseverbrauchsraten unterscheiden sich in der Geschwindigkeit ihrer Abnahme voneinander. Dabei ist die Abnahme der Verbrauchsrate in Kultur 5 besonders stark ausgeprägt, während die Verbrauchsrate in Kultur 2,5 nur eine langsame Abnahme erfährt. Die Abnahmegeschwindigkeit der Referenz liegt zwischen der beider Kulturen. Das Verhalten der Laktatproduktionsraten entspricht dem der Glukoseverbrauchsraten. Die Kultur 5 besitzt die höchsten Werte in den ersten 44 Stunden. Kultur 2,5 liefert die niedrigsten Laktatproduktionsraten. Die Raten der Referenz liegen zwischen denen beider substituierten Kulturen. Auch hier finden sich unterschiedliche Abnahmegeschwindigkeiten in den Produktionsraten wieder.

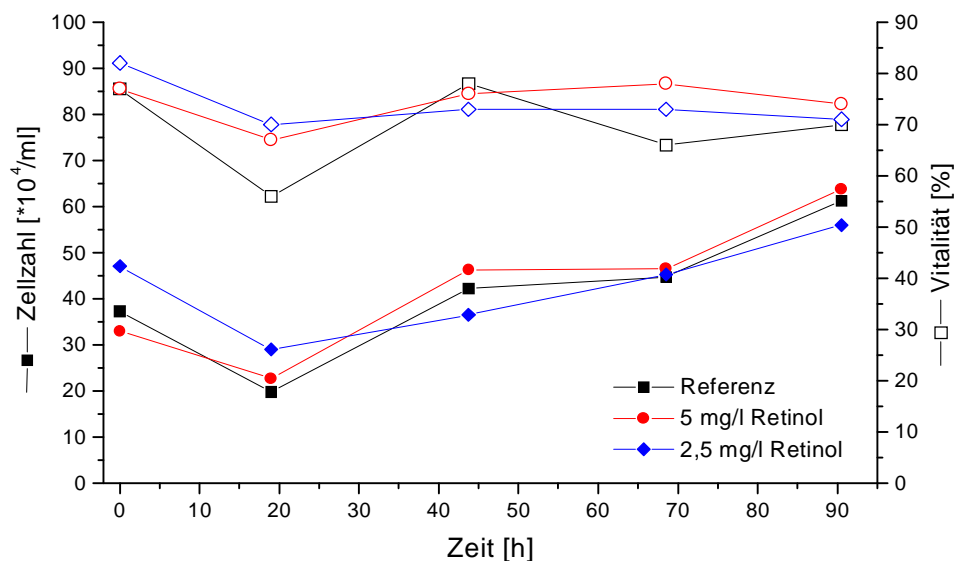


Abb. 3.67 Lebendzellzahl und Vitalität von R05

Zeit [h]	0	19	44	69	91
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	2,0	1,5	0,8	0,5
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	2,4	1,4	0,5	0,4
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	1,5	1,2	0,8	0,7
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	2,2	1,2	0,3	0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	2,6	1,3	0,1	0,0
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	1,7	1,1	0,3	0,2

Tab. 3.49 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von R05

Zeit [h]	0	19	44	69	91
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	40	0	45	14
Referenz					
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	32	45	15	10
Kultur 5					
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	0	30	26	9
Kultur 2,5					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	394	895	1186	1079
Referenz					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	213	587	450	101
Kultur 5					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	515	847	719	250
Kultur 2,5					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	-0,35	0,32	0,02	0,15
Referenz					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	-0,20	0,30	0,00	0,15
Kultur 5					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	-0,26	0,10	0,09	0,10
Kultur 2,5					

Tab. 3.50 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von R05

Die höchste Abnahmegeschwindigkeit liegt wiederum bei Kultur 5, die niedrigste bei Kultur 2,5 (vgl. Tab. 3.50). Die geringen Differenzen und unterschiedlichen Abnahmegeschwindigkeiten sind nicht durch die Retinol-Zugabe bedingt, sondern auf die ebenfalls geringen Unterschiede in den Lebendzellzahlen zurückzuführen.

Nur geringe Unterschiede lassen sich in der Ammoniumkonzentration finden (vgl. Abb. 3.68). Die substituierten Kulturen besitzen teilweise eine nur um wenige Milligramm pro Liter höhere Ammoniumkonzentration als die Referenz. Die Konzentration der Kultur 5 liegt über der von Kultur 2,5. Die Ammoniumproduktionsraten der einzelnen Kulturen sinken im Beobachtungszeitraum, ebenso nimmt das Wachstum der Kulturen ab (s. Tab. 3.50). Wegen der Schwankungen ist nicht erkennbar, welche Produktionsraten schneller bzw. langsamer abnehmen. Eine durch Retinol verursachte Veränderung in Ammoniumkonzentration und -produktion ist nicht ersichtlich.

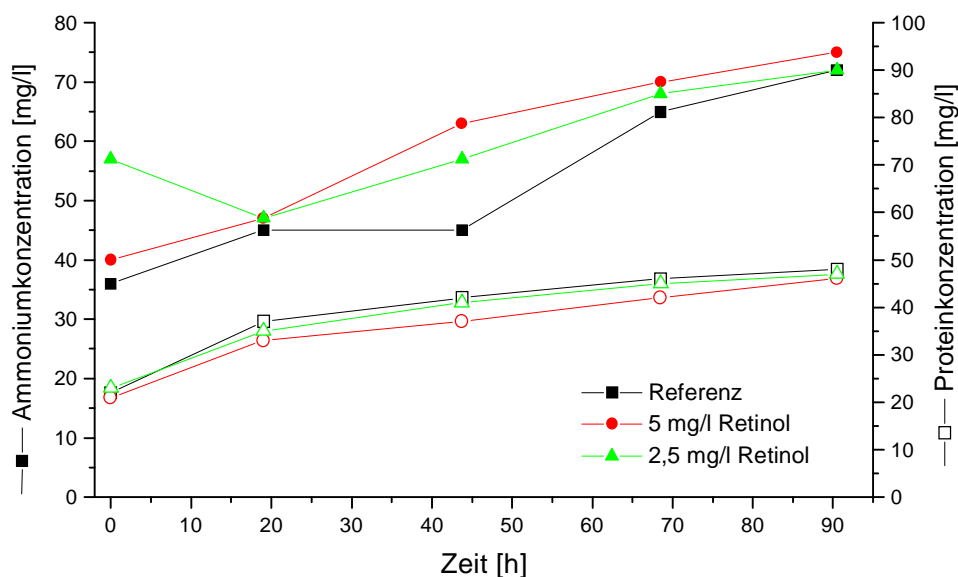


Abb. 3.68 Ammonium- und Proteinkonzentration von R05

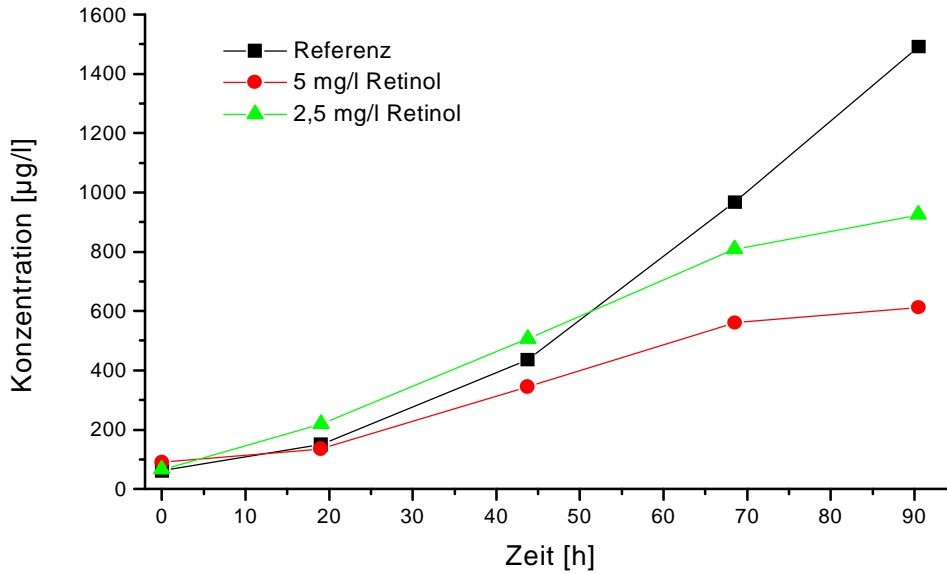


Abb. 3.69 t-PA-Konzentration von R05

Die Proteinkonzentration weist im Versuchsverlauf ebenfalls nur geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen auf (vgl. Abb. 3.68). Die Konzentration in der Referenz ist während des Experiments am höchsten, die der Kultur 5 ist am geringsten. Diese Abweichung könnte auf die Wirkung des Retinols zurückzuführen sein, ist aber wahrscheinlich durch die minimal abweichenden Zellzahlen bedingt.

Die t-PA-Konzentration der Kultur 2,5 ist nach den ersten 44. Stunden mit 510 µg/l die höchste. Die Kultur 5 enthält zum gleichen Zeitpunkt die niedrigste Konzentration mit 340 µg/l. Nach der 44. Stunde steigt die Konzentration des t-PAs in der Referenz auf 1490 µg/l an, wohingegen das Maximum in Kultur 5 610 µg/l (41 % der Referenz) und in Kultur 2,5 930 µg/l (62 % der Referenz) beträgt. Die t-PA-Produktionsraten aller drei Kulturen steigen in den ersten 44 Stunden an. Darüber hinaus steigt die Rate der Referenz bis zur 70. Stunde, danach sinkt sie ab. Die Raten der substituierten Kulturen nehmen dagegen nach der 44. Stunde ab. Bei der Konzentration des T-PAs sowie seiner Produktionsrate zeigt sich erstmals eine negative Auswirkung durch das Retinol. Abhängig von der Höhe der Retinol-Konzentration nimmt die t-PA-Konzentration zu.

Die Betrachtung der Aminosäure-Konzentrationen der einzelnen Kulturen führt zu dem Ergebnis, dass keine relevanten Unterschiede zu erkennen sind (Daten s. Anhang).

Die zugesetzte Konzentration an Retinol hat keinen Einfluss auf Zellzahl oder Vitalität. Es ergeben sich während der Kultivierung für Protein- und Ammoniumkonzentration geringe Zunahmen. Der gravierendste Unterschied besteht

bei der Konzentration und Produktion des t-PAs. Obwohl dies ein bedeutender Nachteil für eine Kultivierung ist, werden Scherexperimente durchgeführt. Es besteht die Möglichkeit bei einer hohen Überlebensrate dieses Additiv in Kurzzeit-Kultivierungen einzusetzen.

	Überlebensrate R_s [%]				Schubspannung τ [N/m ²]			
	Referenz	Kultur			Referenz	Kultur		
		2,5	5	10		2,5	5	10
Mittelwert	28	47	49	73	1,8	1,8	1,8	1,8

Tab. 3.51 Überlebensrate und Schubspannung von R03, R04 und R05

Es werden für die Kultivierungsreihe R03 und R04 je zwei und für die Kultivierungsreihe R04 vier **Kurzzeit-Scherexperimente** durchgeführt. Die gemittelten Schubspannungen und Überlebensraten sind in Tab. 3.51 aufgeführt. Die Überlebensrate der Referenz ist mit 28 % die geringste. Die höchste Überlebensrate besitzt die am höchsten substituierte Kultur 10 mit 73 %. Die Überlebensraten der Kulturen 2,5 und 5 liegen mit 47 und 49 % dazwischen. Die Schubspannungen aller Kulturen sind identisch. Das heißt, obwohl sie der gleichen Scherbelastung ausgesetzt sind, überleben in der Referenz weniger Zellen.

Anhand der Totzellzahländerung ist kein Einfluss des Retinols ersichtlich, die Zunahme ist in allen Kulturen vergleichbar. Die Änderung der Lebend- und Gesamtzellzahl sowie der Vitalität nimmt mit zunehmender Retinol-Konzentration ab (vgl. Tab. 3.52). So ist in der Referenz der höchste Vitalitätsverlust zu verzeichnen und in Kultur 10 der niedrigste. Auch die Änderung der Ammoniumkonzentration folgt diesem Verlauf. Die Änderung der Proteinkonzentration ist in den Kulturen vergleichbar. Hier spielt die Retinol-Konzentration keine Rolle. Bei der Betrachtung des relativen LDH-Wertes sind die Werte der substituierten Kulturen nur für Kultur 2,5 und Kultur 5 geringer. Es zeigt sich für die Retinol-Kulturen, dass der relative LDH-Wert mit Zunahme der Retinol-Konzentration gleichfalls zunimmt. Dies deutet auf eine Schädigung der Zellen hin. Die überlebenden Zellen sind geschädigt, können aber noch nicht als tote Zellen erkannt werden, beeinflussen so jedoch schon den LDH-Wert. Die Vermutung über die geschädigten Zellen dient auch für die im Vergleich zur Referenz und unter Berücksichtigung der höheren Überlebensraten hohe Proteinkonzentration in den substituierten Kulturen als Erklärung.

Änderung der/des	Referenz	Kultur 2,5	Kultur 5	Kultur 10
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	2	3	3	1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-24	-16	-10	-6
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-22	-17	-6	-5
... Vitalität [%]	-41	-24	-15	-6
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	6	2	-1	-1
... Proteinkonzentration [mg/l]	20	22	21	23
... relativen LDH-Wertes [U/l]	141	121	135	182

Tab. 3.52 gemittelte Analysenwerte von R03, R04 und R05

Für einen Einsatz von Retinol als Additiv sind die Daten umfassend genug. Es kann zur Scherreduzierung in Kurzzeit-Experimenten eingesetzt werden. Wegen der Verringerung der t-PA-Produktionsrate und der daraus resultierenden geringeren t-PA-Konzentration ist eine Überprüfung an anderen Zelllinien von Vorteil. Diese Untersuchungen werden aus zeitlichen und materiellen Gründen nicht durchgeführt. Es ist zu beachten, dass das Retinol in einem Lösungsmittel, hier Ethanol, gelöst werden muss, da es selbst nicht in wässrigen Medien löslich ist. Dieses kann bei höheren Konzentrationen zu Nachteilen führen, wie z.B. der Hemmung des Zellwachstums. Aus diesem Grund besteht eine Limitierung der zuzugebenden Konzentration.

Im Gegensatz zum ebenfalls in Ethanol zugesetzten Ergosterin (vgl. Kap. 3.2.1.1) ist Retinol als Scherstress reduzierendes Additiv wirksam. Von den Überlebensraten her kann es mit PC, welches der gleichen Gruppe wie Retinol zugeordnet und gleichfalls in Ethanol gelöst wird, verglichen werden. Es ist aufgrund der geringeren eingesetzten Konzentrationen jedoch wirksamer als dieses. Im Vergleich mit dem zweiten Additiv dieser Gruppe, Testosteron, welches im Gegensatz zu den anderen beiden in Medium gelöst werden kann, ist die Wirksamkeit ebenfalls höher, da auch hier die wirksamen Konzentrationen von Retinol geringer sind.

Es wird eine **Langzeit-Kultivierungsreihe** LR von Retinol durchgeführt. Die Kultivierung dauert 145 Stunden. Es werden Konzentrationen von 75 und 150 mg/l Retinol eingesetzt.

Die Zellen in den Kulturen durchlaufen zunächst eine Lag-Phase (vgl. Abb. 3.70). Diese dauert bis zur 46. Stunde in Kultur 2,5 und in der Referenz. In Kultur 5 dauert sie bis zur 70. Stunde. Nach diesen Zeitpunkten steigt die Lebendzellzahl in den Kulturen an. Die Referenz erreicht in der 145. Stunde dabei ein Maximum von $75 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Das Lebendzellzahlmaximum der Kultur 2,5 liegt ebenfalls in der 145. Stunde, ist aber mit $51 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter geringer als das der Referenz (68 % der Referenz). In Kultur 5 wird ein Höchstwert von $37 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in der 137. Stunde erreicht (49 % der Referenz). Es zeigt sich ein Einfluss des Retinols auf das Lebendzellzahlmaximum der Kulturen. Je höher die Retinol-Konzentration desto geringer die maximale Lebendzellzahl.

Aufgrund der äquivalenten Lebendzellzahlen bis zur 70. Stunde sind die Wachstumsraten der Referenz und von Kultur 2,5 in diesem Zeitraum vergleichbar (vgl. Tab. 3.54). Beide steigen bis zur 70. Stunde. Im Gegensatz dazu sinkt die Wachstumsrate der Kultur 5 bis zur 46. Stunde ab. Erst danach erfolgt ein Anstieg bis zur 94. Stunde. Das Wachstumsmaximum ist bei ihr in der 94. Stunde. Bei der Referenz und Kultur 2,5 wird dieses Maximum in der 70. Stunde erreicht. Auch hier sind Auswirkungen des Retinols auf die Wachstumsrate sichtbar. Mit zunehmender Retinol-Konzentration nimmt die Wachstumsrate in den ersten 70 Stunden ab.

Die Vitalität der Referenz sinkt wie die der Kultur 2,5 bis zur 46. Stunde ab (vgl. Abb. 3.70). Nach diesem Abfall nimmt die Vitalität der Kulturen wieder zu und bleibt auf einem relativ konstanten Niveau. Die Vitalität der Kultur 5 sinkt bis zur 70. Stunde. Die Kultur 5 erreicht ihre Anfangsvitalität erst in der 120. Stunde eine mit der Referenz und der Kultur 2,5 vergleichbare Vitalität. Retinol scheint nur in der höher konzentrierten Kultur Auswirkungen auf die Vitalität zu haben. Die geringer konzentrierte Kultur 2,5 ist in ihrer Vitalität nicht beeinflusst.

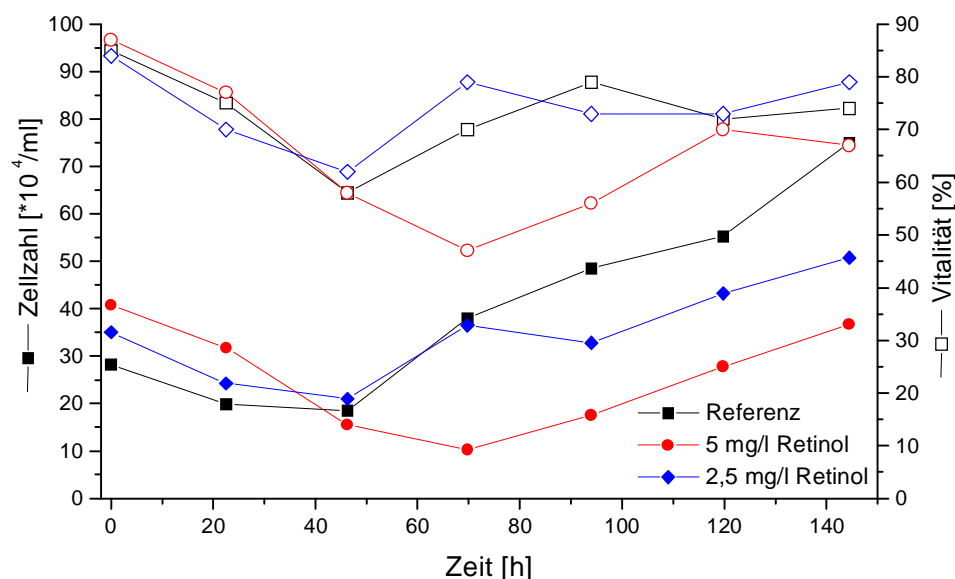


Abb. 3.70 Lebendzellzahl und Vitalität von LR

Zeit [h]	0	23	46	70	94	120	145
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	-	1,8	1,3	1,1	0,5	0,5	0,5
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	-	1,2	0,6	1,4	0,3	0,	0,2
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	-	1,5	0,9	0,5	0,4	0,6	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/*d*1 Mio. Ze] Referenz	-	2,0	1,6	0,4	0,4	-0,1	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	-	1,2	1,2	1,1	0,7	0,1	-0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	-	1,7	1,3	0,4	0,3	-0,2	-0,3

Tab. 3.53 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von LR

Die Glukoseverbrauchsrate der Referenz ist, bis auf drei Ausnahmen, höher als die der substituierten Kulturen (vgl. Tab 3.53). Die Glukoseverbrauchsrate der Kultur 2,5 liegt über der von Kultur 5. Bei den Laktatproduktionsraten sind die der Referenz und von Kultur 2,5 bis auf den Wert der 145. Stunde vergleichbar (vgl. Tab. 3.53). Die Raten der Kultur 2,5 sind minimal kleiner als die der Referenz. Die Laktatproduktionsraten der Kultur 5 sind bis zur 46. Stunde geringer als die der beiden anderen Kulturen. Von der 70. Stunde an liegen die Werte dieser Kultur aber höher. Es sind keine durch Retinol bedingten Veränderungen der Glukoseverbrauchs- und der Laktatproduktionsrate der Kultur 2,5 zu beobachten. Bei Kultur 5 kann die höhere Laktatproduktionsrate durch die Retinol-Zugabe verursacht sein. Auf den Glukoseverbrauch hat das Retinol anscheinend keinen Einfluss.

Die Ammoniumkonzentration der Referenz ist der der substituierten Kulturen vergleichbar (vgl. Abb. 3.71). Größere Unterschiede sind in den ersten 23 Stunden und in der 145. Stunde vorhanden. In beiden Fällen liegt die Konzentration der Referenz über der der substituierten Kulturen. Aufgrund der vergleichbaren Ammoniumkonzentration

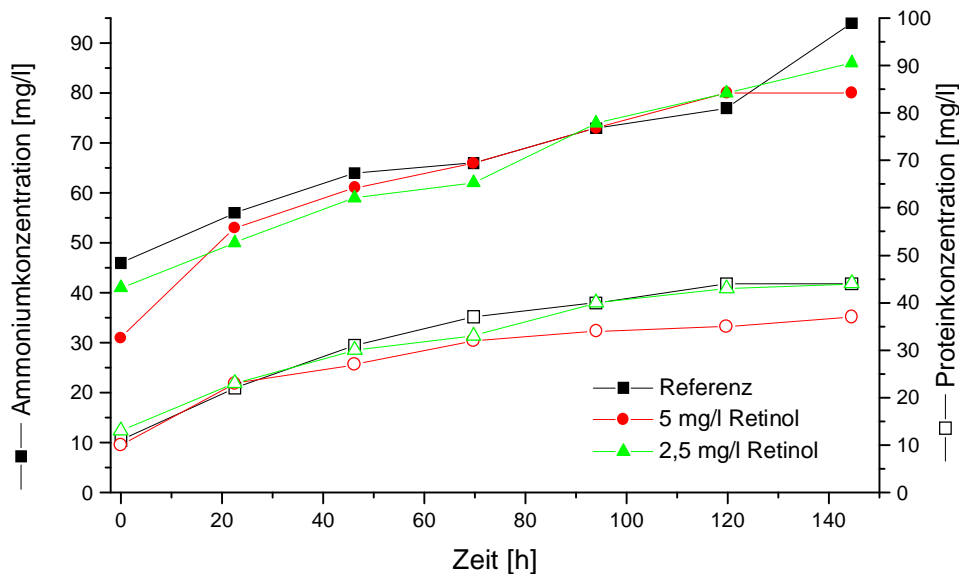


Abb. 3.71 Ammonium- und Proteinkonzentration von LR

Zeit [h]	0	23	46	70	94	120	145
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Referenz	--	44	42	7	16	7	25
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 5	--	65	34	0	50	29	0
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 2,5	--	32	40	11	34	15	12
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Referenz	--	1074	1762	886	119	798	100
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 5	--	371	731	635	328	37	295
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$] Kultur 2,5	--	742	996	806	909	552	309
Wachstumsrate [d^{-1}] Referenz	--	-0,17	-0,03	0,32	0,11	0,05	0,13
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 5	--	-0,12	-0,32	-0,18	0,23	0,19	0,12
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 2,5	--	-0,17	-0,06	0,25	-0,05	0,11	0,07

Tab. 3.54 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von LR

trationen und der differierenden Lebendzellzahlen ergeben sich für Kultur 5 im Durchschnitt die höchsten Ammoniumproduktionsraten und für die Referenz die geringsten (vgl. Tab. 3.54). Auf diese Weise wirkt sich der Retinol-Einfluss über die Lebendzellzahlen auf die Produktionsrate aus und zeigt bei Kultur 5 im Fall des Ammoniums eine Belastung des Stoffwechsels an.

Die Konzentration des Proteins in Kultur 2,5 ist mit der in der Referenz vergleichbar (vgl. Abb. 3.71). Die Proteinkonzentration der Kultur 5 ist nach der 23. Stunde die niedrigste. Dies erklärt sich durch die ab der 46. Stunde geringeren Lebendzellzahlen der Kultur 5 gegenüber den beiden anderen Kulturen. Aufgrund der abweichenden Lebendzellzahl der Kultur 2,5 ab der 70. Stunde sollte die Proteinkonzentration ebenfalls geringer sein. Eine durch Retinol verursachte höhere Produktion sollte sich in Kultur 5 ebenfalls bemerkbar machen, außer die Zellen wären dort so stark geschädigt, dass eine Produktion von Protein nicht mehr oder nur noch eingeschränkt möglich wäre.

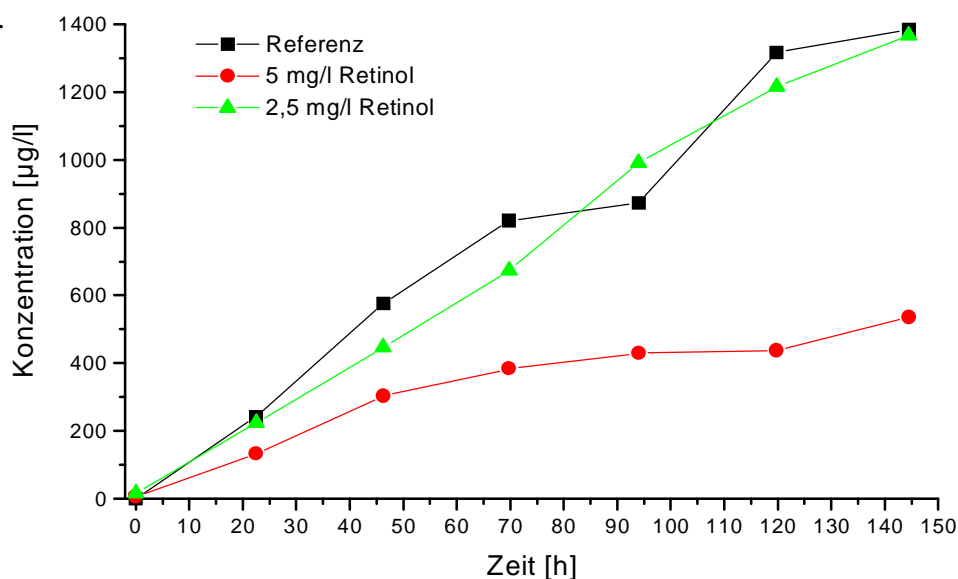


Abb. 3.72 t-PA-Konzentration von LR

Die t-PA-Konzentration der Referenz ist mit der der Kultur 2,5 vergleichbar. Beide erreichen eine maximale Konzentration von 1200 µg/l (vgl. Abb. 3.72). Die t-PA-Konzentration der Kultur 5 erreicht dagegen mit 400 µg/l nur ein Drittel des Referenzwertes. Obwohl die Konzentrationen der Referenz und der Kultur 2,5 vergleichbar sind unterscheiden sich ihre Produktionsraten (vgl. Tab. 3.54). Die Produktionsrate der Kultur 2,5 ist bis auf zwei Ausnahmen während des gesamten Beobachtungszeitraums geringer und sinkt im Verhältnis mit einer geringeren Steigung ab. Die Produktionsraten der Kultur 5 sind niedriger als die der Kultur 2,5 und sinken mit einer ähnlichen Geschwindigkeit. Die geringeren Produktionsraten der substituierten Kulturen sind wahrscheinlich durch das Retinol bedingt. Mit der Höhe der Retinol-Konzentration nehmen die t-PA-Produktionsraten ab.

Anhand der Aminosäuredaten (Daten s. Anhang) ist eine langsamere Abnahme der Glutaminkonzentration in Kultur 5 gegenüber der Referenz und Kultur 2,5 zu erkennen. Während das Glutamin in der Referenz und in Kultur 2,5 schon in der 94. Stunde verbraucht ist, lässt sich in Kultur 5 bis zum Kultivierungsende Glutamin nachweisen. Gleichermaßen ist die Glutaminsäure-Konzentration aufgrund weniger Zellen in der Kultur in der 145. Stunde um 40 mg/l höher als in der Referenz und in Kultur 2,5. Die Glutaminsäure-Konzentration in Kultur 5 erreicht ihr Maximum erst in der 94. Stunde, danach wird es aufgrund der verbrauchten Glutaminkonzentration ebenfalls verstoffwechselt. Das Maximum der Glutaminsäure-Konzentration liegt bei der Referenz und der Kultur 2,5 in der 46. Stunde. Die Aminosäure-Konzentrationen der Kultur 2,5 sind der Referenz wegen den bis zur 70. Stunde fast identischen Lebendzellzahlen vergleichbar. Die Daten der Kultur 5 weichen ebenfalls aufgrund der Lebendzellzahlen von denen der Referenz ab. Auswirkungen von Retinol auf den Aminosäurehaushalt sind nicht zu beobachten.

In dieser Kultivierungsreihe zeigt sich ein negativer Einfluss des Retinols auf die Zellen im Gegensatz zur Kurzzeit-Kultivierung schon bei der Lebendzellzahlen. Die Zellen werden in ihrem Wachstum gehemmt. Eine Wachstumshemmung ist in der Kurzzeit-Kultivierung nicht zu erkennen, obwohl die gleichen Konzentrationen verwendet werden. Da dort der Versuch nur bis zur 91. Stunde betrachtet wird und im Langzeit-Experiment Abweichungen erst in der 94. Stunde für Kultur 2,5 auftreten, kann es sein, dass die möglichen Differenzen in der Kurzzeit-Kultivierung nicht erfasst werden. Das vom Kurzzeit-Experiment abweichende Verhalten der Kultur 5 kann damit erklärt werden, dass aufgrund von Ungenauigkeiten die Retinol-Konzentration im Langzeit-Versuch vermutlich zu hoch sind und dass dieser geringe Unterschied das andere Verhalten der Kultur bewirkt. Den Kurzzeit-Experimenten gleich ist die geringere t-PA-Produktion. Diese ist abhängig von der Konzentration des Retinols in der Kultur. Die Auswirkungen sind in der Kultur 2,5 bei den t-PA-Konzentrationen weniger auffällig als in Kultur 5.

	Referenz	Kultur 5	Kultur 2,5
R_s [%]	17	3	6
τ [N/m ²]	1,8	2,2	2,2

Tab. 3.55 Überlebensrate und Schubspannung von LR

Es werden drei **Langzeit-Scherexperimente** mit den Kulturen der Kultivierungsreihe LR durchgeführt. Die Überlebensraten der einzelnen Kulturen sind wie die Schubspannung in Tab. 3.55 zu finden. Die Überlebensrate der Referenz ist mit 17 % am höchsten. In Kultur 2,5 und 5 betragen die Überlebensraten 6 bzw. 3 %. Die zugehörige Schubspannung zeigt mit 2,2 N/m² eine höhere Belastung der Zellen an.

Die Analysenwerte von LR machen die besseren Bedingungen der Referenz gegenüber den substituierten Kulturen deutlich (vgl. Tab. 3.56). So ist die Abnahme der Glukosekonzentration sowie die in Bezug auf die Retinol-Kulturen hohe Glukoseverbrauchsrate ein Indiz für eine Stoffwechselaktivität der Zellen während des Experiments (vgl. Tab. 3.57). Gleichmaßen verhält es sich mit der Laktatkonzentration und ihrer Verbrauchsrate sowie der t-PA-Konzentration und ihrer Produktionsrate. Die geringe Abnahme der Vitalität sowie der Gesamt- und Lebendzellzahlen spricht gleichfalls gegen einen Einsatz von Retinol in Langzeit-Experimenten.

Anhand der Konzentrationen der Aminosäuren lassen sich nur geringe Unterschiede feststellen (Daten s. Anhang). So nimmt die Glutaminkonzentration der Referenz um knapp 50 mg/l ab. Hingegen beträgt die Abnahme in Kultur 2,5 und 5 nur 30 mg/l. Die

Änderung der/des	Referenz	Kultur 5	Kultur 2,5
... Totzellzahl [10 ⁴ Ze/ml]	4	-11	-1
... Lebendzellzahl [10 ⁴ Ze/ml]	-20	-35	-32
... Gesamtzellzahl [10 ⁴ Ze/ml]	-17	-46	-33
... Vitalität [%]	-48	-53	-79
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	-14	8	8
... Proteinkonzentration [mg/l]	27	11	13
... relativen LDH-Wertes [U/l]	208	28	29
... Glukosekonzentration [g/l]	-0,2	-0,1	-0,1
... Laktatkonzentration [g/l]	0,4	0,1	0,1
... t-PA-Konzentration [µg/l]	269	21	115

Tab. 3.56 Analysenwerte von LR

	Referenz	Kultur 5	Kultur 2,5
Wachstumsrate [d ⁻¹]	-0,76	-1,46	-1,23
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	1,5	0,3	0,8
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze]	2,7	0,5	0,7
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze]	0	42	44
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze]	1887	111	637

Tab. 3.57 Raten von LR

Konzentration des Alanins nimmt in der Referenz und Kultur 2,5 um 11 mg/l zu. In Kultur 5 wird kein Alanin produziert. Die Abnahme des Glutamins ebenso wie die Produktion von Alanin lassen den Rückschluss auf einen Stoffwechsel der Zellen und auf ein, wenn auch zeitlich begrenztes, Überleben zu.

Insgesamt betrachtet ist Retinol als Additiv zur Senkung der Scherempfindlichkeit von Tierzellen in Langzeit-Experimenten nicht geeignet. Im Gegensatz zu Kurzzeit-Versuchen sind die Überlebensraten der substituierten Kulturen deutlich niedriger als die der Referenz. Durch Retinol wird eine Hemmung des Zellwachstums ausgelöst. Zusätzlich wird die t-PA-Konzentration sowie -Produktionsrate gesenkt.

Die aufgezählten negativen Einflüsse des Retinols werden aber durch seine Eigenschaft in Kurzzeit-Scherexperimenten die Scherempfindlichkeit der Zellen zu senken kompensiert. Es ist in Kurzzeit-Kultivierungen und Scherexperimenten daher einsetzbar.

3.2.1.4 Gruppe IV: β -Cyclodextrin, Methyl-Cyclodextrin

In der vierten Gruppe werden β -Cyclodextrin und Methyl-Cyclodextrin auf ihre Wirkung zur Beeinflussung der Scherempfindlichkeit von Tierzellen untersucht. Ihre Wirkungsweise beruht nicht auf der Veränderung der Membranstruktur der Zellen. Ihnen wird eine Wirkungsweise ähnlich der des zugesetzten fötalen Serums zugeschrieben (s. Kap. 1.2.6.7). Hier soll jedoch nicht die unmittelbare Wirkung getestet werden, sondern der indirekte Einfluss auf die Zellen. Die Vitalität der Zellen wird indirekt durch Cyclodextrine gestärkt, indem zellschädigende Metabolite im Medium von ihnen komplexiert und toxische Konzentrationen vermieden werden. Auf diese Weise werden die Zellen während der Kultivierung weniger belastet und sollten so dem Scherstresseinfluss widerstehen können.

In Kultivierungsreihe β -CD01 werden Konzentrationen von 75 und 100 mg/l an β -Cyclodextrin zugesetzt.

In den Lebendzellzahlen unterscheiden sich die Kulturen bis zur 42. Stunde nicht (vgl. Abb. 3.73). Sie durchlaufen bis dahin eine Lag-Phase. Nach diesem Zeitpunkt ändert sich das Verhalten der Kultur 75 gegenüber dem der anderen Kulturen. Die Lebendzellzahlen der Referenz und der Kultur 100 steigen bis zu einem Maximalwert von 40 bzw. $44 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in der 66. Stunde. Die Lebendzellzahl der Kultur 75 sinkt in der 91. Stunde auf ein Minimum von $10 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter ab. Zu erklären ist das nicht vorhandene Zellwachstum nicht, da alle drei Kulturen aus der gleichen Vorkultur angesetzt und gleich behandelt werden. Durch das zugesetzte β -CD kann sie nicht verursacht sein, weil in diesem Fall aufgrund der höheren Konzentration auch die Kultur 100 betroffen sein sollte. Eventuell können Verunreinigungen der Grund sein.

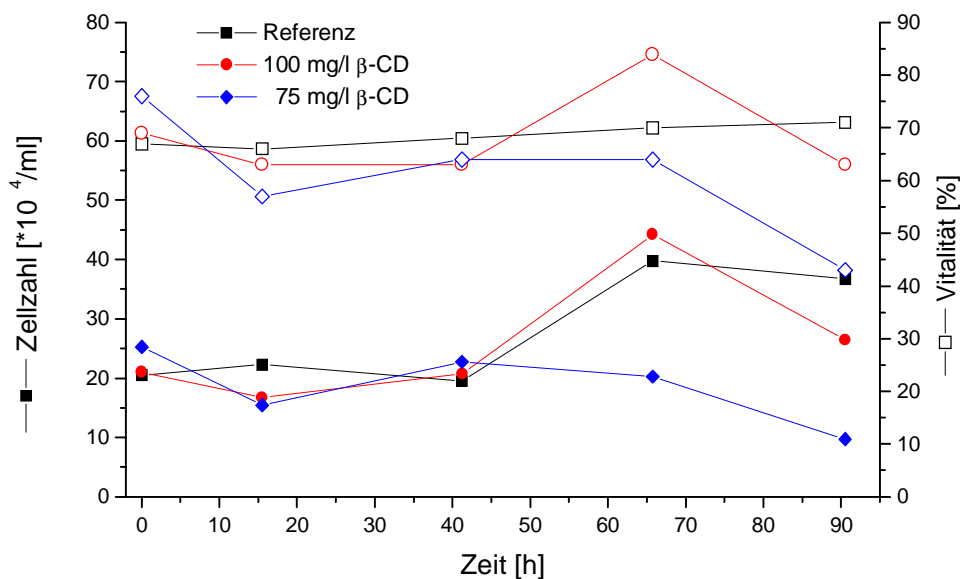


Abb. 3.73 Lebendzellzahl und Vitalität von β -CD01

Zeit [h]	0	16	42	66	91
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	-	1,6	1,3	0,2	0,5
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	-	1,8	1,6	0,2	0,7
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75	-	2,1	0,9	0,1	1,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,2	0,9	0,5	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	1,7	1,1	0,4	0,5
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75	--	1,5	0,8	0,3	0,1

Tab. 3.58 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von β -CD01

Die Wachstumsraten der Kulturen zeigen ein unterschiedliches Verhalten. Dieses ist auf die Schwankungen der Lebendzellzahlen zurückzuführen (vgl. Tab. 3.59). So steigen die Wachstumsraten der Kultur 75 und 100 bis zur 42. bzw. 66. Stunde an. Danach erfolgt ein Abfall bis zum Kultivierungsende. Die Rate der Referenz fällt von der 16. zur 42. Stunde ab, erreicht ihr Maximum in der 66. Stunde und fällt, vergleichbar mit der Rate von Kultur 100 zum Kultivierungsende ab. Das Maximum der Wachstumsrate ist in der Referenz und Kultur 100 zum gleichen Zeitpunkt zu finden. Das Maximum der Kultur 75 liegt 24 Stunden vorher. Ein Einfluss des β -CD ist nicht eindeutig zu bestimmen.

Die Vitalität der Referenz bleibt annähernd konstant (vgl. Abb. 3.73). Die Vitalität der Kultur 100 verhält sich entsprechend. Dagegen nimmt die Vitalität der Kultur 75 um 33 % ab.

Die Glukoseverbrauchsrate der Kultur 100 sowie ihre Laktatproduktionsrate sind höher als die der Referenz (vgl. Tab. 3.58). Die Raten der Kultur 75 sind bis auf den Anfangs- und den Endwert der Glukoseverbrauchsrate niedriger als die der Referenz. Diese Zellen verbrauchen also weniger Glukose und produzieren weniger Laktat. Da die Zellen den Energielieferanten Glukose in geringerem Umfang aufnehmen, ist das Zellwachstum eingeschränkt, was sich in den Lebendzellzahlen bemerkbar macht.

Zeit [h]	0	16	42	66	91
Ammoniumproduktionsrate [μg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	101	63	26	10
Ammoniumproduktionsrate [μg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	25	75	66	8
Ammoniumproduktionsrate [μg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75	--	0	137	14	58
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	601	652	823	712
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	271	676	621	589
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 75	--	624	1699	462	472
Wachstumsrate [d^{-1}] Referenz	--	0,06	-0,05	0,30	-0,03
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 100	--	-0,15	0,09	0,32	-0,22
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 75	--	-0,33	0,16	-0,05	-0,31

Tab. 3.59 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von β -CD01

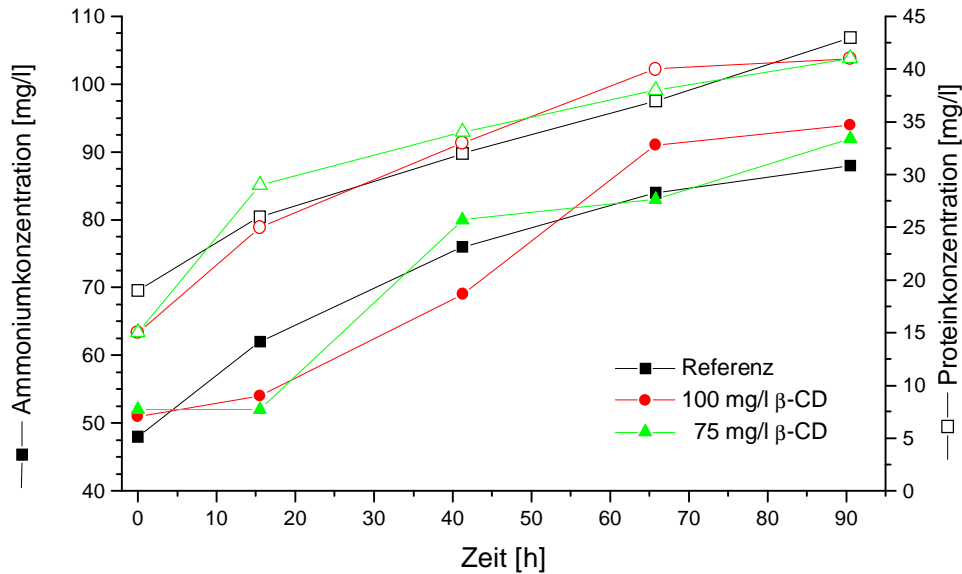


Abb. 3.74 Ammonium- und Proteinkonzentration von β -CD01

Die Zunahme der Ammoniumkonzentration der Referenz ist in den ersten 42 Stunden in Bezug auf Kultur 100 höher, sinkt aber bis zur 91. Stunde unter den Wert dieser Kultur (vgl. Abb. 3.74). Die Konzentrationen der Kultur 75 ähneln denen der Referenz. Aufgrund der un stetigen Zunahme der Ammoniumkonzentration in Kultur 75 folgen auch die Produktionsraten keinem erkennbaren Trend (vgl. Tab. 3.59). Die Ammoniumproduktionsrate der Referenz sinkt dagegen beständig im Verlauf der Kultivierung. Die Produktionsrate der Kultur 100 steigt im Verlauf von der 16. bis zur 42. Stunde an und nimmt nach diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Beobachtungszeitraums ab. Der Anstieg kann durch das zugegebene β -CD bedingt sein. Durch den gleichfalls vorhandenen Anstieg der Produktionsrate in Kultur 100 wird diese Vermutung bekräftigt.

Die Proteinkonzentration der Referenz nimmt stetig zu (vgl. Abb. 3.74). Dagegen ist ein höherer Anstieg von der 0. auf die 16. Stunde in den substituierten Kulturen zu verzeichnen. Die Konzentration des Proteins ist in Kultur 75 von der 16. bis zur 66. Stunde höher als die der Referenz. Anfangs- und Endkonzentration sind niedriger. Die Konzentrationen der Kultur 100 sind am Anfang und am Ende der Kultivierung niedriger als die der Referenz. Wegen der ähnlichen Zellzahlen ist die Proteinkonzentration von Referenz und Kultur 100 vergleichbar. Da aber die Zellzahlen in Kultur 75 ab der 66. Stunde geringer sind, sollte auch die Proteinkonzentration geringer sein. Dies ist nicht der Fall. Deswegen ist eine erhöhte Proteinproduktion bzw. Proteinfreisetzung ins Medium anzunehmen. Eine Schädigung der Zellen ist aufgrund dessen nicht auszuschließen.

Werden die t-PA-Konzentrationen der Kulturen betrachtet, fällt ein ähnlicher Verlauf der Konzentrationszunahme bei Kultur 100 und der Referenz auf (vgl. Abb. 3.75). Dieser ist auf die vergleichbaren Lebendzellzahlen zurückzuführen. Bis zur 42. Stunde sind die Konzentrationen in den beiden Kulturen äquivalent. Nach diesem Zeitpunkt ist die Konzentration in der Referenz höher als in Kultur 100. Die geringere Konzen-

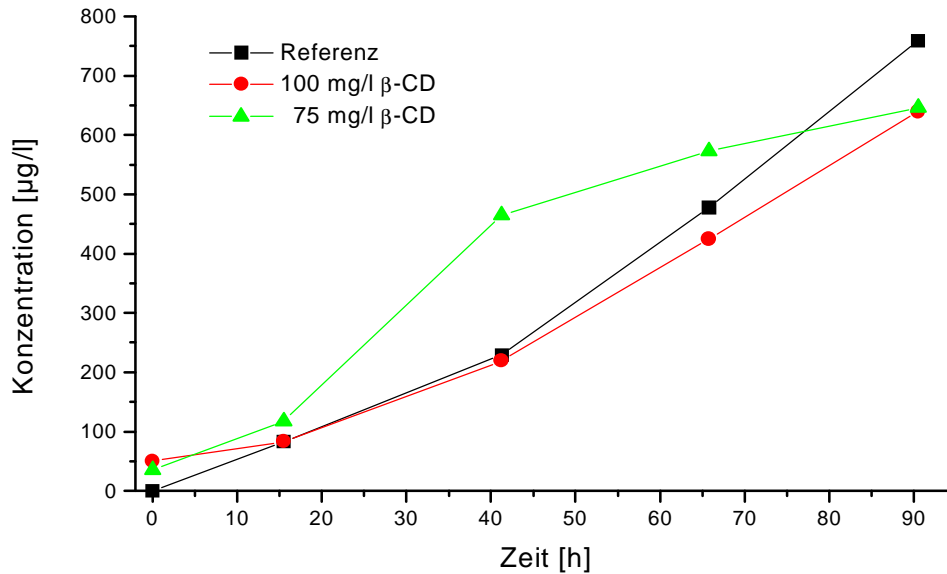


Abb. 3.75 t-PA-Konzentration von β -CD01

tration gegen Versuchsende kann möglicherweise durch das β -CD verursacht sein. Eine vergleichbar geringe Endkonzentration in Kultur 75 würde dieses bestätigen. Die Zunahme der t-PA-Konzentration in Kultur 75 zeigt einen anderen Verlauf. Hier erfolgt ein Anstieg der Konzentration über die Vergleichswerte der Referenz bis zur 66. Stunde. Der Endwert liegt unter dem der Referenz. Dadurch wird die Annahme über den Einfluss des β -CDs auf die t-PA-Konzentration bestärkt. Werden die Produktionsraten der Kulturen betrachtet, fällt auf, dass die Raten der substituierten Kulturen bis zur 42. Stunde mit der Referenz vergleichbar sind, von zwei Ausnahmen abgesehen. Nach diesem Zeitpunkt sind die Raten geringer. Dies begründet ebenfalls die Vermutung, dass ein geringer Einfluss durch β -CD auf die t-PA-Produktion vorhanden ist.

Bei den Aminosäure-Konzentrationen wird Glutamin in der Referenz vollständig verbraucht (Daten s. Anhang). Die Kulturen 75 und 100 verbrauchen im Beobachtungszeitraum die vorhandene Glutaminkonzentration nicht vollständig, was aufgrund der geringeren Zellzahl in Kultur 75 nicht verwundert, in Bezug auf Kultur 100 jedoch einer Erklärung bedarf. Vermutlich ist die im Vergleich zur Referenz im letzten Versuchsabschnitt abgesunkene Zellzahl die Ursache für die geringe, noch vorhandene Konzentration an Glutamin. Es sind in der 91. Stunde noch 17 bzw. 14 mg/l Glutamin in den substituierten Kulturen vorhanden. Aus diesem Grund besitzen die substituierten Kulturen zum Versuchsende auch eine höhere Glutaminsäure-Konzentration als die Referenz. Die Referenz setzt, nachdem ihr Glutaminvorrat erschöpft ist, die entsprechende Säure als Energiequelle weiter um. In den substituierten Kulturen ist dies nicht notwendig. Insgesamt sind die Konzentrationen der Aminosäuren der substituierten Kulturen eher miteinander vergleichbar als mit der Referenz. Die Abweichungen zur Referenz sind gering.

Insgesamt betrachtet zeigen sich keine Abweichungen der Cyclodextrin-Kulturen von der Referenz mit Ausnahme der nicht erkläraren Lebendzellzahlabnahme in

	Überlebensrate R_s [%]			Schubspannung τ [N/m ²]		
	Referenz	Kultur 100	Kultur 75	Referenz	Kultur 100	Kultur 75
Mittelwert	16	45	13	1,9	1,9	1,9

Tab. 3.60 Überlebensraten und Schubspannungen von β -CD01

Kultur 75. Die Kulturen sind miteinander vergleichbar, der Umstand der geringeren Lebendzellzahlen sollte bei der Beurteilung der Scherexperimente mit berücksichtigt werden.

Es werden je Kultur drei **Kurzzeit-Scherexperimente** durchgeführt und die Werte gemittelt. Die Überlebensraten und Schubspannungen sind in Tab. 3.60 aufgeführt. Die Überlebensraten der Referenz und Kultur 75 unterscheiden sich nur um 3 % und sind mit 16 und 13 % gering. Kultur 100 besitzt dagegen eine Überlebensrate von 45 %. Die Schubspannungen der Kulturen sind identisch.

Kultur 100 verzeichnet die geringste Abnahme der Lebend- und Gesamtzellzahl, ebenso wie die geringste Abnahme der Vitalität (vgl. Tab. 3.61). Diese Ergebnisse bestätigen die hohe Überlebensrate der Kultur. Die Änderungen der Protein- sowie Ammoniumkonzentration sowie der Totzellzahlen der Kulturen unterscheiden sich unwesentlich. Sie zeigen für dieses Experiment keine Abweichungen der mit β -CD kultivierten Zellen von der Referenz.

Die vergleichbare Änderung des relativen LDH-Werts von Kultur 100 in Bezug auf Kultur 75 spricht für eine vergleichbare Überlebensrate. Die Zunahme des LDH-Wertes begründet sich durch das Absterben von Zellen und die Freisetzung des intrazellulären LDHs. In diesem Fall ist die Abnahme der Gesamtzellzahl $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in Kultur 100 und damit um $4 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter kleiner als die der Kultur 75. Aufgrund dessen sollte die Änderung des relativen LDH-Wertes kleiner sein. Eine Erklärung für den hohen Wert kann die Schädigung von Zellen sein, die zwar LDH freisetzen, aber noch nicht als tote Zellen erkannt werden können. Eine andere Möglichkeit wäre ein geringerer LDH-Gehalt in den Zellen der Kultur 100.

In Kultur 75 zeigt sich die um 3 % höhere Überlebensrate an der geringeren Abnahme der Lebend- und Gesamtzellzahl gegenüber der Referenz. In Bezug auf die Referenz, ist hier auch der relative LDH-Wert niedriger und entspricht damit einer höheren Überlebensrate.

Änderung der/des	Referenz	Kultur 100	Kultur 75
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	-1	0	1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-18	-5	-10
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-18	-5	-9
... Vitalität [%]	-40	-11	-23
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	0	1	1
... Proteinkonzentration [mg/l]	11	7	7
... relativen LDH-Wertes [U/l]	123	71	70

Tab. 3.61 gemittelte Analysenwerte von β -CD01

Das zugesetzte β -CD scheint die Scherempfindlichkeit der Tierzellen in Abhängigkeit von der Höhe der Konzentration verringern zu können. In der Kultivierung bereitet die β -CD-Konzentration in der Höhe von 100 mg/l keine Probleme. Eine maßgebliche Hemmung des Zellwachstums lässt sich nicht feststellen, genauso wenig eine relevante Änderung der Ammoniumproduktionsrate bzw. der Proteinkonzentration. Die geringe Abweichung der t-PA-Produktionsrate ist vertretbar.

Die im Gegensatz zur Kultur 100 abweichende geringe Überlebensrate der Kultur 75 kann durch die ebenfalls abweichenden Lebendzellzahlen der Kultivierung erklärt werden. Dort schon ist ein Unterschied zu den anderen beiden Kulturen zu erkennen, der vermutlich auf Verunreinigungen zurückzuführen ist (s.o.). Diese schwächen die Zellen, so dass kein Zellwachstum mehr möglich ist. In diesem geschwächten Zustand können die Zellen ebenfalls nur eine Überlebensrate ähnlich der der Referenz erreichen. Die bedeutet aber nicht, dass β -CD als Auslöser des nicht vorhandenen Zellwachstums anzusehen ist, da auch höhere Konzentrationen im Toxizitätstest keinen Einfluss gezeigt haben (s. Kap. 3.1.5).

Die zweite Substanz der Gruppe IV ist **Methyl-Cyclodextrin**. Es wird eine Kurzzeit-Kultivierungsreihe M-CD01 mit Konzentrationen von 75 und 100 mg/l angesetzt und die Ergebnisse diskutiert. Für Kultur 75 fehlen aufgrund einer Infektion die Daten des letzten Kultivierungstages.

Die in Abb. 3.76 aufgeführten Lebendzellzahlen der Kultur 100 ähneln im Verlauf denen der Referenz. Es erfolgt zuerst in beiden Kultivierungen bis zur 47. Stunde eine Lag-Phase der Zellen. Danach steigt die Zellzahl der Kulturen an. Im Gegenteil dazu nimmt die Lebendzellzahl in der Kultur 75 bis zur 66. Stunde nur um $9 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter zu. Die Lebendzellzahlzunahme bei Kultur 100 und der Referenz beträgt bis zu deren Maxima 54 bzw. $55 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Wie in der Kultivierungsreihe β -CD01 (s. Abb. 3.73) enthält auch hier die Kultur mit 75 mg/l die geringsten Lebendzellzahlen. Ein Wachstum ist nicht vorhanden. In der Kultivierungsreihe β -CD wurde eine Verunreinigung als Ursache für die Stagnation der Lebendzellzahlen vermutet. Da jedoch in dieser Kultivierungsreihe das gleiche Phänomen auftritt, ist eine Verunreinigung unwahrscheinlich. Eine mögliche Bindung der Nährstoffe durch M-CD sowie β -CD kann ausgeschlossen werden, da sich dieses auch in der höher konzentrierten Kultur bemerkbar machen sollte. Eine Verwechslung der beiden Kulturen ist aufgrund der sowohl bei β -CD als auch M-CD auftretenden Erscheinung unrealistisch.

Der Verlauf der Wachstumsraten von Referenz und Kultur 100 ist aufgrund der ähnlichen Lebendzellzahlen äquivalent (vgl. Tab. 3.63). Beide steigen nach dem Abfall zur 47. Stunde wieder an um zum Kultivierungsende erneut abzusinken. Die Wachstumsrate der Kultur 75 steigt demgegenüber von der 19. bis zur 66. Stunde an. In Kultur 100 werden keine durch den Zusatz von M-CD verursachten Veränderungen der Wachstumsrate beobachtet. In Kultur 75 dagegen ist die geringe, steigende Wachstumsrate wahrscheinlich auf den Einfluss des M-CD zurückzuführen.

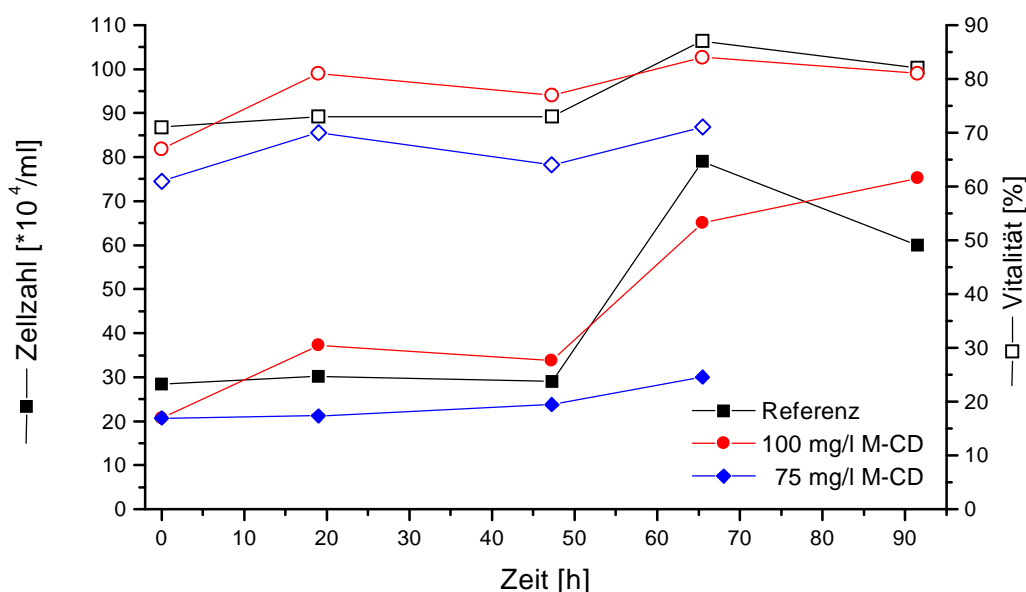


Abb. 3.76 Lebendzellzahl und Vitalität von M-CD01

Zeit [h]	0	19	47	66	92
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	0,9	0,8	0,5	0,3
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	1,3	0,7	0,3	0,3
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75	--	2,0	0,9	0,7	--
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,1	0,9	0,3	0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	1,4	0,8	0,4	0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 75	--	1,9	1,0	0,4	--

Tab. 3.62 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von M-CD01

Die Vitalität der Referenz und der Kultur 100 nimmt zum Versuchsende von 71 bzw. 61 % auf 82 bzw. 81 % zu (vgl. Abb. 3.76). Auch in diesem Punkt differieren die beiden Kulturen nur wenig, wohingegen die Vitalitäten der Kultur 75 um 6 bis 19 % geringer als die der beiden anderen Kulturen sind. Die gegenüber der Referenz und Kultur 100 geringeren Vitalitäten und Lebendzellzahlen sind nicht durch die Verwendung einer anderen Vorkultur bedingt, da alle drei Kulturen aus der gleichen Vorkultur angeimpft werden. Die geringe Vitalität der Kultur 75 gegenüber den beiden anderen Kulturen könnte bei dieser Kultivierung der Grund für die Hemmung des Zellwachstums sein.

In Kultur 75 sind die höchsten Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten zu finden (vgl. Tab. 3.62). Wie in β -CD01 wird in dieser Kultur ebenso mehr Glukose verbraucht und Laktat produziert als in der Referenz und in Kultur 100. Die Laktatproduktionsraten der Kultur 100 sind mit denen der Referenz vergleichbar. Ähnlichkeiten sind bei den Glukoseverbrauchsdaten zu beobachten. Ebenso wie bei den Lebendzellzahlen und der Vitalität lassen sich in Kultur 100 keine durch M-CD bedingten Veränderungen feststellen. Diese sind jedoch in Kultur 75 zu finden. Aufgrund der höheren Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate kann von einer Stresssituation für die Zellen ausgegangen werden.

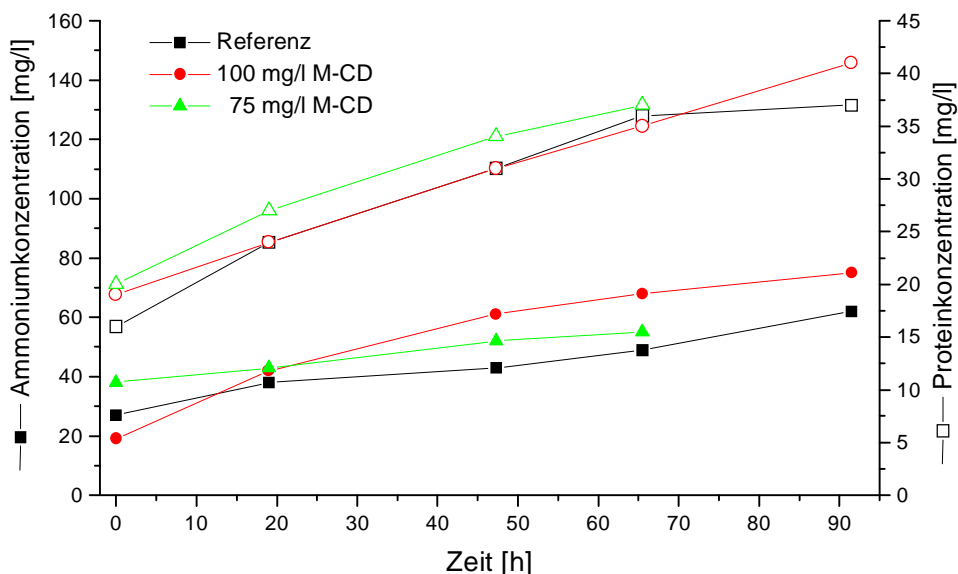


Abb. 3.77 Ammonium- und Proteinkonzentration von M-CD01

Zeit [h]	0	19	47	66	92
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	47	14	15	17
Referenz					
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	100	45	19	9
Kultur 100					
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	30	34	16	--
Kultur 75					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	421	522	468	286
Referenz					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	52	440	559	255
Kultur 100					
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	132	287	1485	--
Kultur 75					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,03	-0,02	0,57	-0,11
Referenz					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,32	-0,04	0,37	0,06
Kultur 100					
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,01	0,04	0,13	--
Kultur 75					

Tab. 3.63 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von M-CD01

Die höchste Ammoniumkonzentration weist Kultur 100 auf (vgl. Abb. 3.77). Sie besitzt zwar den niedrigsten Startwert mit 19 mg/l, die Zunahme ihrer Konzentration beträgt aber bis zur 66. Stunde 56 mg/l. Die Konzentrationen der Referenz und der Kultur 75 nehmen in diesem Zeitraum um 35 bzw. 22 mg/l zu. Aus diesem Grund ist die Ammoniumproduktionsrate der Kultur 100 höher als die der Kultur 75 und bis auf eine Ausnahme auch höher als die der Referenz (vgl. Tab. 3.63). Die hohe Ammoniumproduktionsrate kann durch die Zugabe von M-CD bedingt sein. Diese Annahme lässt eine ebenfalls hohe Produktionsrate in der Kultur 75 erwarten. Mit den vorliegenden Daten kann das bestätigt werden (s.o.). Eine durch Cyclodextrin verursachte Erhöhung der Ammoniumproduktionsrate ist schon in Kultivierungsreihe β -CD vermutet worden.

Die Proteinkonzentrationen unterscheiden sich geringfügig (vgl. Abb. 3.77). Die Konzentration nimmt linear zu. Obwohl die Lebendzellzahl der Kultur 75 in der 66. Stunde deutlich geringer ist als die der beiden anderen Kulturen ist die Proteinkonzentration höher. Dies kann durch das vermehrte Austreten von Protein aus den Zellen, eventuell aufgrund von Schädigungen der Membran, bedingt sein.

Wird die Produktivität und die Konzentration des t-PAs der einzelnen Kulturen betrachtet, so fällt ein geringer Konzentrationsunterschied von 14 und 46 $\mu\text{g}/\text{l}$ zwischen der Referenz und Kultur 100 auf (vgl. Abb. 3.78). Der Verlauf der Konzentrationszunahme ist in beiden Kulturen äquivalent, wenn der Anfangswert der Kultur 100 nicht mit einbezogen wird. Die t-PA-Konzentration der Kultur 75 ist aufgrund der geringeren Zellzahl gleichfalls geringer als die der beiden anderen Kulturen. Der im Vergleich zur Referenz und zur Kultur 100 hohe Wert von t-PA der 66. Stunde kann wie bei der Proteinkonzentration durch die Freisetzung aufgrund von Zellschäden begründet werden oder es liegt ein Messfehler vor.

Die Produktionsraten der Kultur 100 und der Referenz sind miteinander vergleichbar (vgl. Tab. 3.63). Der Unterschied in der Produktionsrate der 19. Stunde ist in der im

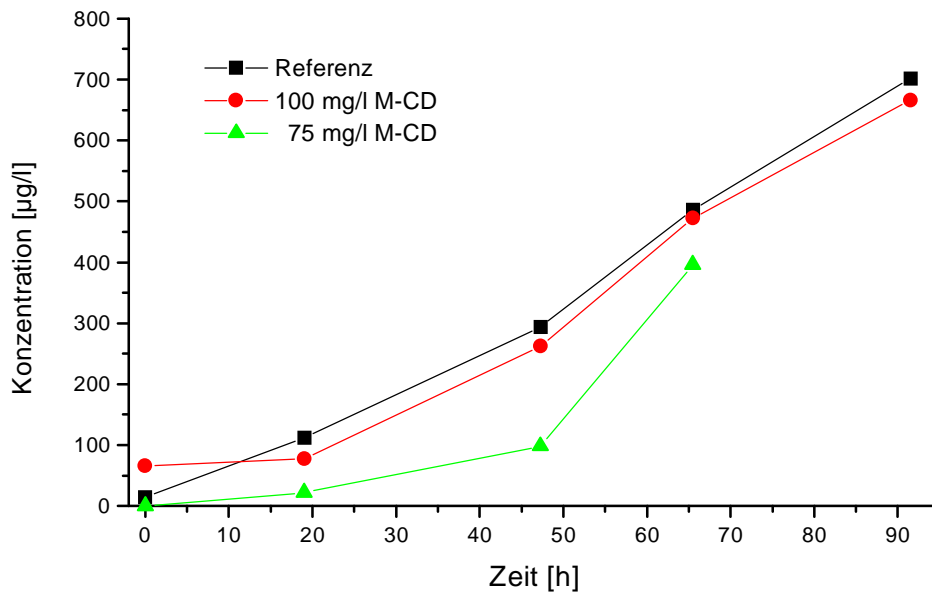


Abb. 3.78 t-PA-Konzentration von M-CD01

Vergleich zur Referenz hohen t-PA-Anfangskonzentration der Kultur 100 begründet. Die Produktionsraten der Kultur 75 nehmen im Versuchsverlauf zu während die der beiden anderen Kulturen relativ konstant bleiben. Es zeigt sich, dass der Faktor, welcher das Zellwachstum hemmt, ebenfalls für eine anfängliche Hemmung der t-PA-Produktion verantwortlich ist. Die höhere M-CD-Konzentration hat keinen Einfluss auf die t-PA-Produktion.

In den Konzentrationen der Aminosäuren finden sich nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen (Daten s. Anhang). Die anfängliche Glutaminkonzentration ist in der 92. Stunde von den Zellen der Referenz und Kultur 100 verstoffwechselt. Auch die Alaninkonzentrationen unterscheiden sich in der 66. Stunde nicht. Allein die Glycin- und die Glutaminkonzentration in der Kultur 75 weicht zu diesem Zeitpunkt von der der Referenz um 9 bis 13 mg/l ab.

Die Kultur 100 der Kultivierungsreihe M-CD01 unterscheidet sich nur in wenigen Punkten von der Referenz. Es wird eine höhere Ammoniumproduktionsrate festgestellt. Zellzahl, Vitalität, Wachstum, Proteinkonzentration sowie t-PA-Konzentration und -Produktion sind vergleichbar. Kultur 75 ist nicht mit der Referenz zu vergleichen, ebensowenig mit Kultur 100.

Es werden je Kultur drei Kurzzeit-Scherexperimente durchgeführt, von Kultur 75 nur eines. Die erhaltenen Werte werden gemittelt. Da von Kultur 75 jeweils nur ein Wert vorliegt werden diese Daten zwar aufgeführt, aber nicht bewertet.

	Überlebensrate R_s [%]			Schubspannung τ [N/m^2]		
	Referenz	Kultur 100	Kultur 75	Referenz	Kultur 100	Kultur 75
Mittelwert	15	23	(8)	2,0	2,0	(2,0)

Tab. 3.64 Überlebensrate und Schubspannung von β -CD01, () nicht bewertet

Änderung der/des	Referenz	Kultur 100	Kultur 75
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	-1	0	(-2)
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-23	-12	(-25)
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-24	-11	(-27)
... Vitalität [%]	-36	-43	(-51)
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	5	1	(-14)
... Proteinkonzentration [mg/l]	8	6	(6)
... relativen LDH-Wertes [U/l]	54	59	(94)

Tab. 3.65 gemittelte Analysenwerte von M-CD01, () nicht bewertet

Die in Tab. 3.64 dargestellten Überlebensraten ergeben für Kultur 100 einen Wert von 23 %. Die Referenz besitzt eine Überlebensrate von 15 %. Die ermittelten Schubspannungen sind identisch (vgl. Tab. 3.64).

In Tab. 3.65 sind die gemittelten Analysenwerte aufgeführt. Sie zeigen für die Referenz mit der geringsten Überlebensrate auch die höchste Gesamtzellzahl- und Lebendzellzahl- sowie Vitalitätsabnahme. Gleichwohl ist hier mit 54 U/l der relative LDH-Wert dem der Kultur 100 vergleichbar. Zu erwarten ist ein höherer Wert, da die Abnahme der Gesamt- bzw. Lebendzellzahl doppelt so hoch ist. Der dennoch vergleichbare Wert lässt einen geringeren LDH-Gehalt in den Zellen der Referenz vermuten. Kultur 100 besitzt mit einer Lebend- und Gesamtzellzahlabnahme von 12 bzw. $11 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter die geringste Abnahme der Zellzahlen.

Die Proteinkonzentration der Referenz ist mit der von Kultur 100 vergleichbar. Die Änderung der Ammoniumkonzentration ist unwesentlich höher. Beide Konzentrationen werden nicht durch die M-CD-Zugabe in der Kultivierung von Kultur 100 beeinflusst.

Die Ergebnisse der Kultivierungsreihe von M-CD01 sind mit denen von β -CD01 äquivalent, ebenso die Ergebnisse der Kurzzeit-Scherexperimente. Die Überlebensraten sind zwar geringer als die der β -CD-Kultivierungsreihe, aber auch hier weist die substituierte Kultur die höhere Überlebensrate auf. Da keine Beeinträchtigung durch M-CD während der Kultivierung bei einer Konzentration von 100 mg/l vorliegt, kann es in dieser Konzentration als scherreduzierendes Additiv eingesetzt werden. Die Konzentration von 75 mg/l sollte bei M-CD und β -CD eingehender untersucht werden, was aber den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überschritten hätte.

3.2.1.5 Fazit der Kurzzeit- und Langzeit-Scherexperimente

Die Änderungen der Überlebensraten ($\Delta \bar{R}_s$) und Schubspannungen ($\Delta \tau$) ergeben sich aus der Differenz der Werte der jeweilige Referenz und denen der Mediumzusätze. Sie sind in Tab. 3.66 für die entsprechenden Additive aufgeführt. Außerdem werden die absoluten Schubspannungen angegeben.

		Konzentration [mg/l]	$\Delta \bar{R}_s$ [%]	$\Delta \tau$ [N/m ²]	τ [N/m ²]
Gruppe I	Cholesterin	100	+20	0,0	1,9
	Cholesterin	125	+25	0,0	1,9
	Cholesterin in Vorkultur	100	+16	-0,2	1,8
	Cholesterin in Vorkultur	125	+27	-0,2	1,8
	Ergosterin	2,5	-6	+0,1	1,9
	Ergosterin	5	+15	0,0	1,9
	Ergosterin	10	-7	-0,1	1,8
	Ergosterin	20	-11	-0,1	1,8
Gruppe II	Cholsäure	25	+44	0,0	1,9
	Cholsäure	50	+26	0,0	1,9
	Cholsäure	75	+15	0,0	1,9
	Deoxycholsäure	4	+36	-0,1	1,9
	Deoxycholsäure	10	+23	-0,1	1,9
Gruppe III	Phosphatidylcholin	25	+14	0,0	1,8
	Phosphatidylcholin	50	+3	+0,2	2,0
	Testosteron	75	+57*	-0,4*	1,9
	Testosteron	150	+23*	-0,4*	1,9
	Retinol	2,5	+19	0,0	1,8
	Retinol	5	+21	0,0	1,8
	Retinol	10	+35	0,0	1,8
Gruppe IV	β -Cyclodextrin	75	-3	0,0	1,9
	β -Cyclodextrin	100	+29	0,0	1,9
	Methyl-Cyclodextrin	75	-7	0,0	2,0
	Methyl-Cyclodextrin	100	+5	0,0	2,0

Tab. 3.66 Fazit der Kurzzeit-Scherexperimente, * Bewertung eingeschränkt, da keine Referenz vorhanden

		Konzentration [mg/l]	$\overline{\Delta R_s}$ [%]	$\Delta\tau$ [N/m ²]	τ [N/m ²]
Gruppe I	Cholesterin	100	+23	0,0	1,9
Gruppe II	Cholsäure	25	+56	0,0	1,9
	Cholsäure	50	-10	+0,3	2,3
Gruppe III	Phosphatidylcholin	25	-8	-0,1	2,0
	Phosphatidylcholin	50	-10	0,0	2,1
	Testosteron	75	-1	0,0	2,2
	Testosteron	100	-3	-0,1	2,2
	Retinol	2,5	-11	+0,4	2,2
	Retinol	5	-14	+0,4	2,2

Tab. 3.67 Fazit der Langzeit-Scherexperimente

Für eine Beurteilung werden die Differenzen der Überlebensraten in Bezug auf die jeweilige Referenz in zwei Gruppen eingeteilt (vgl. Tab. 3.66 u. 3.67). In *Gruppe A* (grüne Markierung) ist zum einen eine Differenz der Überlebensrate ab knapp 20 % als besonders vorteilhaft anzusehen, da 20 % und mehr Zellen gegenüber der Referenz überleben. In *Gruppe B* (rote Markierung) ist zum anderen die Differenz unterhalb von 8 % als besonders negativ anzusehen, weil in diesen Fällen das zugesetzte Additiv zu einer geringeren Überlebensrate in Bezug zur Referenz führt. Bei den Kurzzeit-Experimenten fallen demnach in die Gruppe A: Cholesterin (100 u. 125 mg/l), Cholesterin in Vorkultur (125 mg/l), Cholsäure (25 u. 50 mg/l), Deoxycholsäure (4 u. 10 mg/l), eingeschränkt Testosteron (75 u. 150 mg/l), da keine Referenz vorhanden ist und Retinol (2,5, 5 u. 10 mg/l). Bei den Langzeit-Experimenten sind es nur noch Cholesterin (100 mg/l) und Cholsäure (25 mg/l). Zur Gruppe B der Kurzzeit-Experimente zählen Ergosterin (2,5, 10 u. 20 mg/l), Phosphatidylcholin (50 mg/l), β -Cyclodextrin (75 mg/l) und Methyl-Cyclodextrin (75 u. 100 mg/l). Für die Langzeit-Experimente fallen in die Gruppe B: Cholsäure (50 mg/l), Phosphatidylcholin (25 u. 50 mg/l), Testosteron (75 u. 150 mg/l) und Retinol (2,5 u. 5 mg/l). Die verbleibenden Additive werden keiner Gruppe zugeordnet.

Die Zuordnung der Additive in die Gruppen bedeutet für die Gruppe A, dass eine Verwendung zur Scherreduzierung in CHO-Zellen erfolgen kann. In der Gruppe B erzielen die Additive dagegen keine Wirkung und sollten nicht zur Scherreduzierung verwendet werden.

Die Schubspannungen der Gruppe A ergeben für die Kurzzeit-Experimente einen durchschnittlichen Wert von 1,9 N/m², die der Gruppe B einen durchschnittlichen Wert von ebenfalls 1,9 N/m². Für die Referenz beträgt die mittlere Schubspannung in den Kurzzeit-Experimenten ebenso 1,9 N/m². Aufgrund der gleichen Schubspannung

können sich die unterschiedlichen Überlebensraten nur aus den verschiedenen Zusätzen begründen.

In den Langzeit-Experimenten treten höhere Schubspannungen auf, die nicht von allen Additiven kompensiert werden können. Dazu sind nur Cholesterin und Cholsäure in der Lage. Bei ihnen ist die Schubspannung $1,9 \text{ N/m}^2$. Die Schubspannung der Additive der Gruppe B liegt im Durchschnitt bei $2,2 \text{ N/m}^2$ und somit wesentlich höher. Die mittlere Schubspannung der Referenz in den Langzeit-Experimenten liegt bei $2,0 \text{ N/m}^2$. Ist bei den in Gruppe B in den Kurzzeit-Experimenten zusammengefassten Additiven der Nachteil der höheren Schubspannungen noch nicht gegeben, so ist dies bei den Langzeit-Experimenten der Fall. Die Additive der Gruppe B haben im Durchschnitt eine höhere Schubspannung gegenüber der Referenz.

Werden die einzelnen Schubspannungen der Gruppe B in den Langzeit-Experimenten mit denen der Additive in den Kurzzeit-Experimenten verglichen, so wird ein Anstieg der Schubspannungen festgestellt. Diese Additive sind bei geringeren Schubspannungen in der Lage eine Scherreduzierung in CHO-Zellen zu erzielen, können aber bei höheren Schubspannungen, wie sie in den Langzeit-Experimenten auftreten, dieses nicht mehr beeinflussen.

Es zeigt sich, dass die Gruppeneinteilung aufgrund ähnlicher Eigenschaften zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Dies ist besonders gut anhand Gruppe II (Gallensäuren) und Gruppe IV (Cyclodextrine) zu erkennen. Eine Ausnahme bildet Gruppe I (Cholesterin-Ähnliche). Gruppe III bildet keine Ausnahme, da die Substanzen dieser Gruppe zugeordnet werden, weil sie zu keiner der anderen Gruppen gezählt werden können und verschiedene Eigenschaften haben.

Die Substanzen der **Gruppe I, Cholesterin** und Ergosterin, zeigen ein grundlegend verschiedenes Verhalten, welches sich nicht zuletzt in den Überlebensraten äußert. Sie unterscheiden sich in der toxischen Konzentration. Die des Ergosterins ist niedriger, sie liegt um die 40 mg/l , während die des Cholesterins zwischen 125 und 175 mg/l liegt. Dementsprechend ist die eingesetzte Konzentration des Ergosterins auch geringer als die des Cholesterins. Trotzdem treten bei den eingesetzten Konzentrationen von $2,5$ und 5 mg/l in den Kulturen der Kultivierungsreihe E03 Abnahmen der Lebendzellzahlen auf. Ebenso tritt eine Verringerung der t-PA-Produktion auf. Eine Erhöhung der Glukoseverbrauchs- und der Laktatproduktionsrate ist zu bemerken. Beides deutet auf einen toxischen Einfluss durch das eingesetzte Ergosterin hin. Anhand des im Vorfeld durchgeführten Toxizitätstest ist dies nicht zu erkennen. Die durch die Kultivierung mit Ergosterin geschwächten Zellen können in den darauf folgenden Scherstressversuchen dem Scherstress nicht widerstehen und werden im Gegensatz zur Referenz und im Gegensatz zu den Zellen der Cholesterin-Kultivierungsreihen größtenteils zerstört. Die ermittelten Überlebensraten liegen mit 6 bis 11% unter und mit 15% über denen der Referenz, wobei die Überprüfung der höchsten Überlebensrate aus zeitlichen Gründen nicht stattfinden konnte. Die Zellen der Cholesterin-Kulturen dagegen zeigen kein durch toxische Einflüsse verändertes Verhalten, son-

den sind während der Kultivierung mit der Referenz vergleichbar. Die zugesetzten Konzentrationen an Cholesterin sind demzufolge nicht toxisch. Sie zeigen der Referenz gegenüber aber auch keinen positiven Vorteil, z.B. ein verbessertes Wachstum o.ä. Sie zeigen jedoch anhand der Scherstressversuche eine deutliche Steigerung der Überlebensraten, die mit 16 bis 27 % über denen der Referenz liegen. Die Ergebnisse mit Cholesterin bestätigen die zuvor von Reich (1996), Weidemann (1993) und Tomczkowski (1993) ermittelte Senkung der Scherempfindlichkeit durch Cholesterin auch im proteinfreiem Medium mit einer anderen Zelllinie. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich das zugefügte Cholesterin auch bei dieser Zelllinie in die Zellmembran einlagert und durch diese gewonnene Verstärkung eine erhöhte Scherresistenz erzielt werden kann.

Die ebenfalls erwartete Senkung der Scherempfindlichkeit ist bei der Kultivierung mit **Ergosterin** nicht eingetreten, obwohl es als Cholesterinanalogenes in Hefen die gleichen Voraussetzungen mitbringt. Es ist in den Hefen gleichfalls ein Membranbestandteil, der die Membran aufgrund seiner starren Struktur versteift. Wahrscheinlich ist die Ursache der geringeren Überlebensraten bei Tierzellen darin begründet, dass diese das Ergosterin nicht in die Membran einbauen können, weil es normalerweise nicht in ihrem Stoffwechsel vorkommt. Dies erklärt aber noch nicht die Hemmung des Zellwachstums, sowie die erhöhten Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten. Es kann sein, dass das Ergosterin als Cholesterin Analoges wegen der ähnlichen Struktur die entsprechenden Enzyme und Reaktionswege des Cholesterins blockiert und so die Produktion der aus Cholesterin gewinnbaren Substanzen, wie z.B. Steroidhormone, verhindert bzw. einschränkt. So wäre z.B. die Bildung von Vitamin D beschränkt, welches für den Calciumhaushalt der Zelle zuständig ist, der eine große Rolle in der Signalübertragung spielt (Alberts 1997) und der auch die Scherempfindlichkeit der Zellen beeinflussen kann (Williams et al. 1994, Xiao et al. 1997, Yoshikawa et al. 1997). Auf diesem Wege wäre die Zelle in ihrem Stoffwechsel gestört bzw. gehemmt, was auch im Aminosäurehaushalt auffallen sollte. Werden die entsprechenden Aminosäuredaten der Ergosterin-Kulturen betrachtet (s. Anhang), können einige Abweichungen zur Referenz festgestellt werden. Die Vermutung, dass durch das Ergosterin wichtige Stoffwechselwege blockiert werden, bestätigt sich dadurch.

Eine ähnliche Blockierung von Stoffwechselwegen ist in **Gruppe II** bei Cholsäure und Deoxycholsäure nicht anzunehmen, da z.B. die Lebendzellzahlen nicht im gleichen Maße von denen der Referenz abweichen, wie das bei Ergosterin der Fall ist. Dies ist vermutlich auf die geringere Ähnlichkeit mit Cholesterin zurückzuführen.

Die toxische Konzentration der **Cholsäure** liegt höher als die des Ergosterins, nämlich zwischen 50 und 100 mg/l, ist aber geringer als die des Cholesterins. Eingesetzt werden 25 und 50 mg/l Cholsäure. Im Fall der Cholsäure werden für beide untersuchten Konzentrationen geringere Ammonium- und Proteinkonzentrationen als in der Referenz gemessen, sowie teilweise erhöhte t-PA-Produktionsraten ermittelt. Dies deutet auf einen Eingriff in den Stoffwechsel der Zellen hin. Für die geringere Konzentration

wird gleichzeitig eine geringere Lebendzellzahl festgestellt. Die einfachste Erklärung dafür ist eine Schädigung der Zellen beim Animpfen der Kultur 25. Dies erklärt auch den darauffolgenden Abfall der Zellzahl. Eine andere mögliche Erklärung kann eine bei dieser Konzentration vorliegende Deaktivierung zur Zellteilung wichtiger Funktionen sein, z.B. die Verhinderung des Membranaufbaus aufgrund der Cholsäureeigenschaft Lipide in Lösung zu bringen. Das „bessere“ Wachstum der Kultur 50 lässt sich mit der höheren Animpfdichte begründen. Eventuell ist der oben angesprochene vermutete Effekt konzentrationsabhängig und selbstregulatorisch: D.h. wird eine bestimmte Cholsäure-Konzentration überschritten, wird die Auslösung dieses Effektes, hier die Hemmung der Zellteilung, durch die gleiche Substanz verhindert. Die Überprüfung dieser Vermutung hätte allerdings den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Die Ergebnisse der Scherexperimente zeigen eine Abhängigkeit der Scherreduzierung von der Höhe der Cholsäure-Konzentration. Wird davon ausgegangen, dass sich Cholsäure in den Zellmembranen einlagert, wie dies bei Cholesterin der Fall ist, kann bei einer vermehrten Einlagerung die Zellmembran an Flexibilität verlieren. Das bedeutet bei einer Zunahme der Belastung durch Scherstress, dass die gewonnene Resistenz aufgrund der verminderten Flexibilität wieder abnimmt. Eine Verminderung der Flexibilität ist mit einer Versteifung der Membran gleichzusetzen und kann durch eine Temperaturabsenkung hervorgerufen werden. Nimmt die Kultivierungstemperatur ab, so vermindert sich die Beweglichkeit der Moleküle innerhalb der Membran (Alberts 1997, Karlson 1994). Der stabilisierende Effekt einer Temperaturabsenkung ist z.B. bei der Kultivierung von CHO-Zellen beobachtet worden (Reich 1996) und wird in den Temperaturexperimenten in dieser Arbeit näher untersucht.

Im Vergleich zu Ergosterin hat Cholsäure den Vorteil der Löslichkeit in wässrigen Medien, einer höheren toxischen Konzentration, einer geringeren negativen Beeinflussung der Zellen und der Senkung der Scherempfindlichkeit der Zellen. Gegenüber Cholesterin kann mit einer höheren Senkung der Scherempfindlichkeit und geringerer Materialkosten aufgewartet werden.

Bei der Kultivierungsreihe von **Deoxycholsäure** unterscheiden sich die Lebendzellzahlen der substituierten Kulturen kaum von der Referenz. Dies ist ein Zeichen, dass die Zellteilung durch die Zugabe von Deoxycholsäure nicht eingeschränkt wird. Andere Stoffwechselwege werden durch die Deoxycholsäure dennoch beansprucht. So ist z.B. die Proteinkonzentration geringer und die Ammoniumkonzentration teilweise höher sowie die am Versuchsende erzielte t-PA-Konzentration geringer. Eine geringere Proteinkonzentration (einschließlich t-PA, welches auch ein Protein ist) bedeutet eine geringere Konzentration an Botenstoffen (Hormonen) und Enzymen. Durch die begrenzte Kapazität der Katalysatoren können funktionsfähige Stoffwechselwege beschränkt sein. Diese Beschränkung ist in den substituierten Kulturen bei Deoxycholsäure nur bei einem untersuchten Parameter zu erkennen. Die Ammoniumkonzentration ist größtenteils höher als die der Referenz. Die geringe Proteinkonzentration

tration äußert sich ebenfalls in gegenüber höheren Aminosäure-Konzentrationen der Referenz. Da weniger Protein hergestellt wird, werden auch weniger Bausteine (Aminosäuren) benötigt. Auf welchem Weg die Deoxycholsäure die Proteinbiosynthese hemmt kann nur vermutet werden, da über die Funktionen der Deoxycholsäure im speziellen wenig bekannt ist.

Eine andere Möglichkeit um die geringere Proteinkonzentration zu erklären, ist ein verringertes Austreten der Proteine aus den Zellen ins Medium. Dies könnte die Folge einer veränderten Membranzusammensetzung sein. Eventuell werden vermehrt Lipide wegen der durch Deoxycholsäure besseren Emulgation in die Membran eingebaut und weniger Proteincarrier, so dass dadurch die Möglichkeit Proteine ins Medium zu transportieren herabgesetzt ist. Diese Vermutung erklärt zwar die höheren Aminosäure-Konzentrationen – weniger Proteincarrier gleich geringerer Verbrauch an Aminosäuren – aber nicht die höhere Ammoniumkonzentration.

Ebenso wie Cholsäure zeigt Deoxycholsäure eine Zunahme der Scherempfindlichkeit in den substituierten Kulturen bei einer Erhöhung der Konzentration. Es gelten die gleichen Überlegungen wie für Cholsäure (s.o.).

Deoxycholsäure wird in 0,2 M NaOH gelöst, was im Gegensatz zur wasserlöslichen Cholsäure ein Nachteil ist. Außerdem ist die toxische Konzentration geringer. Das kann die Dosierung aufgrund der geringen Mengen erschweren. Auch ist die t-PA-Konzentration in den substituierten Kulturen geringer als in der Referenz, wohingegen bei Cholsäure eine vergleichbare, teilweise höhere t-PA-Konzentration festgestellt wird. Dies ist ein weiterer Nachteil gegenüber Cholsäure. In den eingesetzten Konzentrationen liegt die Scherreduzierung in einem mit Cholesterin vergleichbaren Bereich wohingegen die Wirksamkeit gegenüber Cholsäure geringer ist.

In **Gruppe III** sind die Ergebnisse zur Beeinflussung der Scherempfindlichkeit uneinheitlich. Das liegt zum einen an den unterschiedlichen biologischen Funktionen der Substanzen, zum anderen an den unterschiedlichen Strukturen der eingesetzten Stoffe. Aus diesem Grund sind differierende Ergebnisse zu erwarten.

PC als natürlicher Bestandteil der Zellmembran ist nicht wasserlöslich und wird in Ethanol so den Kulturen zugesetzt, dass die toxische Konzentration zwischen 50 und 100 mg/l nicht überschritten wird. Die Auswirkungen des PCs auf die Zellen sind denen des Ergosterins ähnlich. In beiden substituierten Kulturen wird eine Zunahme der Lebendzellzahlen erst in den letzten 24 Stunden des Versuchs verzeichnet. Die Wachstumsrate und die Vitalität ist geringer als die der Referenz. Es werden erhöhte Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten verzeichnet. Dies alles deutet darauf hin, dass die Zellen einer Stresssituation ausgesetzt sind. Ethanol als Ursache für den chemischen Stress ist unwahrscheinlich, da die toxische Konzentration von 0,6 % nicht überschritten wird. Bei Zellen geringerer Vitalität, wie in diesem Experiment, ist ein Einfluss nicht auszuschließen, da er nicht untersucht wurde. Da die Referenz eine äquivalente Menge Ethanol enthält und sich dort die aufgezählten Phänomene nicht finden, kann von PC als Verursacher ausgegangen werden.

Vermutlich wird durch das Überangebot von PC das Molekül vermehrt in die Zellmembran eingebaut. Dadurch könnte, abhängig von der Konzentration, eine Destabilisierung der Membran eintreten. Das würde auch die geringeren bzw. geringfügig höheren Überlebensraten gegenüber der Referenz erklären. Aufgrund einer destabilisierten Zellmembran wäre auch die Nährstoffaufnahme über die Membran erschwert, womit wiederum das fehlende Zellwachstum und die geringe Vitalität erklärt werden könnte.

Eine Destabilisierung der Zellmembran ist in den **Testosteron**-Experimenten nicht erkennbar. Diese sind jedoch wegen der fehlenden Referenz schwer zu interpretieren. Gegenüber der Ersatzreferenz kann eine vergleichbare Lebendzellzahl festgestellt werden. Außerdem ist eine um einen konstanten Betrag gegenüber der Referenz geringere Ammonium- sowie Proteinkonzentration zu beobachten. Es tritt eine erhöhte Laktatproduktionsrate in den substituierten Kulturen auf. Die aufgezählten Unterschiede zur Referenz können die Folge von unterschiedlichen Vorkulturen oder womöglich durch das zugefügte Testosteron bedingt sein. Die im Langzeit-Experiment ermittelten Daten unterscheiden sich in ihren Werten deutlich von denen des Kurzzeit-Experiments. Eine geringere Lebendzellzahl und Vitalität sind in den substituierten Kulturen schon ab dem ersten Kultivierungstag zu finden. Wobei die geringer substituierte Kultur aufgrund der niedrigeren Animpfdichte kleinere Zellzahlen als die höher substituierte Kultur aufweist. Es stellt sich die Frage, welche Daten ausgewertet werden können: die ohne Vergleichsreferenz oder die, die den in den Toxizitätstests ermittelten Daten weitgehend widersprechen. Bei den substituierten Kulturen im Langzeit-Experiment wäre ein toxischer Einfluss aufgrund einer hohen Testosteron-Konzentration durch eine verkehrte Berechnung denkbar. Daneben kann eine Verunreinigung der Grund für den Vitalitätsabfall und das nicht vorhandene Wachstum sein. Die im Langzeit-Experiment erhaltenen Ergebnisse zur Scherreduzierung bestätigen die ungünstigen Bedingungen in den substituierten Kulturen. Es werden im Vergleich zur Referenz keine höheren Überlebensraten erzielt. Was beiden Experimenten gemein ist, ist die erhöhte Laktatproduktionsrate. Testosteron scheint Einfluss auf den Stoffwechsel zu haben. Die weiterführenden Untersuchungen hätten jedoch das zeitliche Limit dieser Arbeit überschritten. Es kann nur festgestellt werden, dass, sollten die Ergebnisse der Kurzzeit-Experimente zutreffen, bei einer Konzentration von 75 mg/l mehr als die Hälfte aller Zellen im Scherexperiment überlebt. Dabei wäre ein Einbau von Testosteron in die Zellmembran denkbar, welcher die Membran gegenüber Scherstress stabilisieren würde. Auch eine Umwandlung von Testosteron zu Cholesterin ist möglich. Dieses könnte sich wiederum in die Membran einlagern und ebenfalls verstärkend einwirken.

Retinol als drittes und letztes Additiv dieser Gruppe hat mit der toxischen Konzentration von 20 mg/l die geringste gegenüber 150 mg/l bei Testosteron und 50 bis 100 mg/l bei PC. Es wird wie letzteres in Ethanol den Kulturen zugesetzt. Im Kurzzeit-Experiment zeigen sich keine Einflüsse auf die Zellzahlen, jedoch im Langzeit-

Experiment treten diese am zweiten Tag auf. Die Lebendzellzahlen der substituierten Kultur weichen in Abhängigkeit der Höhe der Retinol-Konzentration von der Referenz ab. Die höher substituierte Kultur besitzt eine geringe t-PA-Produktionsrate. Wie beim Testosteron so zeigt sich auch hier der Unterschied zwischen Kurz- und Langzeit-Experiment besonders deutlich in den Überlebensraten. Sind die Zellzahlen vergleichbar, so wird eine höhere Überlebensrate der Referenz gegenüber erzielt, weichen die Lebendzellzahlen ab, so zeigt sich keine Scherreduzierung mehr.

Da über die Reaktionswege von Retinol in der Zellen nur wenig bekannt ist, kann über das Zustandekommen der Schutzfunktion nur spekuliert werden. Eine Einlagerung in die Zellmembran ist einer Membranstabilisierung nicht förderlich, da das Retinol außer dem Sechsring keine starre Struktur besitzt. Da es aber als lokaler Mediator in Zellen fungieren kann, ist eine Beeinflussung der Zusammensetzung der Zellmembran auf diese Weise möglich. Denkbar ist die Aktivierung oder Ausschaltung bestimmter zur Membransynthese benötigter Enzyme. Bei höheren Konzentrationen scheint diese Möglichkeit nicht mehr gegeben zu sein. Es tritt eventuell eine irreversible Zerstörung der mit Retinol gekoppelten Enzyme auf oder durch den Ausfall einer größeren Konzentration an Retinol gekoppelten Enzymen wird der entsprechende Stoffwechselweg blockiert. Diese Blockierung könnte anschließend zu einem gehemmten Zellwachstum und einem Vitalitätsverlust führen.

Die in Gruppe IV zusammengefassten Cyclodextrine zeigen eine konzentrationsabhängige und unterschiedliche hohe scherreduzierende Wirkung (s. Tab. 3.66). Die Wirkung des β -CD scheint größer als die des M-CD zu sein, da die höher konzentrierte Kultur in der Kultivierungsreihe mit M-CD eine doppelt so hohe Überlebensrate besitzt.

Den beiden Kultivierungsreihen gemeinsam ist das nicht vorhandene Wachstum der geringer konzentrierten Kulturen. Aus den Toxizitätstests von β -CD und M-CD ist keine Beeinflussung der Lebendzellzahl und der Vitalität durch die zugesetzten Cyclodextrine erkennbar, auch nicht bei höheren Konzentrationen. So können die Lebendzellzahlen der betroffenen Kulturen nicht durch die zugesetzten Cyclodextrine verringert sein. Die Kultur 75 der Kultivierungsreihe von M-CD hat von Beginn an eine geringere Vitalität die in Kombination mit der relativ hohen Anfangskonzentration des Ammoniums das Zellwachstum hemmt und auch für einen höheren Glukoseverbrauch und eine höhere Laktatproduktion verantwortlich ist. In der Kultivierungsreihe β -CD sind die Anfangsvitalitäten der Kulturen vergleichbar. Die von Kultur 75 ist sogar geringfügig höher als die der anderen beiden Kulturen. Lebendzellzahlen und Vitalität sind bis zur 40. Stunde vergleichbar. Erst danach sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Ein plötzliches Komplexieren von Nährstoffen durch Cyclodextrin kann ausgeschlossen werden. Zum einen sollten diese Komplexierungsvorgänge schon zu Beginn der Kultivierung auftreten, zum anderen müssten sie auch bei Kultur 100 zu erkennen sein. Ein eventueller Abbau des Cyclodextrins durch die Zellen wäre denkbar, dessen Abbauprodukte hemmend auf das Zellwachstum einwir-

ken. Bei einer höheren Konzentration könnten die Abbauprodukte vom Cyclodextrin selbst wieder komplexiert werden und so bei dieser Konzentration eine Hemmung des Zellwachstums verhindern. Dieses Phänomen sollte auch in den Toxizitätstests sichtbar sein, tritt dort aber nicht auf. Der Unterschied der Zellzahlen ist in Kultivierungsreihe β -CD nicht zu erklären.

Der Unterschied zwischen β -CD und M-CD liegt in der Löslichkeit der Substanzen. Die Fähigkeit bestimmte Moleküle zu komplexieren sollte sich bei ihnen nicht unterscheiden. Durch diese Fähigkeit sollte eine höhere Vitalität als die der Referenz in den substituierten Kulturen erreicht werden. Dies ist nicht der Fall. Dadurch ist die angestrebte Erhöhung der Scherempfindlichkeit durch bessere Vitalität nicht gegeben. In der Kultivierungsreihe M-CD wird das besonders deutlich, wo die Überlebensraten der substituierten Kulturen der der Referenz ähnlich sind. Zu klären bleibt damit die gegenüber der Referenz erhöhte Überlebensrate der Kultur 100 in der Kultivierungsreihe β -CD. Ein möglicher Abbau des Moleküls wird ausgeschlossen, da keine Veränderungen im Stoffwechselverhalten festgestellt werden. Denkbar ist eine erhöhte Scherreduzierung aufgrund von in das Scherexperiment verschleppter β -CD-Moleküle. Diese würden dabei ähnlich wie Stoßdämpfer zwischen den einzelnen Zellen wirken und auf diese Weise den Scherstress mindern. Dies würde auch erklären, weshalb in Kultivierungsreihe M-CD keine vergleichbare Überlebensrate festgestellt werden kann.

In dem angenommenen Fall der Scherreduzierung durch β -CD-Moleküle könnten die Cyclodextrine diese die Scherreduzierung nur erzielen, wenn sie unmittelbar im Medium des Scherexperimentes vorhanden sind. Eine Scherreduzierung durch eine Erhöhung der Vitalität ist nicht gegeben. Hierdurch unterscheiden sie sich von den anderen getesteten Additiven, die die Scherreduzierung indirekt herbeiführen, indem sie z.B. auf die Zellmembran einwirken.

Anhand der ermittelten Daten zeigen sich nur einige Additive als wirkungsvolle Hilfsmittel zur Scherreduzierung. Zu diesen zählen in Kurzzeit- als auch Langzeit-Experimenten das verwendete Cholesterin und Cholsäure. Im Kurzzeit-Experiment erweist sich nur Retinol als wirksam. Testosteron könnte ebenfalls ein wirksames Additiv sein, aber ohne Referenz fällt die Bewertung schwer. Ebenso könnte Deoxycholsäure auch ein wirkungsvolles Additiv in Langzeit-Experimenten sein, was aus Zeitgründen nicht getestet wird.

3.2.2 Temperaturexperimente

Mit den Additiven Cholesterin, Cholsäure und Retinol werden Temperaturversuche durchgeführt. Dabei werden am zweiten Kultivierungstag, nach der Zellentnahme für die Scherexperimente, die Zellkulturen nicht mehr bei einer Temperatur von 37 °C sondern bis zum Experimentende bei 31 °C kultiviert. Alle Scherexperimente werden bei 31 °C durchgeführt. Es werden dabei die gleichen Konzentrationen wie in den schon erfolgten Kurz- und Langzeit-Experimenten eingesetzt.

Es wird ein Temperaturversuch mit **Cholesterin** durchgeführt. Die Konzentrationen betragen 100 und 125 mg/l. Die ermittelten Cholesterin-Konzentrationen in den Kulturen betragen 5 mg/l in der Referenz, 84 mg/l in Kultur 100 und 104 mg/l in Kultur 125. Aufgrund von Bakterieninfektionen sind die Kulturen aus verschiedenen Vorkulturen angeimpft.

Die Lebendzellzahlen der Kulturen entwickeln sich bis zur 42. Stunde analog (vgl. Abb. 3.79). Es erfolgt ein Anstieg um 7 bzw. $11 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in Kultur 125 bzw. 100. Die Zellen der Referenz durchlaufen in diesem Zeitraum eine Lag-Phase und erreichen zur 42. Stunde ebenfalls $34 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter, die selbe Zellzahl wie Kultur 125. Nach der 42. Stunde erfolgt die Temperaturänderung, wodurch die Zunahme der Lebendzellzahl sich in den Kulturen unterscheidet. In Kultur 125 setzt das exponentielle Wachstum sofort ein. Es wird zum Kultivierungsende ein Lebendzellzahlmaximum von $67 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter erreicht. Das Wachstum ist bei der Referenz geringer. Ein Maximum von $60 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter wird hier erreicht. Hingegen tritt nur ein geringer Anstieg der Lebendzellzahlen auf. Die unterschiedlichen Entwicklungen können auf die verschiedenen Vorkulturen zurückgeführt werden. Obwohl sich in den ersten Kultivierungsstunden keine Unterschiede zeigen, ist dennoch eine Differenzierung anhand eines äußeren Einflusses möglich, wie hier

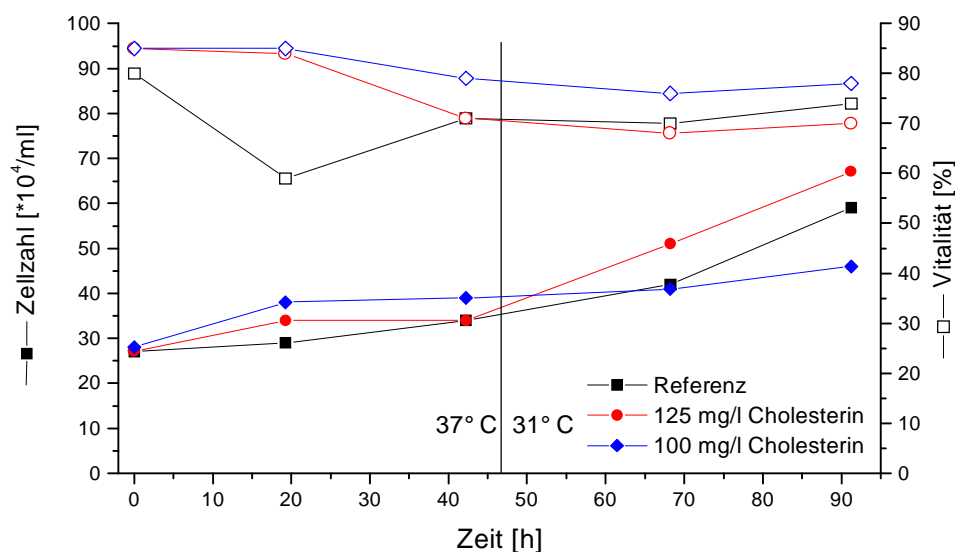


Abb. 3.79 Lebendzellzahl und Vitalität von CT01

Zeit [h]	0	19	42	68	91
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	2,2	1,7	0,2	0,2
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 125	--	1,7	1,7	0,2	0,2
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	1,5	0,8	0,3	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	2,6	1,2	-0,1	0,0
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 125	--	1,9	1,4	-0,1	-0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 100	--	1,6	0,8	0,2	0,1

Tab. 3.68 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von CT01

z.B. die Temperaturänderung. Die Entwicklung der Kultur 125 und der Referenz ist vergleichbar. Die Abweichung von Kultur 100 beruht auf einer anderen Vorkultur. Ein toxischer Einfluss von Cholesterin kann aufgrund der schon durchgeführten Experimente ausgeschlossen werden.

Die Wachstumsraten der Cholesterin-Kulturen nehmen im Gegensatz zur Referenz bis zum Temperaturshift ab (vgl. Tab. 3.69). Nach der Änderung bis zur 42. Stunde steigt die Wachstumsrate der Kultur 100 um $0,04 \text{ d}^{-1}$ bis zum Kultivierungsende. Hingegen steigt die Rate der Kultur 125 nach dem Temperaturshift auf $0,16 \text{ d}^{-1}$ an und hält sich auf einem relativ konstanten Niveau bis zum Ende. Die Wachstumsrate der Referenz zeigt einen vergleichbaren Verlauf wie in Kultur 100. Sie steigt nach dem Temperaturshift zum Kultivierungsende an. Die Temperaturänderung scheint somit auf alle Kulturen die gleiche Auswirkung zu haben, nämlich dass die Wachstumsrate ansteigt. Ob die Änderung allerdings der Auslöser für diesen Anstieg ist, ist fraglich. Nach einer Phase des geringen Zellwachstums folgt in einer Zellkultivierung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ immer eine Phase des höheren Zellwachstums. Nun kann es sein, dass diese Phase des exponentiellen Wachstums durch den Temperaturshift verringert wird. Das Wachstum wäre dann bei der weiteren Kultivierung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ höher ausgefallen, weil auch die Geschwindigkeit von Stoffwechselfvorgängen durch eine geringere Temperatur verringert wird. Ein höheres Wachstum bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ist jedoch unwahrscheinlich, werden die Wachstumsraten mit denen aus der Kultivierungsreihe LC bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ verglichen (s. Tab. 3.11). Im Vergleich zu diesen sind die Wachstumsraten dieser Kultivierungsreihe hoch und zeigen keine Verringerung durch die geringere Kultivierungstemperatur.

Eine vergleichbare Vitalität ist in den Kulturen sichtbar (vgl. Abb. 3.79). Die Vitalität der Kulturen sinkt bis zur Temperaturänderung um 6 bis 14 %. Nach dem Temperaturshift wird dieser relativ schnelle und hohe Vitalitätsverlust gebremst. Die Vitalität nimmt in den nächsten 24 Stunden nur noch um maximal 3 % ab, was als im Rahmen eines Messfehlers als relativ konstant anzusehen ist. Die Vitalität der einzelnen Kulturen bleibt bis zum Kultivierungsende konstant. Die konstante Vitalität ist auf die Temperaturänderung zurückzuführen. Es wird angenommen, dass die für Zellen toxischen Metabolite, wie z.B. Ammonium, in geringeren Mengen produziert werden und so die Zellen weniger schädigen können.

Zeit [h]	0	19	42	68	91
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	62	22	10	4
Referenz	--	86	26	5	3
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	93	35	3	0
Kultur 125	--	93	35	3	0
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	93	35	3	0
Kultur 100	--	93	35	3	0
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	2244	2484	1391	542
Referenz	--	2244	2484	1391	542
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	2347	2861	878	1430
Kultur 125	--	2347	2861	878	1430
t-PA-Produktionsrate [$\text{ng}/\text{d} \cdot 1 \text{ Mio. Ze}$]	--	1406	861	418	843
Kultur 100	--	1406	861	418	843
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,04	0,07	0,08	0,15
Referenz	--	0,04	0,07	0,08	0,15
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,12	0,00	0,16	0,12
Kultur 125	--	0,12	0,00	0,16	0,12
Wachstumsrate [d^{-1}]	--	0,17	0,01	0,02	0,05
Kultur 100	--	0,17	0,01	0,02	0,05

Tab. 3.69 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von CT01

Die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten sind in allen drei Kulturen vor dem Temperaturshift um ein Vielfaches größer als im Anschluss daran (vgl. Tab. 3.68). Dabei sind die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten der Referenz und Kultur 125 bis auf die Raten der 19. Stunde identisch. Die Laktatproduktionsraten der Kultur 100 ist wie ihre Glukoseverbrauchsrate vor dem Shift geringer bzw. im Anschluss höher als die von Kultur 125 und der Referenz. Die Abnahme der Verbrauchs- und Produktionsraten ist ebenfalls auf die Temperaturänderung zurückzuführen. Die Stoffwechselfvorgänge in den Zellen verlangsamen sich wegen der geringeren Temperatur. Es wird vermutet, dass die Zellen aus diesem Grund die angebotenen Energiequellen besser ausnutzen können, was im Zellwachstum deutlich wird.

Die Ammoniumkonzentration steigt äquivalent bis zum Temperaturshift in allen drei Kulturen auf 71 bis 77 mg/l an. Nach der Änderung der Temperatur bleibt die Konzentration des Ammoniums in den Kulturen relativ konstant. Die Ammoniumproduktionsraten sind wie die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten vor dem Temperaturshift um bis zu 30mal höher als nach der Temperaturänderung (vgl. Tab. 3.69). Die Raten nehmen von der 19. zur 91. Stunde ab. Auch hier wird der Stoffwechselweg durch eine geringere Temperatur beeinflusst, d.h. verlangsamt. Es bestätigt sich hier die Annahme, dass die gleichbleibende Vitalität auf die verminderte, toxische Metabolitproduktion zurückzuführen ist.

Die Proteinkonzentrationen der Kulturen sind nicht aufgeführt, da die Konzentration nur in der Referenz eindeutig bestimmt werden kann (s. Kap. 3.2.1.1). Die Proteinkonzentration der Referenz wird vom Temperaturshift nicht beeinflusst und steigt im Beobachtungszeitraum von 18 auf 43 mg/l an.

Wird die t-PA-Konzentration betrachtet (vgl. Abb. 3.80), so fallen die bis zur 68. Stunde nur um 1 bis 11 % abweichenden Konzentrationen von Referenz und Kultur 125 auf. Die Konzentration der Kultur 100 ist weitaus geringer und beträgt am Ende des Experiments mit 1127 $\mu\text{g}/\text{l}$ nur 50 % der Endkonzentration der Referenz. Eine Beeinflussung der t-PA-Konzentration durch die Temperaturänderung ist nicht

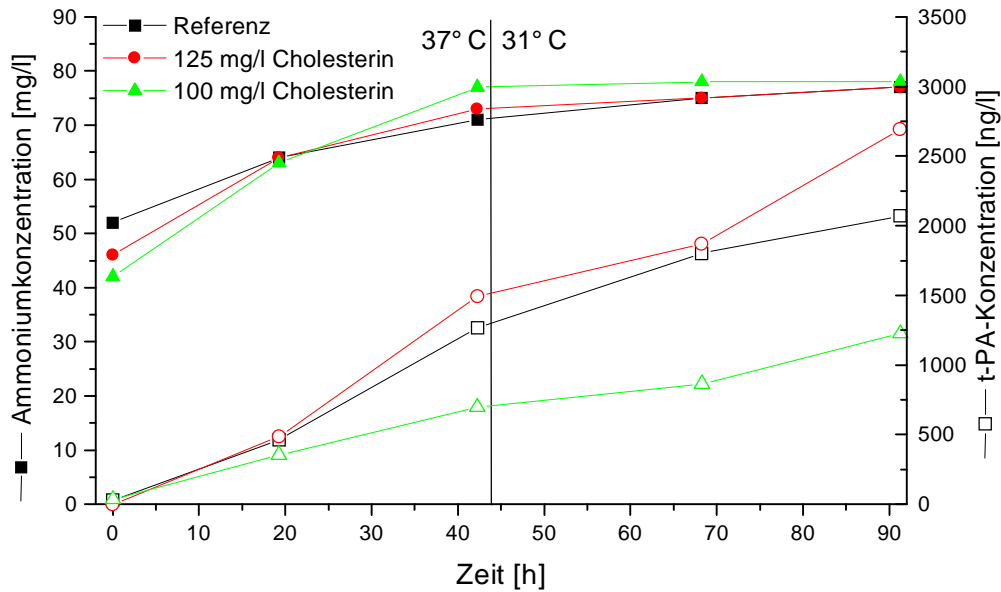


Abb. 3.80 Ammonium- und t-PA-Konzentration von CT01

zu erkennen. Hingegen ist eine Auswirkung des Temperaturshifts bei der t-PA-Produktionsrate ersichtlich. Die Produktionsraten vor der Temperaturänderung bis zur 42. Stunde sind höher als die nach der Änderung. Dies spricht wieder für eine Verlangsamung der Stoffwechselfvorgänge in den Kulturen. Die Abweichung von Kultur 100 lässt sich durch die Verwendung einer anderen Vorkultur erklären, die auf Veränderungen abweichend reagiert.

Nach der Absenkung der Temperatur nach der 42. Stunde sind die Änderungen in den Aminosäure-Konzentrationen geringer (Daten s. Anhang). Zum Beispiel ist die Abnahme bei Asparaginsäure nicht wie in den 37 °C-Kultivierungsreihen nach der 60. Stunde höher als zu Beginn (s. Kultivierungsreihen C01, CV, LC), sondern gleichbleibend. Ebenso nimmt die Konzentration des Asparagins bei 31 °C geringer ab. Bei Glycin ist auch nur ein geringfügiger Anstieg nach der Temperaturänderung zu verzeichnen und die Alaninkonzentration bleibt relativ konstant. Bei allen drei Kulturen wirkt sich die Absenkung der Temperatur auf den Stoffwechsel aus. Er wird verlangsamt. Abgesehen davon, ergeben sich durch die unterschiedlichen Zellzahlen verschiedene Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren in den Kulturen. So ist das Glutamin z.B. in der Kultur 100 erst 24 Stunden später vollkommen aufgebraucht als in der Referenz und in Kultur 125.

Durch die Temperaturänderung nach der 42. Stunde treten ähnliche Veränderungen des Zellwachstums in den Kulturen auf. Kultur 100 bildet eine Ausnahme. Aufgrund der abweichenden Zellzahlen sind hier z.B. höhere Aminosäure-Konzentrationen bedingt. Die Produktions- und Verbrauchsrate werden bei allen Kulturen durch die Temperaturänderung beeinflusst. Sie sind nach Absenkung der Temperatur geringer.

	CT01 A	CT01 B	CT01 C	CT01 D
	31°C Scher- und 37°C Kultivierungstemperatur		31°C Scher- und 31°C Kultivierungstemperatur	
R_s [%] Referenz	24	29	30	18
R_s [%] Kultur 125	33	25	13	12
R_s [%] Kultur 100	25	33	27	27
τ [N/m²] Referenz	2,0	2,0	1,9	2,1
τ [N/m²] Kultur 125	2,0	2,0	2,3	2,1
τ [N/m²] Kultur 100	2,2	1,9	2,0	2,4

Tab. 3.70 Überlebensrate und Schubspannung von CT01

Es werden vier Kurzzeit-Scherexperimente für jede Kultur durchgeführt. Zwei Experimente finden vor dem Temperaturshift, zwei danach statt. In Tab. 3.70 sind die Überlebensraten und Schubspannungen der Kulturen vor und nach dem Temperaturshift zusammengefasst. Die Überlebensraten im ersten Abschnitt sind äquivalent. Die identischen Überlebensraten des ersten Abschnitts werden durch die vergleichbaren Schubspannungen bestätigt. Es zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen den Ergebnissen für 31 und 37 °C Kultivierungstemperatur. Eine Ausnahme bildet Kultur 125. Hier sind die Überlebensraten im zweiten Experimentabschnitt mit 12 und 13 % deutlich geringer. Dies kann auf das verstärkte Wachstum in dieser Kultur zurückzuführen sein. Erhöht sich die Zellzahl in einer Kultur sehr stark, wird viel Energie in die Zellteilung transferiert und der Zellschutz sowie die Reparatur von beschädigten Zellen rückt in den Hintergrund. So kann es sein, dass in dieser Kultur trotz geringerer Kultivierungstemperatur eine verminderte Überlebensrate festgestellt wird. Ähnliches wird für die Referenz bei CT01 D vermutet.

Im zweiten Abschnitt sind die Schubspannungen der Kulturen untereinander nur bedingt vergleichbar. So fallen erhöhte Werte bei Kultur 125 (CT01 C) und Kultur 100 (CT01 D) auf. Auf die Überlebensrate hat die Absenkung der Kultivierungstemperatur keinen Einfluss. Es zeigt sich keine Erhöhung durch eine verbesserte Stabilisierung der Zellmembran. Die Absenkung der Schertemperatur führt zu konstanteren Überlebensraten im Vergleich zu den schon durchgeführten Cholesterin-Experimenten, jedoch zeigt sich auch hier die erwartete Erhöhung der Überlebensrate nicht.

Änderung der/des	Referenz		Kultur 125		Kultur 100	
	31/37	31/31	31/37	31/31	31/37	31/31
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	-2	-3	1	0	-5	-5
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-21	-34	-18	-27	-8	-14
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-23	-37	-17	-27	-13	-18
... Vitalität [%]	-35	-27	-31	-47	-5	-11
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	2	3	-4	2	10	8
... Proteinkonzentration [mg/l]	20	17	13	6	3	7
... relativen LDH-Wertes [U/l]	179	189	87	55	46	79

Tab. 3.71 gemittelte Analysenwerte von CT01

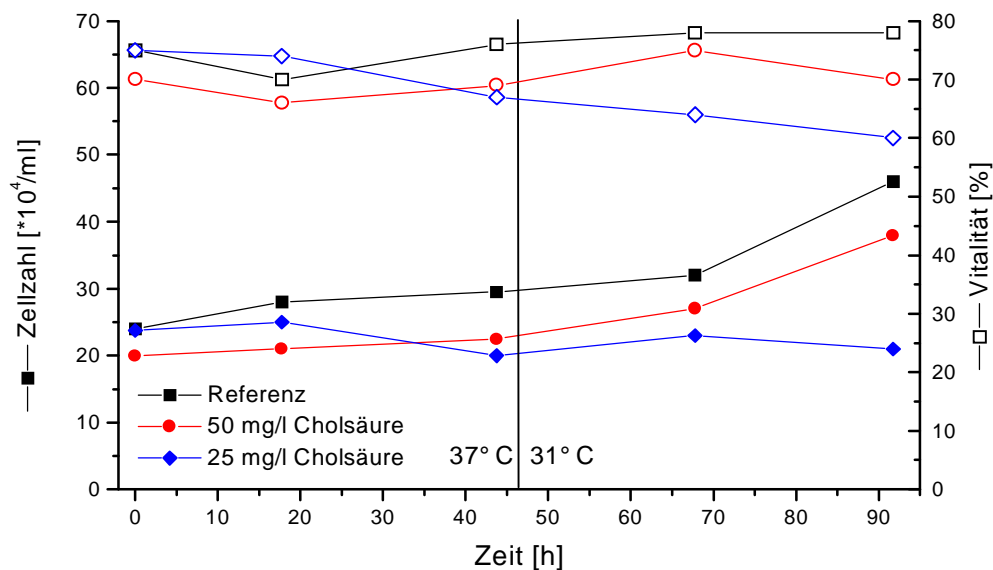
In Tab. 3.71 sind die gemittelten Analysenwerte getrennt nach Temperaturen aufgeführt. Dabei zeigt sich im zweiten Abschnitt eine höhere Lebend- und Gesamtzellzahlabnahme in allen Kulturen. In den Cholesterin-Kulturen tritt zusätzlich ein höherer Vitalitätsverlust auf als im ersten Abschnitt. Dieser Vitalitätsverlust begründet sich in der Absenkung der Kultivierungstemperatur. Es tritt entgegen der obigen Vermutung wahrscheinlich doch eine Versteifung der Membran in den Cholesterin-Kulturen auf. Durch diese Versteifung wird im Scherexperiment jedoch keine erhöhte Überlebensrate erzielt, sondern bedeutet im Gegensatz zur Referenz eine geringere Überlebensrate. Die geringere Rate wird dadurch bedingt, dass die Membran zu steif und zu inflexibel ist, um sich im Scherspalt wie die Zellen der Referenz deformieren zu lassen. So sterben mehr Zellen als in der Referenz und es tritt ein höherer Vitalitätsverlust auf.

Die Änderung der Ammonium- und der Proteinkonzentration wird durch die Änderung der Kultivierungstemperatur nicht beeinflusst. Eine geringe Änderung ist beim relativen LDH-Wert in den Cholesterin-Kulturen zu verzeichnen, die sich mit einem unterschiedlichen LDH-Gehalt in den Zellen begründen lässt. Aufgrund des geringeren Wachstums von Kultur 100 in der Kultivierung könnte bei gleichbleibender Produktion ein höherer LDH-Gehalt als in den schnell wachsenden Zellen der Kultur 125 möglich sein.

Werden die erhaltenen Ergebnisse mit denen von Kultivierungsreihe C07 und CV01 verglichen, so ist eine Abnahme der Überlebensraten der Cholesterin-Kulturen von über 10 % zu verzeichnen (s. Tab. 3.3 u. 3.7). Gleichzeitig ist die Reproduzierbarkeit der Überlebensraten bei niedrigeren Temperaturen größer als bei höheren Temperaturen. Zwischen den Ergebnissen der beiden Abschnitte bestehen keine gravierenden Unterschiede, sieht man von Kultur 125 ab, deren Verhalten auf das schnelle Zellwachstum zurückgeführt wird. Es kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Kultivierungstemperaturen unerheblich für den Ausgang des Scherexperiments sind.

Das zweite Additiv, **Cholsäure**, wird im Temperaturexperiment in Konzentrationen von 25 und 50 mg/l eingesetzt. Die Lebendzellzahlen der Referenz und der Kultur 50 steigen bis zum Temperaturshift in der 44. Stunde gering an (vgl. Abb. 3.81). Nach der Temperaturänderung ist der Anstieg innerhalb der nächsten 24 Stunden mit 2 bis $4 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter ebenfalls gering. Nach der 68. Stunde beginnt in beiden Kulturen die exponentielle Wachstumsphase. Gegenüber diesem Verhalten nehmen die Lebendzellzahlen der Kultur 25 bis zum Temperaturshift ab. Danach bleiben die Zellzahlen der Kultur 25 relativ konstant. Der Effekt, dass die Abnahme der Zellzahlen verlangsamt bzw. gestoppt wird, kann auf die Verringerung der Kultivierungstemperatur zurückzuführen sein. Vermutlich sind geringere toxische Metabolitkonzentrationen dafür verantwortlich. Da die Vitalität dieser Kultur auch nach der Temperaturänderung weiter sinkt (vgl. Abb. 81), kann im besten Fall von einer Verzögerung der Zellzahlabnahme gesprochen werden. Die Vitalität der Referenz sowie der Kultur 50 steigt nach der Absenkung der Temperatur weiter an und bleibt relativ konstant.

Die Wachstumsraten der Kultur 50 und der Referenz steigen im Verlauf des Experiments an, abgesehen vom anfänglichen Abfall von der 18. auf die 44. Stunde bei der Referenz. Dagegen fällt die Wachstumsrate der Kultur 25 bis sie durch die Temperaturänderung einen vorübergehenden Anstieg erfährt. Zum Ende der Kultivierung fällt die Wachstumsrate der Kultur 25 wiederum ab. Zu klären bleibt das abweichende Verhalten der Kultur 25. Schon in den Kurz- und Langzeit-Experimenten fällt diese Kultur durch geringere Lebendzellzahlen auf. Ein Einfluss der Cholsäure scheint daher wahrscheinlich. Denkbar wäre bei geringer Cholsäure-Konzentration eine die Zellteilung hemmende Funktion, die bei einer höheren Konzentration durch eine aktivierende kompensiert wird. Genauso gut könnten die beobachteten geringen Zellzahlen auf statistischen Faktoren beruhen, wie z.B. einer Schädigung der Zellen beim Animpfen.



Tab. 3.81 Lebendzellzahl und Vitalität von CHT01

Zeit [h]	0	18	44	68	92
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	0,8	0,9	0,3	0,4
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,4	0,5	0,6	0,4
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,9	0,8	1,0	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,5	1,1	0,3	0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,6	1,4	0,1	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,5	1,4	0,5	0,1

Tab. 3.72 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von CHT01

Die Glukoseverbrauchsraten der substituierten Kulturen 25 und 50 ähneln sich in ihrem Verlauf (vgl. Tab. 3.72). Sie nehmen während der Kultivierung bei 37 °C im ersten Abschnitt um 1,1 mg/d*1 Mio. Ze ab. Nach dem Temperaturshift erfolgt ein geringfügiger Anstieg. Das bedeutet, die Zellen benötigen in der Phase nach der Temperaturumstellung mehr Glukose als vorher. Der erhöhte Glukoseverbrauch wird von der 68. zur 92. Stunde wieder reduziert. Die Verbrauchsrate nimmt ab und der Verbrauch normalisiert sich. Die Verbrauchsrate der Kultur 50 ist bis zur 68. Stunde niedriger als die der Kultur 25. Durch die Erhöhung der Glukoseverbrauchsrate nach der Temperaturänderung scheint diese Änderung Stress auf die Zellen in den substituierten Kulturen auszuüben. Die Glukoseverbrauchsrate der Referenz folgt einer anderen Tendenz. Bis zum Temperaturshift bleibt die Rate der Referenz relativ konstant. Nach der Temperaturänderung sinkt die Glukoseverbrauchsrate der Referenz um 0,6 mg/d*1 Mio. Ze. Die Zellen verbrauchen in dieser Phase im Gegensatz zu den Cholsäure-Kulturen weniger Glukose. Die Verbrauchsrate bleibt nach der Temperaturänderung konstant und besitzt einen den substituierten Kulturen vergleichbaren Endwert.

Die Laktatproduktionsraten dieses Experimentes verhalten sich analog zu denen der Kultivierungsreihe CT01 (vgl. Tab. 3.72). Auch hier sind die Raten vor der Änderung

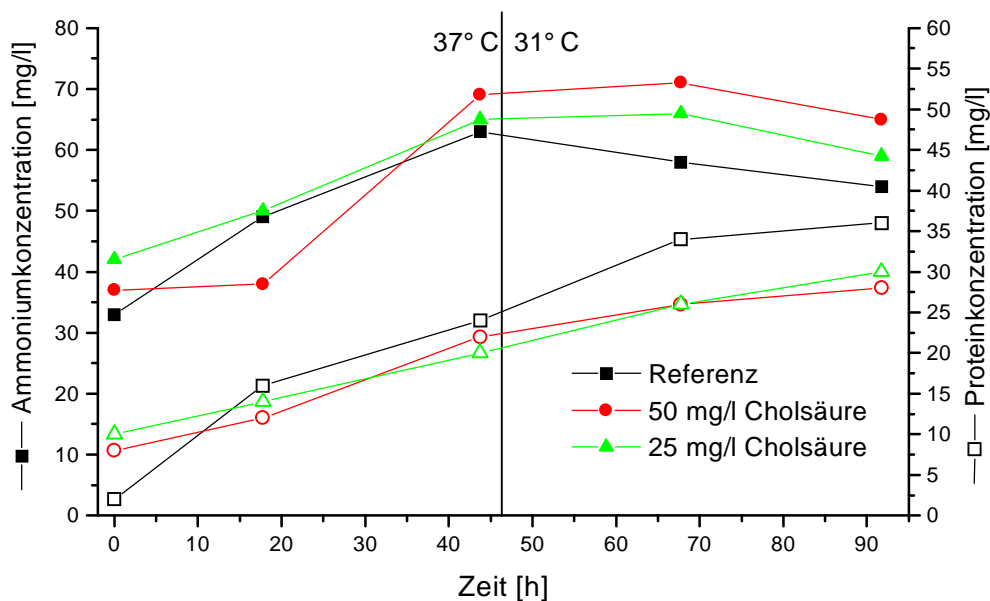


Abb. 3.82 Ammonium- und Proteinkonzentration von CHT01

Zeit [h]	0	18	44	68	92
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1410	1024	674	725
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1500	1000	678	672
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	837	730	472	770
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	83	45	0	0
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	7	132	8	0
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	44	62	5	0
Wachstumsrate [d⁻¹] Referenz	--	0,09	0,02	0,04	0,16
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 50	--	0,03	0,03	0,08	0,15
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 25	--	0,03	-0,09	0,06	-0,04

Tab. 3.73 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von CHT01 der Temperatur um ein Vielfaches höher als danach. Sie sinken in allen drei Kulturen bis zur 68. Stunde um 1,0 bis 1,5 mg/d*1 Mio. Ze ab. Der Endwert ist in den Kulturen vergleichbar. Im Gegensatz zur Kurzzeit-Kultivierung bei 37 °C ist die Abnahme der Laktatproduktions- und der Glukoseverbrauchsrate höher, was vermutlich durch die Absenkung der Temperatur bedingt ist.

Die Konzentration des Ammoniums steigt in allen drei Kulturen bis zur 44. Stunde um 23 bis 32 mg/l an (vgl. Abb. 3.82). Dieser Anstieg der Konzentration wird durch die Temperaturänderung verlangsamt. Die Ammoniumkonzentration sinkt bis zum Kultivierungsende um 4 bis 9 mg/l. Die ermittelte Abnahme ist entweder durch ein Ausgasen des Ammoniums als Ammoniak bedingt oder beruht auf einem Messfehler. Die höchste Konzentration nach dem Temperaturshift weist Kultur 50 auf, die niedrigste die Referenz. Die Ammoniumproduktionsraten der Kulturen 25 und 50 nehmen bis zur Temperaturänderung zu (vgl. Tab. 3.73). Dies deutet im Gegensatz zu den abnehmenden Raten in der Referenz auf eine Belastung der Zellen hin. Nach dem Temperaturshift sinken die Raten in allen Kulturen. Dabei sinken die Raten in der Referenz am schnellsten. Die Abnahme der Ammoniumproduktionsrate ist auf die Absenkung der Kultivierungstemperatur zurückzuführen. Die Stoffwechselfvorgänge werden verlangsamt. Dies wird im Vergleich zur Kurzzeit-Kultivierung CH04 deutlich (s. Tab. 3.19), wo die Raten nach ca. 60 Stunde nicht unbedingt geringer sein müssen. Die Proteinkonzentration wird durch die Temperaturänderung nicht beeinflusst (vgl. Abb. 3.82). Sie steigt in den Cholsäure-Kulturen vergleichbar um 20 mg/l bis zum Ende des Experiments an. Die Konzentration des Proteins nimmt in der Referenz um 34 mg/l während der Versuchsdauer zu. Sie ist am Kultivierungsende somit höher als die der substituierten Kulturen. Auch in der Kurzzeit-Kultivierung bei 37 °C ist die Proteinkonzentration der Referenz höher als die der substituierten Kulturen. Dies deutet auf einen Einfluss durch den Cholsäure-Zusatz hin. Eventuell hängt die geringere Proteinkonzentration mit der vermuteten Hemmung durch Cholsäure bei der Zellteilung zusammen.

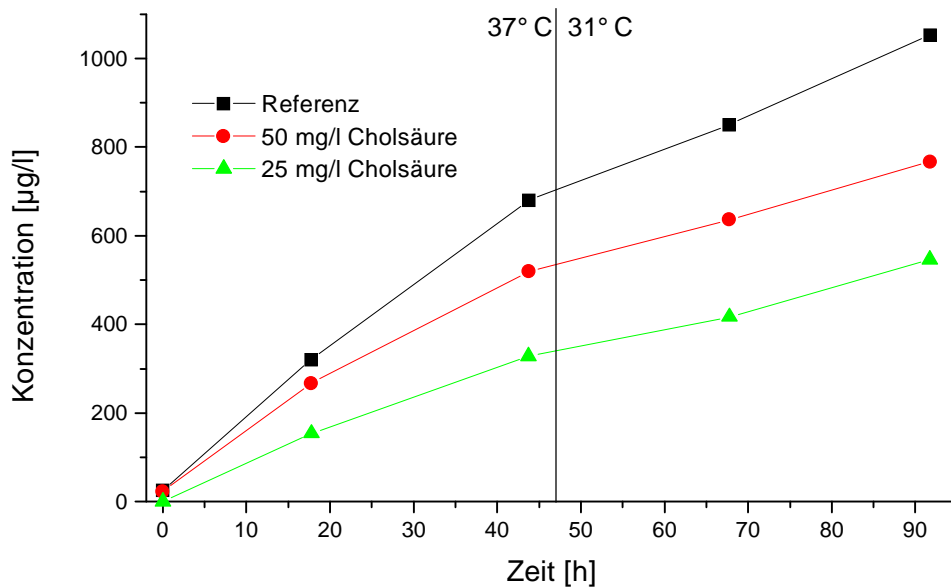


Abb. 3.83 t-PA-Konzentration von CHT01

Die t-PA-Konzentrationen der Kulturen steigen bis zur Temperaturänderung deutlich an (vgl. Abb. 3.83). Dabei ist die höchste Zunahme der t-PA-Konzentration in der Referenz mit 680 µg/l zu verzeichnen. Um 520 µg/l nimmt die Konzentration in Kultur 50 und um 330 µg/l in Kultur 25 zu. Der Anstieg der Konzentrationen bis zum Kultivierungsende ist demgegenüber geringer. Er beträgt in der Referenz 370 µg/l, in Kultur 50 250 µg/l und in Kultur 25 beträgt er 220 µg/l. Die Referenz besitzt am Ende der Kultivierung die höchste Konzentration an t-PA, die Kultur 25 die niedrigste. Die t-PA-Konzentration wird durch den Temperaturshift nicht beeinträchtigt.

Die Produktionsraten der Referenz und von Kultur 50 sind äquivalent (vgl. Tab. 3.73). Sie nehmen im Versuchsverlauf ab. Der Temperaturshift hat ebenfalls keine unmittelbare Einwirkung auf deren t-PA-Produktionsrate. Die Temperaturänderung ist aber wahrscheinlich für die konstante Produktionsrate der beiden Kulturen nach dem Temperaturshift verantwortlich. Die Produktionsrate der Kultur 25 ist um 400 bis 500 ng/d*1 Mio. Ze geringer als die der Referenz und von Kultur 50. Sie sinkt bis zur 68. Stunde der Kultivierung. Im letzten Abschnitt steigt sie im Gegensatz zu der Rate von Referenz und Kultur 50 an. Dieses kann ebenso auf den Temperaturshift zurückgeführt werden wie die Raten von Referenz und Kultur 50 in diesem Abschnitt.

In den Kulturen sind keine relevanten Unterschiede in den Aminosäurekonzentrationen zu verzeichnen (Daten s. Anhang). Die Endkonzentration des Glutamins ist in den Cholsäure-Kulturen wegen der geringeren Zellzahlen um 9 bis 11 mg/l höher als in der Referenz. Die Konzentrationen der Cholsäure-Kulturen sollten sich wegen der unterschiedlichen Lebendzellzahlen deutlicher voneinander unterscheiden. Das dieses nicht der Fall ist, mag auf dem höheren Verbrauch in Kultur 25 beruhen und würde bedeuten, dass eine gestresste Zellkultur vorliegt.

Aufgrund des Temperaturshifts sind geringere Konzentrationsänderungen, z.B. bei Glutaminsäure und Glycin, ab der 68. Stunde in allen drei Kulturen vorhanden.

Die Kultur 25 unterscheidet sich von den anderen beiden Kulturen in ihrem Wachstumsverhalten und in der Lebendzellzahl. Die Ursache dafür kann in einer Hemmung eines Vorgangs bei der Zellteilung durch Cholsäure liegen. Die Kulturen dieser Kultivierungsreihe unterscheiden sich nicht in Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate, sowie in der Ammoniumproduktionsrate. Unterschiede treten im Gegensatz zur Kurzzeit-Kultivierung bei 37 °C bei der t-PA-Konzentration, jedoch nicht bei der t-PA-Produktionsrate auf (Kultur 25 ausgenommen). Werden die abweichenden Faktoren bei der Betrachtung der Ergebnisse des Scherexperiments beachtet sind die Kulturen vergleichbar.

Es werden je Kultur vier **Kurzzeit-Scherexperimente** durchgeführt, zwei mit einer Kultivierungstemperatur von 37 °C und einer Schertemperatur von 31 °C und zwei bei Temperaturen von 31 °C in der Kultivierung und 31 °C im Scherexperiment. Die Überlebensraten und Schubspannungen der Kulturen sind in Tab. 3.74 aufgeführt. Die Raten der Referenz sind geringer gegenüber denen der Kultur 50. Kultur 50 besitzt nicht nur die höchsten Raten. Vielmehr sind sie, über die vier Experimente betrachtet, auch die konstantesten. Die Überlebensraten der Kultur 25 sind teilweise höher und teilweise geringer als die der Kultur 50 und der Referenz. Dies ist insofern interessant, als das aufgrund der in der Kultivierung ermittelten Daten der Kultur 25 durchgängig ungünstigere Ergebnisse zu erwarten gewesen wären, da sie z.B. eine höhere Vitalitätsabnahme und geringere Zellzahlen aufweist. Die Cholsäure-Zugabe scheint diesen Nachteil kompensieren zu können. Die erhöhten Überlebensraten der Kultur 25 treten immer zu den Zeitpunkten auf, zu denen die Lebendzellzahl wieder gering angestiegen ist. Eine erhöhte Resistenz gegen den Scherstress aufgrund einer verringerten Kultivierungstemperatur ist aus den vorliegenden Daten nicht ersichtlich.

Die Schubspannungen der einzelnen Kulturen sind in der zweiten Hälfte des Experiments zu denen der ersten Hälfte äquivalent und unterscheiden sich maximal um 0,1 N/m².

	CHT01 A	CHT01 B	CHT01 C	CHT01 D
	31°C Scher- und 37°C Kultivierungstemperatur		31°C Scher- und 31°C Kultivierungstemperatur	
R_s [%] Referenz	13	10	11	15
R_s [%] Kultur 50	54	48	42	76
R_s [%] Kultur 25	60	2	73	5
τ [N/m²] Referenz	1,8	2,0	1,9	2,0
τ [N/m²] Kultur 50	2,0	2,1	2,1	2,0
τ [N/m²] Kultur 25	1,9	1,9	1,8	2,0

Tab. 3.74 Überlebensraten und Schubspannungen von CHT01

Änderung der/des	Referenz		Kultur 50		Kultur 25	
	31/37	31/31	31/37	31/31	31/37	31/31
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	0	0	-3	-2	3	1
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-18	-26	-11	-10	-14	-18
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-18	-26	-14	-12	-6	-17
... Vitalität [%]	-50	-47	-7	-12	-39	-29
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	10	13	7	-5	-5	-7
... Proteinkonzentration [mg/l]	8	8	8	15	7	8
... relativen LDH-Wertes [U/l]	58	53	30	103	30	64

Tab. 3.75 gemittelte Analysenwerte von CHT01

Die Änderungen der Lebendzellzahl ist bei der Referenz mit der Änderung der Gesamtzellzahl in beiden Versuchsabschnitten identisch (vgl. Tab. 3.75). Beide sind im ersten und zweiten Versuchsabschnitt höher als bei den substituierten Kulturen. Dies drückt sich auch in den Überlebensraten aus. Auch die Änderungen der Vitalität, der Protein- sowie Ammoniumkonzentration und des relativen LDH-Wertes sind in den beiden Abschnitten bei der Referenz äquivalent. Wobei die Änderungen der Vitalität und der Ammoniumkonzentration ebenfalls höher als die der substituierten Kulturen sind. Die Änderung der Proteinkonzentration ist der der substituierten Kulturen vergleichbar. Die Änderung des relativen LDH-Wertes ist im Vergleich zu den Scherexperimenten der substituierten Kulturen mit der Kultivierungstemperatur von 37 °C höher, im Vergleich zu denen mit der Kultivierungstemperatur von 31 °C aber geringer. Die Kultivierungstemperatur hat demnach bei den substituierten Kulturen einen Einfluss auf die Änderung des relativen LDH-Wertes. Aus den ermittelten Daten geht für die Referenz hervor, dass die Senkung der Kultivierungstemperatur von 37 °C auf 31 °C keinen Einfluss auf die Überlebensrate bzw. auf die Änderung der untersuchten Parameter hat.

Werden die beiden Abschnitte in den substituierten Kulturen verglichen, so fallen die bis auf einige Ausnahmen vergleichbaren Werte auf. Bei Kultur 50 überwiegen die vergleichbaren Werte. Diese beruhen alle auf den Zellzahlen und bestimmen damit auch die Überlebensrate, welche somit ebenfalls vergleichbar ist (s. Tab. 3.75). In dieser Hinsicht hat die Temperaturänderung keinen Einfluss auf die Scherexperimente. Ein Einfluss zeigt sich aber in den Änderungen der ermittelten Parameter. Bei der Kultivierungstemperatur von 31 °C zeigt sich eine geringere Änderung der Ammoniumkonzentration und eine höhere Änderung der Proteinkonzentration sowie des relativen LDH-Wertes. Die auch im Vergleich zur Referenz höhere Änderung des relativen LDH-Wertes kann aufgrund einer Versteifung der Zellmembran und der daraus resultierenden geringeren Flexibilität der Zellen bedingt sein. Bei einer verminderten Flexibilität ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die Zellmembran beschädigt wird. Durch diese Beschädigungen können die LDH-Moleküle aus der Zelle in das Medium gelangen. Ist die Beschädigung gering, kann sie repariert werden, so dass eine Erhöhung der Totzellzahl nicht unbedingt die Folge sein muss. Jedoch kann auch eine Er-

höhung des LDH-Gehaltes in den Zellen die Ursache für die erhöhte Änderung sein. Für Kultur 25 gilt in Bezug auf die Änderung des relativen LDH-Wertes die gleiche Annahme.

Die erhöhten Änderungen der Zellzahlen von Kultur 25 im zweiten Abschnitt sind vermutlich durch die abnehmende Vitalität der Kultur während der Kultivierung bedingt. Im Vergleich zur Referenz sind diese Änderungen jedoch immer noch geringer. Die im Gegensatz zur Erhöhung der Zellzahländerungen abnehmende Änderung der Vitalität spricht für eine verbesserte Wirkung der Cholsäure bei geringerer Kultivierungstemperatur. Dagegen spricht die Erhöhung des relativen LDH-Wertes. Die Änderung der Ammonium- und der Proteinkonzentration zeigt bei Kultur 25 keine Veränderung durch den Temperaturshift während der Kultivierung.

Die Cholsäure-Kulturen zeigen gegenüber der Referenz eine Erniedrigung der Scherempfindlichkeit der Zellen, wie im Kurzzeit-Experiment bei 37 °C (s. Tab. 3.20 u. 3.21). Dies wird anhand der ermittelten Zellzahlen deutlich. Gleichzeitig sind die Überlebensraten der substituierten Kulturen gegenüber der Referenz in der vorliegenden Versuchsreihe vier- bis siebenmal höher. Im 37 °C-Kurzzeit-Experiment sind sie eineinhalb- bis zweimal höher als die der Referenz. Die Scherempfindlichkeit hat demnach ungefähr um das Dreifache abgenommen.

Ein Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Scherempfindlichkeit der Referenz ist nicht erkennbar, ähnlich wie im Temperaturexperiment mit Cholesterin (s. Tab. 3.71). Dagegen zeigen sich Einflüsse der Kultivierungstemperatur auf die substituierten Kulturen, z.B. beim LDH-Wert.

Die Kultivierungstemperatur hat in diesem Experiment nur einen geringen Einfluss auf die Scherempfindlichkeit der Zellen. Im Gegensatz zur Temperatursenkung im Scherexperiment. Die Überlebensraten der substituierten Kulturen sind im Verhältnis zur Referenz bei niedriger Schertemperatur höher. Eine Erhöhung der Überlebensrate der Referenz kann im Vergleich zum Kurzzeit-Experiment bei 37 °C nicht festgestellt werden. Dieses beruht vermutlich auf der Verwendung einer anderen Vorkultur.

Als drittes und letztes Additiv wird **Retinol** in einem Temperaturexperiment auf seine scherreduzierenden Eigenschaften getestet.

In allen drei Kulturen ist eine Reduzierung der lebenden Zellen zu beobachten (vgl. Abb. 3.84). Bis zur 44. Stunde sinken die Lebendzellzahlen von 27 bzw. $32 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter auf 16 bzw. $10 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter ab. Nach dem Temperaturshift erfolgt ein geringer Anstieg der Zellzahl. Gemeinsam ist ebenfalls der darauffolgende erneute Abfall der Lebendzellzahl der Kulturen. Eine Schädigung durch Retinol in den substituierten Kulturen wird ausgeschlossen, da zum einen der Abfall der Lebendzellzahl auch in der Referenz auftritt und zum anderen auch in der Kurzzeit-Kultivierung bei 37°C keine derartige Schädigung auftritt (s. Tab. 3.68). Die Zellen der Kulturen scheinen von Beginn an geschädigt zu sein, eventuell durch eine längere Dauer des Zentrifugiervorganges oder eine Zentrifugation bei höherer Drehzahl. Der Anstieg der Zellzahl nach der 44. Stunde bzw. die Verlangsamung des Zellabsterbens ist auf die Temperaturänderung zurückzuführen. Die Vorgänge, die zum Absterben der Zellen führen, werden verlangsamt. Zum Beispiel könnten die schon durch die Zellyse anderer Zellen freigesetzten Proteasen die Membranproteine der intakten Zellen nur verlangsamt beschädigen.

Bei der Betrachtung der Wachstumsrate der Kulturen zeigt sich eine steigende Tendenz bis zur 68. Stunde (vgl. Tab. 3.77). Die Absterbegeschwindigkeit verlangsamt sich. Zum Ende der Kultivierung nimmt die Wachstumsrate in allen drei Kulturen noch einmal deutlich ab. Die Temperaturänderung nach der 44. kann das Absterben nur verzögern, jedoch nicht verhindern. Dies liegt an den bereits freigesetzten toxischen Zellmetaboliten, die wegen der geringeren Temperatur nur verlangsamt auf die Zellen einwirken können.

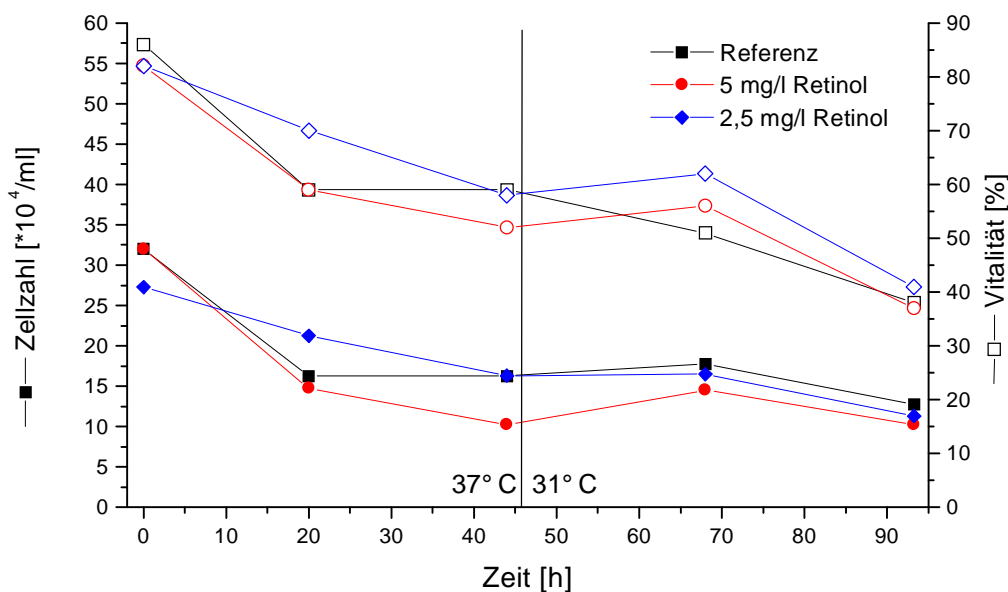


Abb. 3.84 Lebendzellzahl und Vitalität von RT01

Zeit [h]	0	20	44	68	93
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,6	1,8	0,2	1,2
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	1,8	2,4	0,4	1,2
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	1,8	1,4	0,5	0,9
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,6	1,8	0,7	0,7
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	1,8	2,6	0,8	0,8
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	1,6	1,5	0,8	0,5

Tab. 3.76 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von RT01

Die Vitalitäten der drei Kulturen sinken im Experimentverlauf ab (vgl. Abb. 3.84). In den substituierten Kulturen ist nach der Temperaturänderung eine geringe Vitalitätszunahme im Gegensatz zur Referenz zu beobachten. Diese ist wie auch der geringe Anstieg der Lebendzellzahl und der Wachstumsrate auf die Temperaturänderung zurückzuführen. Da sich die Totzellzahl wegen der verlangsamten Wirkung der toxischen Metabolite nur gering bzw. gar nicht ändert, kann auch die Vitalität gering zunehmen.

Die Glukoseverbrauchsraten nehmen in der Referenz und in Kultur 5 bis zur 44. Stunde zu, wohingegen sie in Kultur 2,5 abnehmen. Die Glukoseverbrauchsraten sind direkt nach der Temperaturänderung um ein Vielfaches geringer als bei der Kultivierung bei 37 °C (vgl. Tab. 3.76). Dies konnte auch schon in den Temperaturversuchen von Cholesterin und Cholsäure festgestellt werden und beruht auf verlangsamten Stoffwechselfvorgängen. Die Verbrauchsrate steigt in allen Kulturen nach dem Abfall zum Kultivierungsende auf einen vergleichbaren Wert an. Das ist wiederum ein Hinweis auf eine Schädigung der Zellen in allen Kulturen, da bei durch ungünstige Bedingungen die Zellen gestresst werden und mehr Glukose verbrauchen. Das Verhalten der Laktatproduktionsraten ist dem der Glukoseverbrauchsraten ähnlich (vgl. Tab. 3.76). Nach einem Anstieg der Werte in der Referenz und der Kultur 5 zur 44. Stunde und gleichbleibenden Produktionsraten in Kultur 25 sind die Werte direkt nach

Zeit [h]	0	20	44	68	93
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	696	1323	1176	792
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	539	1096	1131	222
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	484	575	0	827
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	40	18	0	69
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 5	--	10	88	38	73
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 2,5	--	10	91	6	7
Wachstumsrate [d⁻¹] Referenz	--	-0,35	0,00	0,04	-0,14
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 5	--	-0,40	-0,16	0,15	-0,14
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 2,5	--	-0,13	-0,12	0,01	-0,16

Tab. 3.77 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von RT01

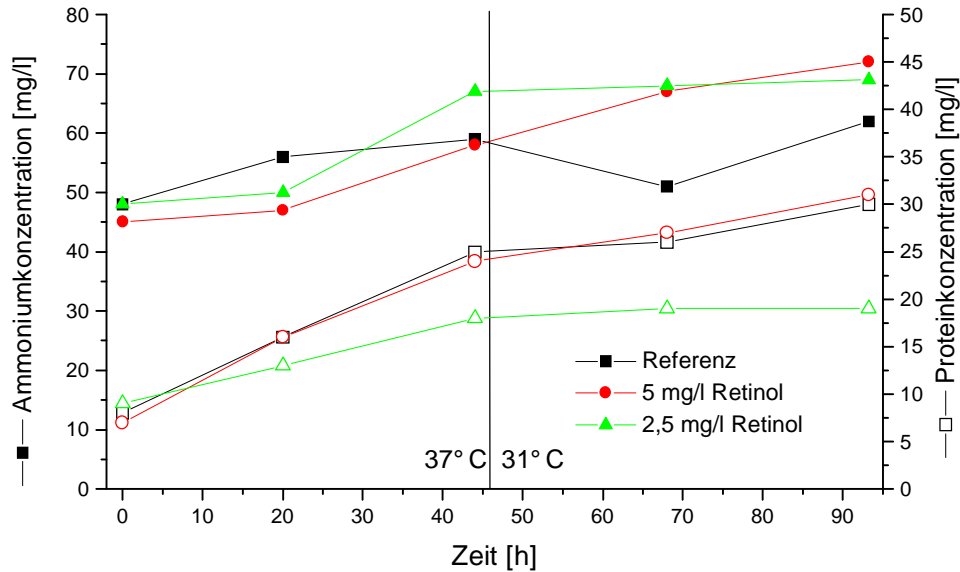


Abb. 3.85 Ammonium- und Proteinkonzentration von RT01

dem Temperaturshift um ein Vielfaches geringer. Sie bleiben bis zum Ende der Kultivierung (relativ) konstant. Ebenso wie bei den Glukoseverbrauchsdaten beruht die Abnahme der Laktatproduktionsraten auf den durch die geringe Temperatur verlangsamten Stoffwechselfvorgängen.

Die Ammoniumkonzentrationen der Kulturen steigen bis zur 44. Stunde (vgl. Abb. 3.85). Nach der Änderung der Kultivierungstemperatur bleiben die Ammoniumkonzentrationen der Referenz und von Kultur 2,5 relativ konstant, was als Auswirkung der Temperatursenkung zu betrachten ist. Im Gegensatz dazu steigt die Ammoniumkonzentration der Kultur 5 nach dem Temperaturshift im gleichen Maße weiter wie zu Beginn der Kultivierung. Dies lässt auf einen Einfluss des Retinols schließen, wie er auch im Langzeit-Experiment zu erkennen ist (s. Tab. 3.54). Deutlich zu erkennen ist das Verhalten der Kulturen an den Produktionsraten des Ammoniums (vgl. Tab. 3.77). Bis zur Änderung der Temperatur steigen die Produktionsraten der substituierten Kulturen, was vermutlich durch die Wirkung des Retinols auf die geschwächten Zellen bedingt ist. Die Rate der Referenz sinkt in diesem Zeitraum. Nach dem Temperaturshift sinken die Werte der Ammoniumproduktionsraten in allen drei Kulturen um ein Vielfaches ab. Der erneute Anstieg der Produktionsraten ist wie der Anstieg der Glukoseverbrauchsdaten ein Zeichen für die geschädigten Zellen in den Kulturen.

Die Proteinkonzentrationen der Kulturen werden durch die Temperaturänderung nur gering beeinflusst (vgl. Abb. 3.85). Der Anstieg der Konzentration in den nächsten 24 Stunden nach der Senkung der Temperatur ist geringer als vor der Temperaturänderung. Die Konzentration nimmt innerhalb der nächsten 24 Stunden nur um 1 bis 3 mg/l zu. Danach ist das Verhalten der Referenz und Kultur 5 ihrem Verhalten vor dem Temperaturshift ähnlich. Die Proteinkonzentration der Kultur 2,5 ändert sich im letzten Kultivierungsabschnitt nicht. Dies kann eine verminderte Zelllyse in Kultur 2,5 und dementsprechend eine geringere Freisetzung an intrazellulärem Protein bedeuten.

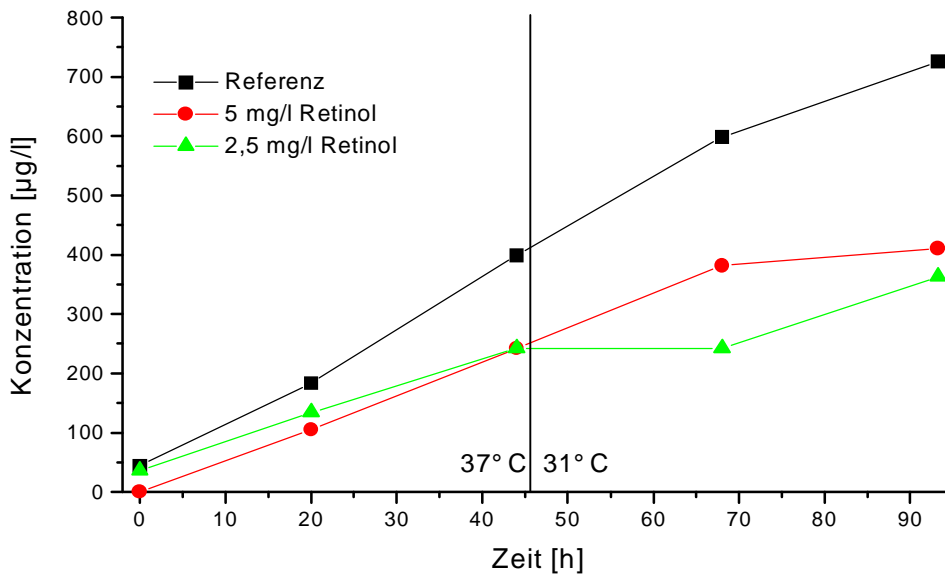


Abb. 3.86 t-PA-Konzentration von RT01

Die Konzentrationen des t-PAs werden in der Referenz und in Kultur 5 nicht von der Änderung der Temperatur beeinflusst (vgl. Abb. 3.86). Die Konzentration in Kultur 2,5 bleibt nach dem Temperaturshift von der 44. zur 68. Stunde konstant. Dies kann auf einen Einfluss der Temperaturabsenkung beruhen oder es könnte ein Messfehler vorliegen. Da in den Experimenten mit Cholesterin und Cholsäure kein Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die t-PA-Konzentration festzustellen ist, ist in diesem Versuch ein Messfehler die wahrscheinlichere Ursache der gleichbleibenden t-PA-Konzentration von Kultur 2,5. Die Konzentrationen der Retinol-Kulturen sind vergleichbar und um die Hälfte geringer als die der Referenz. Hier zeigt sich der Einfluss des Retinols, wie er auch in der Kurzzeit-Kultivierung und teilweise im Langzeit-Experiment festzustellen war (s. Abb. 3.59 u. 3.72). Auch die Produktionsraten der substituierten Kulturen sind geringer als die Produktionsraten der Referenz. Eine Ausnahme bildet die Produktionsrate der 93. Stunde von Kultur 2,5, die in der 68. Stunde aufgrund der wahrscheinlich durch einen Messfehler zu gering ermittelten Konzentration sehr hoch ausfällt. Die Produktionsraten steigen bis zur Temperaturänderung an. Durch die Absenkung der Temperatur bleiben sie die nächsten 24 Stunden relativ konstant und sinken zum Kultivierungsende ab. Bei Kultur 2,5 kann dieser Abfall nicht festgestellt werden, da die zu gering ermittelte Konzentration die Produktionsraten sowohl der 68. als auch der 93. Stunde beeinflusst. Die Produktionsraten werden durch die Temperatursenkung beeinträchtigt.

Die Aminosäure-Konzentrationen unterscheiden sich vorwiegend in der Konzentration des Glutamins (Daten s. Anhang). In der Referenz ist die vorhandene Konzentration bis zur 93. Stunde auf 39 mg/l gesunken. In Kultur 2,5 und 5 beträgt die Glutamin-Konzentration mit 57 und 65 mg/l fast das Zweifache der Konzentration der Referenz. Dies lässt für die Retinol-Kulturen auf einen verringerten Verbrauch schließen, der vermutlich durch das Retinol verursacht ist. Die Alaninkonzentrationen der Kultur 2,5 und 5 können in der Messung nicht von denen des Arginins getrennt werden,

	RT01 A	RT01 B	RT01 C
	31°C Scher- und 37°C Kultivierungstemperatur		31°C Scher- und 31°C Kultivierungstemperatur
R_s [%] Referenz	36	35	17
R_s [%] Kultur 5	13	19	35
R_s [%] Kultur 2,5	45	44	25
τ [N/m ²] Referenz	2,0	2,0	1,9
τ [N/m ²] Kultur 5	2,0	1,9	2,3
τ [N/m ²] Kultur 2,5	2,0	2,1	2,2

Tab. 3.78 Überlebensrate und Schubspannung von RT01

so dass eine eindeutige Bestimmung der Konzentration nicht erfolgen kann. In den Konzentrationen der anderen Aminosäuren unterscheiden sich die Kulturen nicht. Es werden je Kultur drei Kurzzeit-Scherexperimente durchgeführt, zwei bei 37 °C Kultivierungstemperatur und eines bei 31 °C Kultivierungstemperatur. Die Schertemperatur beträgt bei allen Experimenten 31 °C. Die Überlebensraten und Schubspannungen sind in Tab. 3.78 zusammengefasst. Dabei zeigt sich, dass allein Kultur 5 mit 35 % im zweiten Abschnitt eine höhere Überlebensrate gegenüber der des ersten Abschnitts aufweist. Die hohe Überlebensrate der Kultur 2,5 im ersten Abschnitt kann mit der teilweise höheren Vitalität und der geringeren Abnahme der Lebendzellzahl gegenüber den anderen Kulturen begründet werden. Diese lassen eine geringere Schädigung vermuten, was eine höhere Scherresistenz gegenüber den anderen Kulturen bedeutet. Ebenso könnte die höhere Überlebensrate der Kultur 5 im zweiten Abschnitt durch kurzzeitig verbesserte Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sein, die sich auch in einer geringen Zunahme der Lebendzellzahl und der Vitalität während der Kultivierung äußern. Auch könnte bei einer geringeren Kultivierungstemperatur der Einfluss des Retinols in der höher konzentrierten Kultur auf die in Kap. 3.2.1.4 angesprochene Deaktivierung bzw. Blockierung von Enzymen zurückgehen. Auf diese Weise kann die Beeinflussung der Membranzusammensetzung bzw. -synthese durch Retinol in den Vordergrund rücken und der schädigende Einfluss von Retinol nimmt ab. Die geringere Überlebensrate im ersten Abschnitt ist daraufhin vermutlich durch den schädigenden Einfluss der hohen Retinol-Konzentration bedingt.

Änderung der/des	Referenz		Kultur 5		Kultur 2,5	
	31/37	31/31	31/37	31/31	31/37	31/31
... Totzellzahl [10 ⁴ Ze/ml]	-6	1	3	1	-4	0
... Lebendzellzahl [10 ⁴ Ze/ml]	-20	-21	-16	-12	-8	-16
... Gesamtzellzahl [10 ⁴ Ze/ml]	-26	-21	-13	-12	-11	-16
... Vitalität [%]	-13	-42	-46	-26	-11	-31
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	5	3	-2	0	9	0
... Proteinkonzentration [mg/l]	16	12	12	8	2	11
... relativen LDH-Wertes [U/l]	121	105	104	56	35	94

Tab. 3.79 gemittelte Analysenwerte von RT01

Die Abnahme der Überlebensraten der Referenz ist wahrscheinlich durch die abnehmende Vitalität während der Kultivierung bedingt. Bei abnehmender Vitalität kann von einer Schädigung der Zellen und damit auch von einer erhöhten Scherempfindlichkeit ausgegangen werden.

Verglichen mit den Werten von R03 bis R05 (s. Tab. 3.51) sind die Überlebensraten der Retinol-Kulturen im Verhältnis zur Referenz gesunken. Das Verhältnis beträgt bei R03 bis R05 das 1,7- bis 1,8-fache. Hier beträgt es bei gleicher Kultivierungstemperatur von 37 °C das 1,3-fache bei Kultur 2,5 und bei Kultur 5 nur ein Drittel bzw. die Hälfte des Wertes der Referenz. Nach der Senkung der Kultivierungstemperatur steigt das Verhältnis auf das 1,5- bis 2,1-fache des Wertes der Referenz an. Eine Absenkung der Kultivierungstemperatur scheint somit einen Einfluss auf das Verhältnis der Überlebensraten untereinander zu haben.

Gut zu erkennen ist die Abnahme der Überlebensraten der Referenz und von Kultur 2,5 in Abschnitt zwei durch die Änderung der Vitalität (vgl. Tab. 3.79). Die Vitalität der Referenz zeigt eine Abnahme von 29 % (Δ Vitalität \equiv -13 % \rightarrow -42 %) die der Kultur 2,5 eine von 20 % (Δ Vitalität \equiv -11 % \rightarrow -31 %) bei der Änderung der Kultivierungstemperatur von 37 °C auf 31 °C. Die Vitalität der Kultur 5 nimmt dagegen um 20 % (Δ Vitalität \equiv -46 % \rightarrow -26 %) zu, dies hat einen Einfluss auf die Überlebensrate.

Die ähnliche Änderung des relativen LDH-Wertes bei der Referenz deutet auf eine vergleichbare Abnahme der Zellzahlen der Referenz bei 37 bzw. 31 °C hin. Aus diesem Grund differieren die relativen LDH-Werte der Kultur 2,5 und die der Kultur 5 bei 37 und 31 °C. In Kultur 5 ist der relative LDH-Wert bei 31 °C Kultivierungstemperatur geringer, genau wie die Abnahme der Zellzahlen. Bei Kultur 2,5 verhält es sich umgekehrt.

Die Änderung der Ammonium- und der Proteinkonzentration ist nicht abhängig von der Kultivierungstemperatur und ist bis auf das Scherexperiment 31/37 der Kultur 2,5 bei allen Versuchen vergleichbar. Die Abweichungen bestätigen die höhere Überlebensrate dieser Kultur im Scherexperiment 31/37. Dass die Ammoniumkonzentration zunimmt deutet auf intakte Zellen hin und die geringe Zunahme der Proteinkonzentration lässt nur eine geringe Zellyse vermuten.

In diesem Experiment sind die Überlebensraten gegenüber denen des Kurzzeit-Experiments bei 37 °C nicht erhöht (s. Tab. 3.51), genau wie dies im Temperaturexperiment mit Cholsäure der Fall ist (s. Tab. 3.74). Dies ist vermutlich auf die Verwendung einer anderen Vorkultur zurückzuführen. Im Gegensatz zu den 37 °C Kurzzeit-Experimenten erhöht sich aber das Verhältnis der Überlebensraten der substituierten Kulturen zur Referenz. Die Verringerung der Schertemperatur scheint hier Einfluss zu nehmen. Eine Verringerung der Kultivierungstemperatur zeigt dagegen, außer bei Kultur 5, keine positive Wirkung.

3.2.2.1 Fazit der Temperatur-Scherexperimente

In Tab. 3.80a sind die Differenzen der Überlebensraten ($\Delta\bar{R}_s$ [%]) der Additive und der Schubspannungen ($\Delta\tau$ [N/m^2]) zusammengefasst. Sie berechnen sich aus dem Unterschied der Werte der jeweiligen Referenz und dem der Additive. Außerdem ist die absolute Schubspannung aufgeführt.

		Konzentration [mg/l]	$\Delta\bar{R}_s$ [%]	$\Delta\tau$ [N/m^2]	τ [N/m^2]
Gruppe I	Cholesterin				
Kurzzeit-Experiment		100	+19	0,0	1,9
Kurzzeit-Experiment		125	+19	-0,1	1,8
Temperatur-Experiment	37 °C/31 °C	100	+2	+0,1	2,1
Temperatur-Experiment	31 °C/31 °C	100	+3	+0,2	2,2
Temperatur-Experiment	37 °C/31 °C	125	+2	0,0	2,0
Temperatur-Experiment	31 °C/31 °C	125	-11	+0,2	2,2
Gruppe II	Cholsäure				
Kurzzeit-Experiment		25	+44	0,0	1,9
Kurzzeit-Experiment		50	+26	-0,1	1,9
Temperatur-Experiment	37 °C/31 °C	25	+20	0,0	1,9
Temperatur-Experiment	31 °C/31 °C	25	+26	-0,1	1,9
Temperatur-Experiment	37 °C/31 °C	50	+40	+0,2	2,1
Temperatur-Experiment	31 °C/31 °C	50	+49	+0,1	2,1
Gruppe III	Retinol				
Kurzzeit-Experiment		2,5	+22	0,0	1,8
Kurzzeit-Experiment		5	+24	0,0	1,8
Temperatur-Experiment	37 °C/31 °C	2,5	+11	+0,1	2,1
Temperatur-Experiment	31 °C/31 °C	2,5	+7	+0,3	2,2
Temperatur-Experiment	37 °C/31 °C	5	-20	0,0	2,0
Temperatur-Experiment	31 °C/31 °C	5	+18	+0,4	2,3

Tab. 3.80a Fazit der Temperatur-Experimente

Es ist festzustellen, dass die Schubspannungen in den Temperaturexperimenten höher sind als bei 37 °C Schertemperatur. Als Ursache kann eine erhöhte Viskosität angenommen werden. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass zum einen die Viskosität von Flüssigkeiten mit der Temperatur zunimmt und zum anderen daraus, dass sich die Zellmembran bei geringerer Temperatur zunehmend versteift, so inflexibler wird und auf diese Weise ebenfalls die Viskosität mit herabsetzt. Es herrscht bei einer Schertemperatur von 31 °C nach den ermittelten Schubspannungen also eine höhere Belastung für die Zellen. Dieses wirkt sich auf die Überlebensraten aus. In Bezug auf die Scherexperimente bei 37 °C sind die Überlebensraten der substituierten Kulturen geringer. Die Überlebensraten der jeweiligen Referenz sind in den Temperaturexperimenten ebenfalls geringer, als für die 37 °C Scherexperimente (s. Tab. 3.7, 3.20, 3.51 u. Tab. 3.70, 3.74, 3.78). Dieses entspricht nicht den Erwartungen und widerspricht den Literaturangaben (Ludwig et al. 1992/Reich 1996). In Anlehnung an Duve bzw. Karlson soll die Festigkeit der Zellmembran bei sinkender Temperatur zunehmen, wodurch das Ausmaß der Membranzerstörung durch die auftretenden Scherkräfte verringert wird (Duve 1989/Karlson 1994). Dieses trifft in den hier durchgeführten Experimenten nicht zu.

Eine immer noch hohe Überlebensrate gegenüber der Referenz weisen die Cholsäure-Kulturen auf, die nach der Einteilung aus Kap. 3.2.1.5 grün markiert sind. Die anderen getesteten Additive erreichen keine um mindestens 20 % höhere Überlebensrate als die jeweilige Referenz und sind der Einteilung nach rot markiert. Die getesteten Additive sind demzufolge nicht geeignet, die absolute Überlebensrate der Zellen bei einer Schertemperatur von 31 °C zu erhöhen.

Da die absoluten Überlebensraten aufgrund der erhöhten Schubspannungen nur schwer zu vergleichen sind, werden die Verhältnisse der Überlebensraten der substituierten Kulturen zur Referenz berechnet. Aus Tab. 3.80b lässt sich erkennen, dass das Verhältnis in den Cholesterin-Experimenten mit geringerer Kultivierungs- und Schertemperatur abnimmt. Dies könnte durch die versteifende Wirkung des Cholesterins

	37 °C/37 °C*	37 °C/31 °C*	31 °C/31 °C*
Cholesterin			
R_s (Kultur 100)/ R_s (Referenz)	1,6	1,1	0,5
R_s (Kultur 125)/ R_s (Referenz)	1,8	1,1	1
Cholsäure			
R_s (Kultur 25)/ R_s (Referenz)	2	2,6	3
R_s (Kultur 50)/ R_s (Referenz)	1,6	4,3	4,5
Retinol			
R_s (Kultur 2,5)/ R_s (Referenz)	1,9	1,3	0,7
R_s (Kultur 5)/ R_s (Referenz)	2,4	0,4	2,1

Tab. 3.80b Verhältnis der Überlebensraten bei verschiedenen Temperaturen

* Kultivierungstemperatur/Schertemperatur

auf die Zellmembran zurückzuführen sein. Möglicherweise ist diese bei einer Scher- und Kultivierungstemperatur von 37 °C für die Zellen vorteilhafte Versteifung bei Absenkung der Temperatur von Nachteil. Die Membran wird zusätzlich durch die Temperaturabsenkung weiter versteift. Auf diese Weise kann die Zellmembran nicht mehr flexibel genug auf äußere Einflüsse reagieren und so leichter zerstört werden.

Das Verhältnis der Überlebensraten für Cholsäure nimmt mit sinkenden Temperaturen zu. Das Additiv verhält sich demnach nicht wie Cholesterin, sondern beeinflusst die Zellen auf einem anderen Weg. Es wird angenommen, dass die Cholsäure die Membranzusammensetzung beeinflusst, indem sie die Löslichkeit bestimmter Lipide erhöht. Bei geringerer Temperatur scheint sich daraufhin die Membranzusammensetzung in Abhängigkeit der Cholsäure-Konzentration derart zu verändern, dass eine erhöhte Scherresistenz festgestellt werden kann.

Wird das Verhältnis der Überlebensraten von Retinol betrachtet, so kann in beiden Fällen von einer Abnahme bei der Absenkung der Temperatur ausgegangen werden, wenn der Wert 0,4 nicht beachtet wird. Retinol fungiert in der Zelle als lokaler Mediator. Es könnte damit wie Cholsäure die Zusammensetzung der Zellmembran beeinflussen. Dieser Effekt nimmt bei Retinol dagegen mit abnehmender Temperatur ab. Die abweichenden Tendenzen zur Cholsäure können mit der anderen Struktur und der damit anderen Funktionsweise des Retinols erklärt werden.

Angesichts der bei Cholesterin und Retinol abnehmenden Verhältnisse der Überlebensraten zur Referenz ist ein Einsatz dieser Additive in den getesteten Konzentrationen bei einer Temperaturabsenkung auf 31 °C nicht vorteilhaft. Cholsäure dagegen zeigt eine positive Auswirkung auf die Überlebensraten der substituierten Kulturen bei einer Absenkung der Temperatur auf 31 °C.

3.2.3 Kombinationsexperimente

Es werden zwei Kombinationsexperimente durchgeführt. Aufgrund der natürlichen Funktion der Cholsäure, die Lipidaufnahme zu ermöglichen, wird diese in Kombination mit den Lipiden Cholesterin und Phosphatidylcholin eingesetzt. Das erste Experiment kombiniert 125 mg/l Cholesterin mit 25 bzw. 50 mg/l Cholsäure. Im zweiten Experiment werden 50 mg/l Phosphatidylcholin mit 25 bzw. 50 mg/l Cholsäure zusammen eingesetzt.

Die substituierten Kulturen mit **Cholsäure und Cholesterin** durchlaufen bis zur 37. Stunde eine Lag-Phase (vgl. Abb. 3.87). Sie erreichen ein Lebendzellzahlminimum von $22 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in der 37. Stunde. Erst danach erfolgt ein weiterer Anstieg der Lebendzellzahl bis zu einem Maximum in der 85. Stunde von der Kultur mit 125 mg/l Cholesterin und 50 mg/l Cholsäure (Kultur 50) sowie in der 62. Stunde in der Kultur mit 125 mg/l Cholesterin und 25 mg/l Cholsäure (Kultur 25). Die Lebendzellzahl der Referenz steigt kontinuierlich während des Experiments und erreicht in der 85. Stunde den Höchstwert. Größere Abweichungen der Lebendzellzahlen zwischen den einzelnen Kulturen sind nicht vorhanden. Die zugefügten Additive haben keinen Einfluss auf die Lebendzellzahlen. Das geringe Wachstum ist durch die Vorkultur bedingt.

Der Verlauf der Wachstumsraten der Referenz und von Kultur 50 ist ähnlich (vgl. Tab. 3.82). Die Wachstumsraten der Referenz und der Kultur 50 erfahren nach einem Abfall zur 37. Stunde einen Anstieg zur 62. Stunde. Zum Kultivierungsende nehmen sie wiederum ab. Die Werte von Kultur 50 sind geringer. Eine Ausnahme bildet die Rate der 85. Stunde. Die Wachstumsrate der Kultur 25 steigt stetig bis zur 62. Stunde an. Aufgrund des stationären Zellwachstums ist die Wachstumsrate in der 85. Stunde gleich Null. Wegen der vergleichbaren Lebendzellzahlen sind auch die Wachstumsraten vergleichbar.

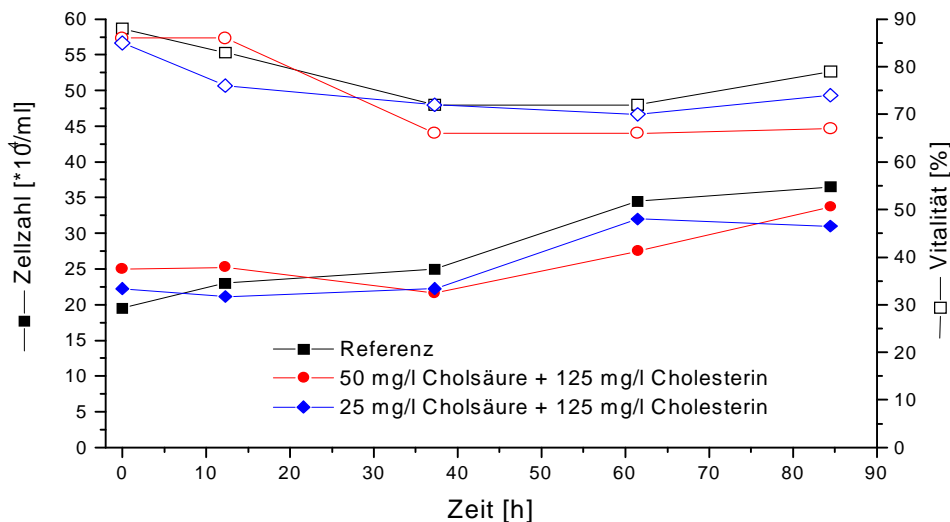


Abb. 3.87 Lebendzellzahl und Vitalität von CHC01

Zeit [h]	0	12	37	62	85
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,5	1,6	0,8	0,5
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,1	1,5	0,9	0,6
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,9	1,8	0,7	0,5
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	2,4	1,7	0,7	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,8	1,6	0,7	0,2
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	2,3	1,8	0,6	0,2

Tab. 3.81 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von CHC01

Die Vitalitäten der Kulturen sinken bis zur 62. Stunde ab (vgl. Abb. 3.87). In der letzten Phase der Kultivierung steigen die Vitalitäten in allen drei Kulturen mit bis zu 7 % gering an. Die höchste Vitalität besitzt in der 85. Stunde die Referenz, die niedrigste die Kultur 50. Der anfängliche Abfall in der Vitalität in allen Kulturen ist auf die Lag-Phase der Zellen zurückzuführen. Diese brauchen Zeit, um sich an die neue Umgebung zu adaptieren. Die abhängig von der zugesetzten Cholsäure-Konzentration geringeren Vitalitäten in den substituierten Kulturen können nicht eindeutig auf die zugesetzte Cholsäure zurückgeführt werden.

Die Glukoseverbrauchsrate der Referenz und der Kultur 50 nehmen von der 12. auf die 37. Stunde zu, wohingegen sie in Kultur 25 abnehmen (vgl. Tab. 3.81). Im weiteren Verlauf sind die Raten der Kulturen ähnlich, was dafür spricht, dass kein toxischer Einfluss durch die zugesetzten Additive besteht. Die Laktatproduktionsrate der Referenz und von Kultur 25 sind während des Versuchsverlaufs äquivalent (vgl. Tab. 3.81). Die Werte der Laktatproduktionsrate der Kultur 50 sind aufgrund der geringeren Glukoseverbrauchsrate in den ersten 37 Stunden um 0,1 bis 0,6 mg/d*1 Mio. Ze niedriger als die von der Referenz und Kultur 25. Von der 62. bis zur 85. Stunde sind die Produktionsraten mit denen der Referenz und Kultur 25 vergleichbar. Die Zellen der drei Kulturen befinden sich in der Adaptionphase, wie sich auch an der Vitalität (s. Abb. 3.87) feststellen lässt. Sie verbrauchen deswegen mehr Glukose und produzieren mehr Laktat.

Zeit [h]	0	12	37	62	85
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	2090	676	0	558
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1513	1930	564	1670
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	2195	1306	478	558
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	82	104	30	12
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	62	61	60	55
Ammoniumproduktionsrate [µg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	72	93	40	39
Wachstumsrate [d⁻¹] Referenz	--	0,26	0,03	0,14	0,03
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 50	--	0,00	-0,05	0,10	0,09
Wachstumsrate [d⁻¹] Kultur 25	--	-0,04	0,02	0,16	0,00

Tab. 3.82 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von CHC01

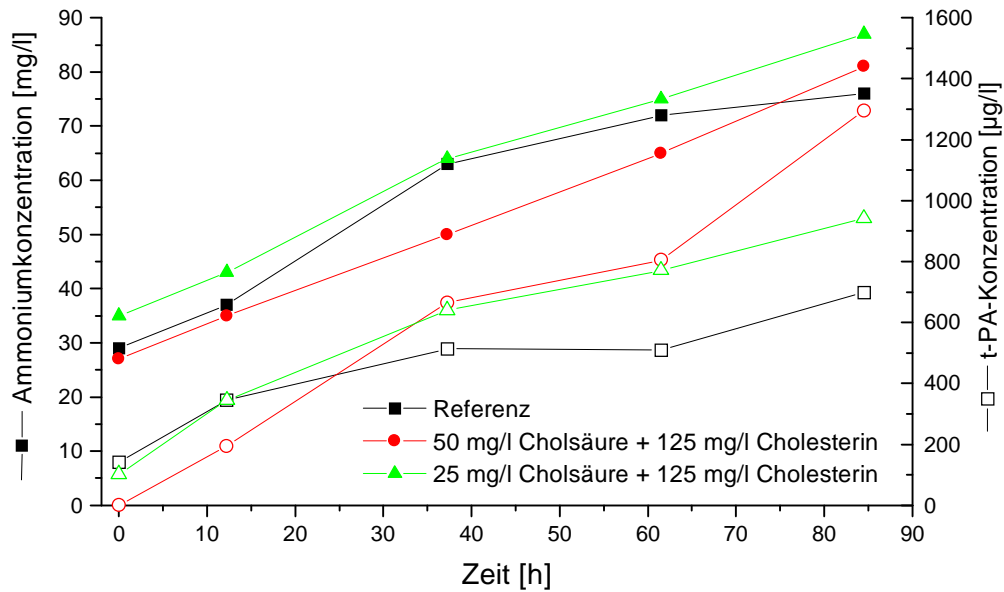


Abb. 3.88 Ammonium- und t-PA-Konzentration von CHC01

Die Ammoniumkonzentrationen der substituierten Kulturen nehmen zum Experimentende linear zu (vgl. Abb. 3.88). Dabei erhöht sich die Konzentration in Kultur 25 um 52 mg/l und in Kultur 50 um 54 mg/l. Die Konzentrationszunahme in der Referenz erfolgt um 47 mg/l. In den substituierten Kulturen ist die Konzentration zum Ende des Experiments gegenüber der Referenz gering erhöht, was jedoch kein eindeutiger Hinweis auf einen toxischen Einfluss der zugefügten Additive ist. Die Ammoniumproduktionsrate der Kultur 50 ist während des Experiments nahezu konstant (vgl. Tab. 3.82). Die Produktionsraten der Referenz und von Kultur 25 fallen nach einem Anstieg von der 12. auf die 37. Stunde im weiteren Verlauf der Kultivierung ab. Dabei sind in den ersten 37 Stunden die Produktionsraten der Kultur 25 geringer. In den nächsten 58 Stunden ist es umgekehrt. Im ersten Kultivierungsabschnitt bis zur 37. Stunde sind die Raten der substituierten Kulturen geringer, im zweiten Abschnitt sind sie höher als die der Referenz. Dieser Effekt konnte schon in der Kultivierungsreihe von CV beobachtet werden (s. Tab. 3.6). Teilweise ist er auch in den Cholsäure-Experimente z.B. bei Kultur 25 aufgetreten (s. Tab. 3.19 u. 3.23). Die Erhöhung der Produktionsrate beruht demnach sowohl auf der zugesetzten Cholsäure als auch auf dem Cholesterin.

Die eindeutige Bestimmung der Proteinkonzentration ist nur in der Referenz möglich, da der Cholesterin-Gehalt das Messergebnis verfälscht (Daten nicht gezeigt). Die t-PA-Konzentration in den substituierten Kulturen übersteigt ab der 37. Stunde die der Referenz (vgl. Abb. 3.88). Bis zum Kultivierungsende beträgt die Konzentration in der Referenz 518 µg/l, in Kultur 50 1114 µg/l und in Kultur 25 760 µg/l. Die t-PA-Produktionsraten der substituierten Kulturen liegen über denen der Referenz (vgl. Tab. 3.82). Eine Ausnahme bildet die Rate in der 12. Stunde von Kultur 50. Dies ist wahrscheinlich durch das zugesetzte Cholesterin bedingt, da sowohl in den Kurzzeit-Experimenten als auch im Langzeit-Experiment der gleiche Effekt festgestellt

werden kann (s. Abb. 3.38, 3.40 u. 3.42). Das Cholesterin beeinflusst demnach die t-PA-Produktion positiv. Die Produktionsraten der drei Kulturen zeigen alle einen Anstieg in der letzten Phase der Kultivierung.

Die Konzentrationen der Aminosäuren unterscheiden sich zwischen den Kulturen nur geringfügig (Daten s. Anhang). Dies lässt sich durch die vergleichbaren Lebendzellzahlen der Kulturen erklären.

Trotz einiger Unterschiede wie z.B. bei der Ammonium- oder bei der t-PA-Produktionsrate lassen sich die Kulturen vergleichen. Die Abweichungen in Bezug auf die Referenz sollten keine Auswirkungen auf die Scherempfindlichkeit der Zellen besitzen.

Es werden je Kultur vier **Kurzzeit-Scherexperimente** durchgeführt. Die gemittelten Überlebensraten und Schubspannungen sind in Tab. 3.83 zusammengefasst. Es fällt auf, dass bei vergleichbaren Schubspannungen die substituierten Kulturen mit 45 % die höchsten Überlebensraten aufweisen. Sie sind um 7 % höher als die der Referenz. Als Ursache der geringeren Überlebensrate von 11 % im zweiten Scherexperiment der Referenz bei einer geringen Schubspannung von $1,7 \text{ N/m}^2$ (Daten nicht gezeigt) wird das höhere Zellwachstum der Referenz während der Kultivierung vermutet. Bei diesem wird die gesamte Energie der Zellen zur Teilung verwendet, so dass die Zellen die Scherbelastungen schlechter kompensieren können.

Bei ungefähr gleicher Schubspannung widerstehen die Zellen der substituierten Kulturen den Scherbelastungen besser als die der Referenz. Dies wird anhand der Vitalitätsabnahme in Tab. 3.84 besonders deutlich. Die geringsten Abnahmen verzeichnen die substituierten Kulturen. Trotz der hohen Überlebensraten werden viele Zellen in diesen Kulturen geschädigt, wie an den in Bezug auf die Referenz hohen relativen LDH-Werten zu erkennen ist. Wie stark diese Zellen geschädigt sind ist nicht zu erkennen. Anschließende Kultivierungen mit diesen Zellen können darüber Aufschluss geben, werden aber aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Eine andere Erklärung für die

	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
Überlebensrate R_s [%]	38	45	45
Schubspannung τ [N/m^2]	1,9	1,9	1,9

Tab. 3.83 Überlebensrate und Schubspannung von CHC01

Änderung der/des	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	-1	-2	-2
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-12	-13	-14
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-14	-15	-16
... Vitalität [%]	-22	-13	-11
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	3	4	6
... Proteinkonzentration [mg/l]	14	14	12
... relativen LDH-Wertes [U/l]	107	177	155

Tab. 3.84 gemittelte Analysenwerte von CHC01

hohen Änderungen der relativen LDH-Werte in den substituierten Kulturen kann ein erhöhter LDH-Gehalt in den Zellen dieser Kulturen sein.

Die Änderung der Ammonium- und der Proteinkonzentration ist vermutlich aufgrund der ähnlichen Änderungen der Zellzahlen in allen Kulturen vergleichbar und gibt keinen Aufschluss über das Überlebensverhalten der Zellen der verschiedenen Kulturen.

Die ermittelten Überlebensraten sind mit denen der Kultivierungsreihe des Cholesterins zu vergleichen (s. Tab. 3.3). Das ist aufgrund der positiven Beeinflussung des Cholesterins auf die Zellen während der Kultivierung nicht unerwartet. So wird z.B. die t-PA-Produktivität sowie die Produktionsrate des Ammoniums in der zweiten Hälfte des Experiments erhöht. Die Überlebensraten der Cholsäure-Experimente werden nicht erreicht. Wahrscheinlich kann die Cholsäure wegen des ebenfalls vorliegenden Cholesterins seine Wirkung zur Scherreduzierung an den Zellen nicht entfalten. Wenn es als Cholesterin-Analoges, wie dieses reagieren kann und die Zelle die Auswahl zwischen dem Original (Cholesterin) und dem Ersatz (Cholsäure) hat, wird immer erst das Original aufgebraucht werden, da die Enzyme und Reaktionswege auf dieses besser abgestimmt sind. Deswegen ist die Wirkung der Cholsäure in Gegenwart von Cholesterin zu vernachlässigen.

Die Kultivierung in Kombination von Cholesterin und Cholsäure führt nicht zur Addition ihrer Überlebensraten. Die Reproduzierbarkeit der Überlebensraten in Kombination von Cholsäure und Cholesterin ist höher als die in den Experimenten mit den separat zugesetzten Substanzen. Dies kann von Vorteil sein, wenn eine gleichbleibende Überlebensrate notwendig ist.

Im zweiten Kombinationsexperiment werden **Cholsäure und Phosphatidylcholin** zusammen eingesetzt. Wie schon an den Lebendzellzahlen ersichtlich, unterscheiden sich die Referenz und Kultur 25 (50 mg/l Phosphatidylcholin und 25 mg/l Cholsäure) deutlich von Kultur 50 (50 mg/l Phosphatidylcholin und 50 mg/l Cholsäure) (vgl. Abb. 3.89). Die Lebendzellzahlen dieser beiden Kulturen durchlaufen bis zur 19. Stunde eine Lag-Phase und zeigen danach einen Anstieg der Lebendzellzahlen. Das Maximum liegt bei beiden Kulturen mit $48 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in der 77. Stunde. Die Lebendzellzahlen der Kultur 50 nehmen im Verlauf der Kultivierung dagegen nur um $11 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter zu und erreichen einen Höchstwert von $29 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter in der 94. Stunde. Es kann nicht ausschließlich an der geringen Vitalität der Kultur 50 liegen, dass die Lebendzellzahlen nur langsam zunehmen. Wie im Kurzzeit- sowie im Langzeit-Experiment von PC festgestellt werden konnte, beeinflusst PC das Zellwachstum. Dieser Effekt ist bei höherer Konzentration größer (s. Abb. 3.55 u. 3.58).

Aufgrund der unterschiedlichen Lebendzellzahlen differieren die Wachstumsraten der Kulturen (vgl. Tab. 3.86). Die Raten der Referenz und von Kultur 25 sinken nach einem anfänglichen Anstieg zum Ende ab. Im Gegensatz dazu steigt die Rate der Kultur 50 nach anfänglichem Absinken zum Kultivierungsende an.

Die Referenz besitzt in der Kultivierung von Beginn an die höchste Vitalität in Bezug auf die substituierten Kulturen (vgl. Abb. 3.89). Die Vitalität der Kultur 25 steigt im Versuchsverlauf von 56 auf 66 % an, wohingegen die der Kultur 50 konstant bleibt. Schon zu Beginn der Kultivierung zeigen die verschiedenen Vitalitäten, dass während des Ansetzens der Kulturen Zellen vermehrt in den substituierten Kulturen absterben, was sich auch in der geringeren Lebendzellzahl gegenüber der Referenz ausdrückt. Dass dieses Absterben in beiden substituierten Kulturen und nicht in der

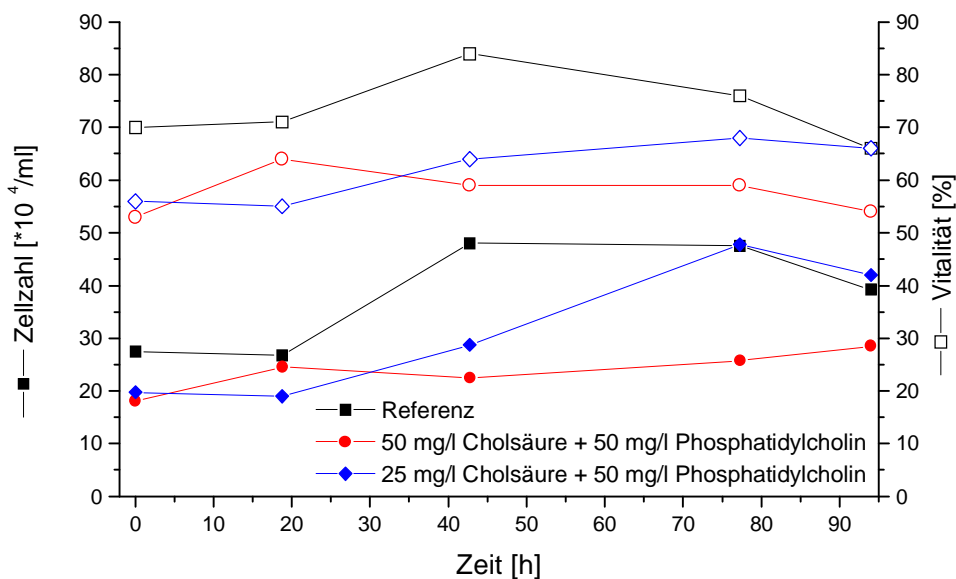


Abb. 3.89 Lebendzellzahl und Vitalität von CHPC01

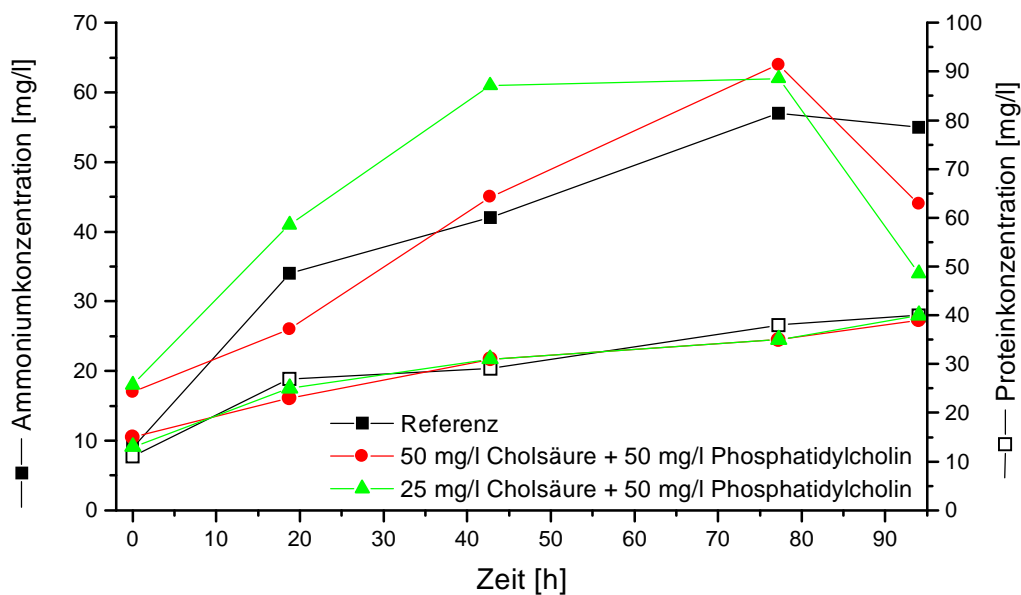
Zeit [h]	0	19	43	77	94
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	0,8	0,9	0,8	0,4
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	0,9	1,5	1,0	0,3
Glukoseverbrauchsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,1	1,5	0,9	0,3
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	1,2	1,0	0,4	-0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	1,7	1,6	0,6	-0,1
Laktatproduktionsrate [mg/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	1,7	1,6	0,5	-0,1

Tab. 3.85 Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate von CHPC01

Referenz auftritt, ist vermutlich Zufall. Eine denkbare Ursache könnte ein gering abweichender Arbeitsmodus beim Einfüllen der Zellen sein.

Die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten der substituierten Kulturen sind von der 19. bis zur 77. Stunde höher als die der Referenz (vgl. Tab. 3.85). Dies ist durch die geringeren Zellzahlen bedingt und vermutlich durch den Einfluss des PCs verursacht. Ähnlich höhere Werte konnten schon im Kurzzeit-Experiment von PC beobachtet werden (s. Tab. 3.32). Die höhere Verbrauchs- bzw. Produktionsrate gleicht sich zum Versuchsende der Referenz an.

Die Ammoniumkonzentrationen der Kulturen erlangen in der 77. Stunde ihren Maximalwert (vgl. Abb. 3.90). Schon zum Kultivierungsbeginn unterscheiden sich die substituierten Kulturen um +8 bis +9 mg/l von der Referenz. Diese Differenz zeigt sich auch in der 77. Stunde beim Erreichen des Maximalwertes. Die anschließende Abnahme der Konzentration ist entweder auf ein Ausgasen des Ammoniums als Ammoniak oder auf einen Messfehler zurückzuführen. Die Ammoniumproduktionsraten der Kulturen nehmen während der Kultivierung ab. Eine Ausnahme bilden die ersten beiden Werte von Kultur 50. Die Produktionsraten der einzelnen Kulturen unterscheiden sich zum einen in der Höhe und zum anderen in der Abnahmegeschwindigkeit. In



Tab. 3.90 Ammonium- und Proteinkonzentration von CHPC01

Zeit [h]	0	19	43	77	94
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Referenz	--	321	674	943	311
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 50	--	446	843	877	745
t-PA-Produktionsrate [ng/d*1 Mio. Ze] Kultur 25	--	912	838	693	38
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d}^*1 \text{ Mio. Ze}$ Referenz	--	118	21	22	0
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d}^*1 \text{ Mio. Ze}$ Kultur 50	--	54	81	55	0
Ammoniumproduktionsrate [$\mu\text{g}/\text{d}^*1 \text{ Mio. Ze}$ Kultur 25	--	152	84	2	0
Wachstumsrate [d^{-1}] Referenz	--	-0,02	0,25	0,00	-0,12
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 50	--	0,17	-0,04	0,04	0,06
Wachstumsrate [d^{-1}] Kultur 25	--	-0,02	0,18	0,15	-0,08

Tab. 3.86 Ammonium- und t-PA-Produktionsrate und Wachstumsrate von CHPC01

den substituierten Kulturen können höhere Werte als in der Referenz festgestellt werden. Dies zeigt eine Belastung der Zellen im Gegensatz zur Referenz, die vermutlich durch eines der Additive verursacht wird. Anhand der einzelnen Experimente kann jedoch keine Zuordnung dieses Einflusses erfolgen. Die Produktionsraten nehmen in der Kultur 25 am schnellsten in der Kultur 50 am langsamsten ab, was für Kultur 25 für eine nachlassende und für Kultur 50 für eine lang andauernde Belastung spricht.

Die Proteinkonzentrationen der drei Kulturen sind während der Beobachtungszeit vergleichbar (vgl. Abb. 3.90). In Kultur 50 wird trotz der geringeren Lebendzellzahlen die gleiche Konzentration an Protein ermittelt, wie in den anderen beiden Kulturen. Dies spricht entweder für eine Freisetzung durch Zellyse, was auch die nicht steigenden Lebendzellzahlen erklären würde oder eine vermehrte Proteinproduktion.

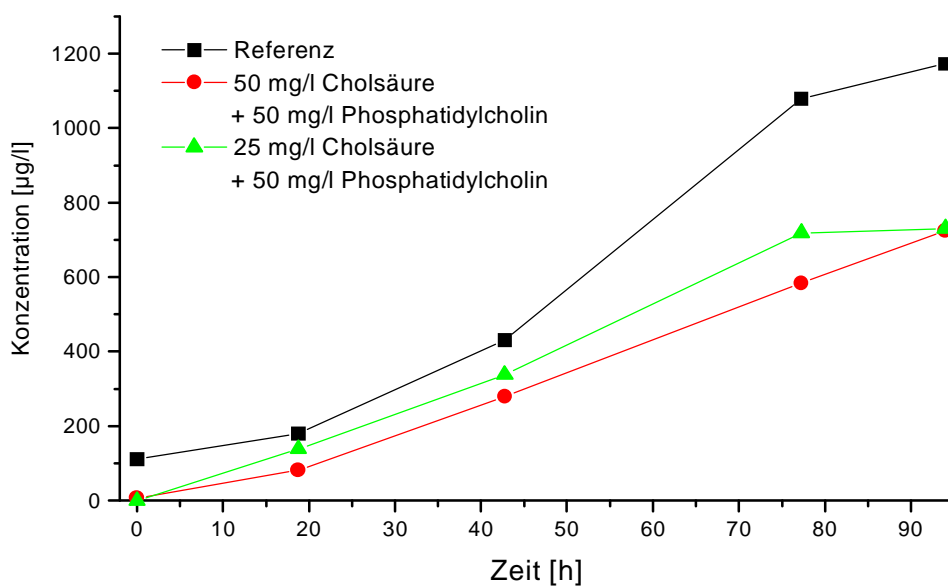


Abb. 3.91 t-PA Konzentration von CHPC01

Im Gegensatz zur Proteinkonzentration ist die t-PA-Konzentration in den einzelnen Kulturen unterschiedlich (vgl. Abb. 3.91). Die geringste Konzentration weist Kultur 50 auf. Hier beträgt die Endkonzentration $684 \mu\text{g/l}$. Die Endkonzentration der Kultur 25 ist mit $690 \mu\text{g/l}$ mit der von Kultur 50 äquivalent. Die Konzentrationen der Kultur 25 liegen jedoch von der 19. bis zur 77. Stunde um 56 bis $158 \mu\text{g/l}$ höher als die der Kultur 50. Die t-PA-Konzentrationen der substituierten Kulturen nehmen linear zu. Die Konzentration in der Referenz nimmt demgegenüber exponentiell zu. Es wird eine Endkonzentration von $1132 \mu\text{g/l}$ erreicht. Die geringeren Konzentrationen in den substituierten Kulturen sind bei Kultur 50 auf die geringen Lebendzellzahlen und bei Kultur 25 vermutlich auf den Einfluss des PCs zurückzuführen, wenn mit den Ergebnissen der Kurz- und Langzeit-Experimente des PCs verglichen wird (s. Abb. 3.57 u. 3.60).

Die t-PA-Produktionsraten der substituierten Kulturen sind bis zur 43. Stunde höher als die der Referenz, nehmen aber wie diese zum Kultivierungsende ab. Die anfangs höheren Raten können ebenfalls durch eine vermehrte Zellyse der Zellen in den substituierten Kulturen gegenüber der Referenz erklärt werden.

Die Aminosäure-Konzentrationen der Referenz und von Kultur 25 sind vergleichbar (Daten s. Anhang). Die Konzentrationen der Kultur 50 weichen aufgrund der geringeren Lebendzellzahlen von diesen ab. So erreichen die einzelnen Aminosäuren ihre Konzentrationsmaxima und -minima erst zu späteren Zeitpunkten.

Die Kulturen dieser Kultivierungsreihe unterscheiden sich in folgenden Punkten deutlich. Die substituierten Kulturen besitzen eine anfänglich hohe Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate und eine geringere Vitalität über die gesamte Beobachtungszeit als die Referenz. Kultur 50 erreicht nur geringe Lebendzellzahlen. Die Wachstumsrate ist gering und steigt nur langsam. Die Konzentrationen der Aminosäuren sind daraufhin zu späteren Zeitpunkten höher als die der Referenz. Die Kulturen 25 und 50 besitzen eine anfänglich höhere t-PA-Produktionsrate in Bezug auf die Referenz. Aufgrund dieser Differenzen ist ein Vergleich zwischen Kultur 50 und den anderen beiden Kulturen in den Kurzzeit-Scherexperimenten nur unter Beachtung des jeweiligen Zustandes möglich.

Es werden drei **Kurzzeit-Scherexperimente** durchgeführt. Die Überlebensraten und Schubspannungen sind in Tab. 3.87 zusammengefasst. Es ergibt sich dabei eine Überlebensrate von 13% für die Referenz und von 17% für Kultur 25. Die in der Kultivierungsreihe ermittelte Ähnlichkeit der Referenz und der Kultur 25 bleibt hier für die Überlebensraten weiter bestehen. Die Schubspannungen der Kulturen differieren mit $1,9 \text{ N/m}^2$ für die Kultur 50 sowie Referenz und mit $1,8 \text{ N/m}^2$ für Kultur 25 nur gering. Dieser geringe Unterschied könnte auch der Grund für die um 4% höhere Überlebensrate der Kultur 25 gegenüber der Referenz sein.

Die Überlebensrate der Kultur 50 ist mit 32% unerwartet hoch. Wie schon in Experimenten mit PC und Cholsäure festgestellt werden konnte, bedeutet ein geringes Zellwachstum nicht unbedingt eine geringe Überlebensrate. Zwei verschiedene

	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
Überlebensrate R_s [%]	13	32	17
Schubspannung τ [N/m^2]	1,9	1,9	1,8

Tab. 3.87 Überlebensrate und Schubspannung von CHPC01

Änderung der/des	Referenz	Kultur 50	Kultur 25
... Totzellzahl [10^4 Ze/ml]	-1	-1	-2
... Lebendzellzahl [10^4 Ze/ml]	-25	-15	-18
... Gesamtzellzahl [10^4 Ze/ml]	-26	-16	-20
... Vitalität [%]	-47	-26	-35
... Ammoniumkonzentration [mg/l]	0	5	-1
... Proteinkonzentration [mg/l]	11	17	14
... relativen LDH-Wertes [U/l]	116	93	39

Tab. 3.88 gemittelte Analysenwerte von CHPC01

Erklärungen sind für dieses Phänomen denkbar. Einerseits könnte die höhere Überlebensrate darauf beruhen, dass aufgrund von ungünstigen Bedingungen und geringer Vitalität vermehrt die Enzyme zur Reparatur der Zellen vorhanden sind. Diese können dann die im Scherexperiment auftretenden Schäden schnell reparieren, ohne dass die Zelle erst ihre Produktion initiieren müsste. Auf diese Weise wäre eine höhere Überlebensrate möglich. Andererseits haben die Zellen in Kulturen mit geringem Zellwachstum die gleiche Energie zur Verfügung wie die Zellen schneller wachsender Kulturen. Da sie diese Energie nicht zur Zellteilung verwenden, können sie sie in anderen Bereichen einsetzen, bspw. zur Aufrechterhaltung des Schutzes der Zellen. Auf diese Weise wären die Zellen im Scherexperiment ebenfalls resistenter als schnell wachsende Kulturen.

In Tab. 3.88 zeigen die Änderungen der Lebend- und Gesamtzellzahl, dass diese Zellzahlen in Kultur 50 in Bezug auf die beiden anderen Kulturen nur gering abnehmen. Auch die Vitalität sinkt nur um 26 % gegenüber einer Abnahme um 47 % in der Referenz und um 35 % in Kultur 25. Kultur 50 zeigt die größte Zunahme der Ammoniumkonzentration auf. Das bedeutet, dass die Zellen, neben dem durch die Reaktion auf den Scherstress produziertem Ammonium, während des Scherexperiments in der Lage sind, Stoffwechsel zu betreiben. Die zwischen der Referenz und der Kultur 25 liegende Differenz bei der Änderung des relativen LDH-Wertes kann durch einen unterschiedlichen LDH-Gehalt in den Zellen verursacht sein.

Die Kombination von Cholsäure und Phosphatidylcholin hat keine positiven Auswirkungen auf die Überlebensraten, sieht man von der durch die geringe Lebendzellzahl beeinflussten Überlebensrate der Kultur 50 ab. Die Kulturen werden durch das Additiv PC stark beeinflusst und sind in Bezug auf die Referenz hinsichtlich der t-PA-Produktion besonders benachteiligt. Durch den vorwiegenden Einfluss des PCs erreichen die Überlebensraten auch nicht die Werte der Überlebensraten der Cholsäure-Kurzzeit-Experimente. Dadurch, dass die Cholsäure die Lipidzusammensetzung

beeinflusst und sich PC vermehrt in die Membran einlagern könnte, ist kein Vorteil anhand gesteigener Überlebensraten für die Zellen entstanden. Vielmehr scheinen sich die Effekte von Cholsäure und PC in Kultur 25 gegenseitig aufzuheben, so dass eine der Referenz vergleichbare Überlebensrate resultiert. Für Kultur 50 werden als Ursache der erhöhten Überlebensraten die geringen Zellzahlen vermutet. Ob sich auch hier die Effekte der beiden Additive aufgehoben hätten, bleibt unbeantwortet. Allgemein ist die Kombination für weitere Scherexperimente nicht zu empfehlen, da sich die Überlebensraten der einzelnen Additive nicht wie erhofft addiert haben.

3.2.3.1 Fazit der Kombinations-Scherexperimente

	Konzentration [mg/l]	$\overline{\Delta R_s}$ [%]	$\Delta\tau$ [N/m ²]	τ [N/m ²]
Gruppe I Cholesterin				
Kurzzeit-Experiment	100	+19	0,0	1,9
Kurzzeit-Experiment	125	+19	-0,1	1,8
Gruppe II Cholsäure				
Kurzzeit-Experiment	25	+44	0,0	1,9
Kurzzeit-Experiment	50	+26	0,0	1,9
Gruppe III Phosphatidylcholin				
Kurzzeit-Experiment	25	+14	0,0	1,8
Kurzzeit-Experiment	50	+3	+0,2	2,0
Kombinationsexperimente				
Cholsäure/Cholesterin	25/125	+7	0,0	1,9
Cholsäure/Cholesterin	50/125	+7	0,0	1,9
Cholsäure/Phosphatidylcholin	25/50	+4	-0,1	1,8
Cholsäure/Phosphatidylcholin	50/50	+19	0,0	1,9

Tab. 3.89a Fazit der Kombinationsexperimente

In Tab. 3.89a sind die Änderungen der Überlebensraten der Additive ($\overline{\Delta R_s}$ [%]) und der Schubspannungen ($\Delta\tau$ [N/m²]) zusammengefasst. Sie ergeben sich aus der Differenz zwischen den Werten der substituierten Kulturen und der Referenz. Außerdem sind die absoluten Schubspannungen der substituierten Kulturen (τ [N/m²]) angegeben.

Aus dem Vergleich der absoluten Überlebensraten der Kombinationsexperimente und der Experimente der einzeln zugesetzten Additive, können durchweg höhere Überlebensraten für die Experimente der einzeln zugesetzten Additive festgestellt werden.

Im Kombinationsexperiment von Cholsäure mit Cholesterin verstärkt sich der positive Einfluss der beiden Additive nicht. Die absolute Überlebensrate sinkt gegenüber den einzelnen Kurzzeit-Experimenten um 13 bis 44 %. Sie ähnelt mehr den Überlebensraten der Cholesterin-Experimente, was wahrscheinlich durch den vorherrschenden Einfluss von Cholesterin auf die Kultur bedingt ist. Auch die Änderung der Überlebensraten in Bezug auf die Referenz (vgl. Tab. 3.89a) nimmt ab. Ebenso verrin-

	R_s (Cholesterin 125 zu Referenz)	R_s (Cholsäure 25 zu Referenz)	R_s (Cholsäure 50 zu Referenz)	R_s (PC 50 zu Referenz)
R_s (Cholesterin 125 zu Referenz)	1,8	1,2	1,2	--
R_s (Cholsäure 25 zu Referenz)	1,2	2	--	1,3
R_s (Cholsäure 50 zu Referenz)	1,2	--	1,6	2,5
R_s (PC 50 zu Refe- renz)	--	1,3	2,5	1,1

Tab. 3.89b Verhältnis der Überlebensraten zur jeweiligen Referenz bei verschiedenen Additiv-Kombinationen

gert sich das Verhältnis der Überlebensrate der substituierten Kulturen zur Referenz um bis zu 0,8 (40 %) auf 1,2 (vgl. Tab. 3.89b). Vermutlich kann sich durch die Anwesenheit des Cholesterins die Wirkung der Cholsäure auf die Zellen nicht entfalten, so dass nur der Einfluss des Cholesterins auf die Zellen wirkt. Dadurch erklärt sich auch, dass die Überlebensraten der einzelnen Cholsäure-Experimente nicht erreicht werden können.

Im anderen Kombinationsexperiment von Cholsäure mit PC nimmt das Verhältnis in Bezug auf das PC um bis zu 1,4 (127 %) zu (vgl. Tab. 3.89b). Es zeigt sich also ein positiver Einfluss der Cholsäure. Es werden jedoch auch hier nicht die absoluten Überlebensraten der einzelnen Experimente erreicht. Werden die Verhältnisse in Bezug auf die Cholsäure-Konzentrationen betrachtet, so zeigt sich für das Kombinationsexperiment mit 25 mg/l eine Abnahme um 0,7 (35 %) und für 50 mg/l eine Zunahme um 0,9 (56 %). Die Abnahme kann mit einer vermehrten Einlagerung von PC in die Zellmembran erklärt werden, die zu einer Destabilisierung und damit zu einer Erhöhung der Scherempfindlichkeit führt. Die Überlebensrate nimmt ab. Die Zunahme bei einer höheren Konzentration von Cholsäure ist wahrscheinlich durch eine vermehrte Einlagerung der Cholsäure in die Zellmembran bedingt, die mit der bereits eingelagerten Menge an PC das richtige Mischungsverhältnis für eine besser stabilisierte Membran ergibt.

In den Kombinationsexperimenten dominiert das Additiv die Überlebensraten der substituierten Kulturen, welches in der gemeinsamen Kultivierung die Zellen vorherrschend beeinflusst. Eine Addition der einzelnen Überlebensraten wird nicht erzielt, da sich die Additive gegenseitig beeinflussen. Für bestimmte Kombinationen lassen sich Vorteile erzielen.

4 Zusammenfassung

4.1 Kurzzeit-Scherexperimente

Die in den Experimenten ermittelten Schubspannungen sind im Vergleich zu den von Reich ermittelten Werten (Reich 1996) höher als erwartet. In ihrer Diplomarbeit sind folgenden Einstellungsstufen des Viskosimeters nachfolgenden Schubspannungen zuzuordnen: Stufe 9 \rightarrow 0,3 N/m², Stufe 13 \rightarrow 1,3 N/m², Stufe 14 \rightarrow 1,8 N/m² und Stufe 15 \rightarrow 2,6 N/m². Der Einstellungsstufe 12 entspricht demnach eine Schubspannung zwischen 0,3 und 1,3 N/m². Die Schubspannung der Stufe 12, der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente, liegt zwischen 1,5 und 2,3 N/m². Der über alle durchgeführten Versuche gemittelte Wert beträgt 1,9 N/m². Aufgrund der verschobenen Zuordnung Einstellungsstufe \rightarrow Schubspannung können die bei gleicher Einstellung ermittelten Überlebensraten nicht verglichen werden. Es erfolgt statt dessen ein Vergleich bei gleicher Schubspannung.

Ein Vergleich der Überlebensraten der Referenz dieser Arbeit mit denen von Reich ergibt, bei einer mittleren Schubspannung von 1,9 N/m², eine mittlere Überlebensrate von 27 % bei 3 h Versuchsdauer gegenüber einer berechneten Überlebensrate von 34 % bei 2 h Versuchsdauer bei Reich. In Anbetracht des Unterschiedes der Versuchsdauer, können die Überlebensraten für die Referenz als äquivalent angesehen werden. Jedoch nicht so die Überlebensraten der Cholesterin-Kulturen. Die von Reich ermittelten Überlebensraten für Konzentrationen von 200 mg/l Cholesterin liegen bei 106 % nach 2 h Versuchsdauer und bei 154 % nach 5 h Versuchsdauer. Verglichen mit diesen Werten ist die Überlebensrate der Cholesterin-Kulturen der vorliegenden Arbeit mit maximal 52 % nach 3 h Versuchsdauer (s. Tab. 3.7) gering. Eventuell ist durch die Verwendung der Zelllinie CHO t-PA ein von der bei Reich verwendeten Zelllinie CHO AT-III abweichender Aufnahmemodus des Cholesterins aufgrund einer Mutation entstanden. Infolgedessen wird, auch in Anbetracht der geringeren Konzentration, weniger Cholesterin eingelagert als bei Reich und die Zellen erreichen somit nicht die Stabilität der CHO AT-III Zellen. Die geringe Konzentrationsänderung des Cholesterins in den Versuchen dieser Arbeit (s. Kap. 3.2.1.1ff.) erhärtet diese Vermutung, so dass von einer geringeren Aufnahme des Cholesterins in die Zellen ausgegangen werden kann. Die geringere Überlebensrate kann aber auch auf der Verwendung eines anderen Zellkulturmediums beruhen. Das bei Reich verwendete Medium setzt sich aus 50 % Excell 301, 25 % IMDM und 25 % Ham's F12 zusammen und enthält damit einen hohen Proteinanteil. Dieser kann, wie in einigen Untersuchungen festgestellt wurde den Scherstress für Zellen mindern und so die Überlebensrate erhöhen (Papoutsakis 1991, Michaels et al. 1995a, Chattopadhyay et al. 1995).

Von den in den Kurzzeit-Experimenten getesteten Additiven haben sich nur einige als wirkungsvolle Substanzen erwiesen. Diese sind in der Lage, die Scherempfindlichkeit der Zellen zu reduzieren (s. Kap. 3.2.1). Zu diesen gehören Cholesterin, Cholsäure, Testosteron und Retinol. Ihnen gemeinsam ist die gegenüber der Referenz erhöhte Überlebensrate der Kulturen. Die höchsten Überlebensraten weist die Cholsäure auf, deren Raten mit 15 bis 44 % über denen der Referenz liegen (s. Tab. 3.66). Dabei ist eine Abnahme der Überlebensraten und damit der Wirkung des Additivs mit Erhöhung der Konzentration zu verzeichnen. Die höheren Konzentrationen der Cholsäure wirken nicht toxisch, was die Abnahme der Überlebensraten erklärt hätte. Sie beeinflussen die Zellen aber in der Weise, dass ihre Scherempfindlichkeit zunimmt. Denkbar ist eine Versteifung der Membran durch die Einlagerung von Cholsäure, die bei zu hoher Konzentration zu inflexibel und damit scherempfindlicher wird. Die Konzentration, bei der die Flexibilität der Zellmembran zu gering wird, liegt zwischen 25 und 50 mg/l.

Ähnlich der Cholsäure nimmt die Differenz der Überlebensrate in Bezug auf die Referenz bei der Deoxycholsäure ab. Sie liegt um 35 % bei 4 mg/l und um 23 % bei 10 mg/l über der Überlebensrate der Referenz. Auch hier ist die gleiche Erklärung wie bei der Cholsäure denkbar, da keine Beeinflussung der Vitalität oder der Wachstumsrate vorliegt (s. Kap. 3.2.1.2).

Ebenso besitzt in den Testosteron-Experimenten die höher substituierte Kultur die geringere Überlebensrate gegenüber der Referenz. Es ergibt sich bei 150 mg/l eine Differenz von +23 % und bei 75 mg/l von +57 % zur Referenz. Da die Referenz im weiteren Experimentverlauf nicht mehr zum Vergleich bereit steht, können die ermittelten Daten nur unter Vorbehalt verwendet werden. Es kann nur auf die Langzeit-Kultivierungsreihe verwiesen werden (s. Kap. 3.2.1.3). In dieser ist ein Einfluss der Testosteron-Konzentration auf das Zellwachstum eindeutig zu erkennen. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass mit der Höhe der Konzentrationen auch der auf die Zellen nachteilig wirkende Einfluss zunimmt und sich so die abnehmende Überlebensrate erklärt.

Beim Retinol zeigt sich mit der Zunahme der Konzentration eine Zunahme der Überlebensrate. Die Retinol-Konzentration von 10 mg/l verzeichnet mit +48 % die höchste Differenz der drei eingesetzten Konzentrationen zur Referenz. Weil bei dieser Konzentration jedoch das Zellwachstum sowie die Vitalität beeinträchtigt werden, ist diese Konzentration als Zusatz für eine Kultivierung nicht geeignet. Die beiden geringeren Konzentrationen von 2,5 und 5 mg/l besitzen mit einer Differenz von 22 und 24 % zur Überlebensrate der Referenz immer noch ein großes Potential, um die Scherempfindlichkeit zu senken. Gleichzeitig ist ihr Einfluss auf die Zellen der Kulturen geringer (s. Kap. 3.2.1.3). Um die größtmögliche Sicherheit zu haben, dass die Zellen nicht durch das Retinol beeinträchtigt werden, ist eine Konzentration von 2,5 mg/l der von 5 mg/l bei Kultivierungen vorzuziehen.

Die beiden Additive der Gruppe IV haben praktisch keinen Einfluss auf die Überle-

bensraten der Kulturen (s. Kap. 3.2.1.4). Die Additive besitzen ein Ringgerüst aus substituierten Cyclohexanen. Aufgrund ihrer Struktur und ihres nicht natürlichen Vorkommens in Zellen können sie von ihnen nicht aufgenommen werden. Eine Einlagerung in die Zellmembran ist nicht möglich. Ihre Wirkung beschränkt sich auf die Komplexierung von Stoffwechselmetaboliten. Diese Wirkung trägt den Ergebnissen nach zu urteilen nicht dazu bei, die Scherempfindlichkeit der Zellen zu senken. Eine Möglichkeit die Scherempfindlichkeit dennoch zu reduzieren, wird in der direkten Zugabe von Cyclodextrin zum Schermedium vermutet. Aufgrund der Größe des Moleküls könnte das Cyclodextrin als eine Art Stoßdämpfer zwischen den Zellen fungieren, was auch als Grund für die hohe Überlebensrate der Kultur 100 im Experiment mit β -CD vermutet wird.

Von den eingesetzten Additiven werden wegen der positiven Ergebnisse aus Gruppe I Cholesterin, aus Gruppe II Cholsäure und aus Gruppe III Testosteron und Retinol zu Langzeit-Experimenten eingesetzt. Außerdem wird trotz der ungünstigen Ergebnisse Phosphatidylcholin eingesetzt, da es neben Cholesterin das einzige in Zellmembranen vorkommende Additiv ist.

4.2 Langzeit-Scherexperimente

In den Langzeit-Experimenten stellen sich nur das mit 100 mg/l eingesetzte Cholesterin und die mit 25 mg/l eingesetzte Cholsäure als potentiellen Additive zur Scherstressminderung heraus. Nun könnte vermutet werden, dass es an der mit den Kurzzeit-Experimenten vergleichbaren Schubspannung liegt. Die mittlere Schubspannung aller Additive in den Kurzzeit-Experimenten beträgt $1,9 \text{ N/m}^2$. In den Langzeit-Experimenten beträgt sie dagegen $2,1 \text{ N/m}^2$. Die Schubspannung der Referenz erhöht sich gering mit der Dauer des Experiments von $1,9 \text{ N/m}^2$ in den Kurzzeit-Experimenten auf $2,0 \text{ N/m}^2$ in den Langzeit-Experimenten. Dagegen erhöht sich die Schubspannung der Kulturen mit 100 mg/l Cholesterin-Zusatz nicht, ebensowenig wie die mit 25 mg/l Cholsäure versetzten Kulturen.

Die mittlere Schubspannung der Langzeit-Experimente ist also um $0,2 \text{ N/m}^2$ höher als die der Kurzzeit-Experimente. Die Schubspannung der Referenz nimmt jedoch ebenfalls zu, so dass der Unterschied zwischen den Schubspannungen der substituierten Kulturen und der Referenz maximal $\pm 0,1 \text{ N/m}^2$ beträgt. Aus diesem Grund sollten den Kurzzeit-Experimenten vergleichbare Ergebnisse ermittelt werden können. Eine Ausnahme bilden Retinol mit einer Differenz von $+0,4 \text{ N/m}^2$ und die mit 50 mg/l Cholsäure substituierte Kultur mit $+0,3 \text{ N/m}^2$. In diesen beiden Fällen kann von einer höheren Belastung der Zellen als in der Referenz ausgegangen werden, die zu einer geringeren Überlebensrate als in den Kurzzeit-Experimenten führt.

In den Experimenten von PC und Testosteron ist dies nicht der Fall. Hier ist das zugesetzte Additiv eindeutig unwirksam in Bezug auf eine Scherreduzierung, da die Überlebensraten unter denen der Referenz liegen. Für PC bestätigen sich damit die

ungünstigen Ergebnisse der Kurzzeit-Experimente, da die Überlebensraten mit 8 bis 10 % unter denen der Referenz liegen. Die Überlebensraten des Testosterons im Langzeit-Experiment sind denen der Referenz dagegen sehr ähnlich und weichen von ihnen nur um 1 bis 3 % ab. Das Testosteron beeinträchtigt die Überlebensrate der Zellen im Gegensatz zum PC nicht negativ. Dies liefert für die bislang nicht eindeutig zu bewertenden Ergebnisse des Kurzzeit-Experiments von Testosteron den Hinweis darauf, dass die für ein Scherexperiment eingesetzte Referenz nicht zum Vergleich geeignet ist. Bei den Kurzzeit-Experimenten kann aufgrund der Ergebnisse des Langzeit-Experiments ebenfalls von einer mit der Referenz vergleichbaren Überlebensrate ausgegangen werden.

Die der Referenz gegenüber erhöhten Überlebensraten von 100 mg/l Cholesterin und 25 mg/l Cholsäure können auf die Einlagerung der beiden Substanzen in die Zellmembran zurückgeführt werden. Diese Stabilisierung kann die Scherempfindlichkeit der Zellen auch über einen längeren Zeitraum senken. Die Überlebensraten reichen mit 66 % für Cholsäure (Kurzzeit: 88 %) und mit 23 % für Cholesterin (Kurzzeit: 53 %) nicht an die der Kurzzeit-Experimente heran. Allgemein wird mit der Erhöhung der Scherdauer von drei auf 24 Stunden eine Abnahme der Überlebensraten in allen getesteten Kulturen bis zu 37 % festgestellt. Demnach können nur die Additive mit einer mindestens 40 %igen Überlebensrate in den Kurzzeit-Experimenten auch in den Langzeit-Experimenten ein Überleben der Zellen garantieren.

4.3 Temperatur-Scherexperimente

Bei den Temperatur-Experimenten ist ebenso wie bei den Langzeit-Experimenten eine Erhöhung der Schubspannung festzustellen. Die Schubspannung der Referenz nimmt im Durchschnitt gering von $1,9 \text{ N/m}^2$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $2,0 \text{ N/m}^2$ bei $31 \text{ }^\circ\text{C}$ zu. Die mittlere Schubspannungen der eingesetzten Additive nimmt um $0,2 \text{ N/m}^2$ auf $2,1 \text{ N/m}^2$ zu. Dabei sind Abweichungen der Schubspannungen von der Referenz bei den Temperatur-Experimenten bis $0,4 \text{ N/m}^2$ vorhanden, die aber wie bei den Retinol-Experimenten nicht unbedingt eine geringere Überlebensrate zur Folge haben müssen. Die geringste Zunahme tritt bei den Cholsäure-Kulturen auf. Sie erzielen mit Überlebensraten von 20 bis 49 % über denen der Referenz immer noch sehr hohe Werte.

Wie schon in Kap. 3.2.2.4 erwähnt, widerspricht die Erhöhung der Schubspannungen und damit die höhere Belastung bei geringerer Schertemperatur den Literaturangaben. Denkbar ist die Annahme, dass aufgrund der Temperaturabsenkung die erhöhte Viskosität des Mediums zu höheren Schubspannungen führt. Der durch die Additive ausgelöste Flexibilitätsverlust der Zellen würde ebenfalls zur Erhöhung der Viskosität und damit auch zur Erhöhung der Schubspannung in den Experimenten beitragen.

Um die Überlebensraten dieser Experimente trotz der höheren Schubspannungen mit denen der Kultivierungen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vergleichen zu können, wurde das Verhältnis der Überlebensraten der substituierten Kulturen zur jeweiligen Referenz ermittelt (s. Tab.

80b, Kap. 3.2.2.4). In diesen Experimenten sind es nur die mit Cholsäure substituierten Kulturen, die ein höheres Verhältnis in Bezug auf die Experimente bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C aufweisen. Die Absenkung der Temperatur ist damit für sie vorteilhaft. Die Erhöhung der Scherempfindlichkeit wird wahrscheinlich durch eine Kombination der Einlagerung von Cholsäure in die Membran und Beeinflussung der Membranzusammensetzung durch die Cholsäure erzielt.

Dagegen zeigt sich bei den Cholesterin-Kulturen eine Abnahme des Verhältnisses bei abnehmender Temperatur. Es wird angenommen, dass die durch das Cholesterin erzielte Versteifung der Zellmembran bei den geringeren Temperaturen leichter zu einem Bruch der Membran führen kann. Somit hebt sich der durch Cholesterin erlangte Vorteil wieder auf und führt bei der höheren Konzentration zu einem Nachteil.

Auch bei Retinol wird eine Abnahme des Verhältnisses mit abnehmender Temperatur sichtbar. Als Erklärung dafür kann eine Abnahme der Mediatortätigkeit des Retinols mit abnehmender Temperatur angesehen werden. Die Zusammensetzung der Zellmembran kann nicht mehr positiv beeinflusst werden.

4.4 Kombinations-Scherexperimente

Die Kombination von Cholsäure mit Cholesterin zeigt keine positiven Auswirkungen auf das Verhältnis der Überlebensraten der substituierten Kulturen zur Referenz (s. Tab. 3.89b, Kap. 3.2.3.3). Vermutlich wird aufgrund der vorherrschenden Beeinflussung durch Cholesterin die Wirkung der Cholsäure auf die Zellen verhindert. Aus diesem Grund ähneln die absoluten Überlebensraten mehr denen der Experimente, bei denen das Cholesterin einzeln zugesetzt wird.

Im Fall der Kombination von Cholsäure mit Phosphatidylcholin nimmt das Verhältnis in Bezug auf die einzeln zugesetzte Cholsäure ab. Als Ursache für diese Abnahme wird die vermehrte Einlagerung von PC in die Membran durch die Gegenwart von Cholsäure angesehen. Wird dagegen das Verhältnis des PCs als Grundlage gesetzt, ist eine Zunahme desselben im Kombinations-Experiment zu beobachten. Die Cholsäure erhöht durch ihren positiven Einfluss die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen.

4.5 Fazit

Zusammenfassend haben sich folgende Additive als Scherstress mindernd erwiesen. Sie beeinflussen das Zellwachstum und den Stoffwechsel nur gering. Es sind für die Kurzzeit-Experimente aus Gruppe I Cholesterin (100 u. 125 mg/l), aus Gruppe II Cholsäure (25 u. 50 mg/l), aus Gruppe III Retinol (2,5 und 5 mg/l). Bei den Langzeit-Experimenten erweisen sich aus Gruppe I Cholesterin mit 100 mg/l und aus Gruppe II Cholsäure mit 25 mg/l als wirkungsvoll. In den Temperatur-Experimenten zeigt nur Cholsäure mit 50 mg/l aus Gruppe II eine positive Wirkung und die Kombinations-Experimente ergeben keinen Vorteil gegenüber den einzelnen Scherstressversuchen.

Ausblick

Aufgabenstellung war es, eine geeignete Substanz zu ermitteln, die eine Scherreduzierung in CHO-Zellen bewirkt, ohne dass Zellwachstum oder den Stoffwechsel der Zellen bzw. die Produktivität in Bezug auf das Zielprotein zu beeinflussen. Außerdem soll die Substanz auf natürlichem Weg von Zellen synthetisiert werden können und es sollte kein Protein sein, da sich die Abtrennung des Zielproteins auf diese Weise erschwert. Auf das in dieser Arbeit getestete Additiv Cholsäure treffen diese Anforderungen zu.

Es ist in der vorliegenden Arbeit durch Zusatz von Cholsäure zum Kultivierungsmedium gelungen, die Scherempfindlichkeit der Zellen zu senken. Da die vorteilhafteste Konzentration nicht exakt bekannt ist und zwischen 25 und 50 µg/ml liegt, ist es sinnvoll, diese in weiteren Experimenten zu ermitteln. Die exakte Konzentration garantiert einen bestmöglichen Schutz gegen Scherstress bei gleichzeitig geringem finanziellem Aufwand. Obwohl Cholsäure ein preiswertes Produkt ist und in geringen Konzentrationen eingesetzt wird, sollte die finanzielle Seite nicht unterschätzt werden. Bei Großanlagen nehmen die Kosten für Material um ein Vielfaches gegenüber einfachen Laboranlagen zu.

Die Untersuchungen zur Dauer der Scherminderung sollten erweitert werden. In den durchgeführten Experimenten ist 24 Stunden das Maximum. Die Wirkung der Cholsäure ist über längere Zeiträume zu testen. Versuchszeiten bis zu einer Woche sind anzustreben.

Es sollte ein Scale-Up der durchgeführten Experimente vorgenommen werden. Dieses sollte zum einen für die Kultivierungen gelten zum anderen für die Versuchsanlage, mit der die Experimente durchgeführt werden. Denkbar ist auch ein Experiment in einem Bioreaktor, in welchem die normalerweise verwendete Rührerdrehzahl erhöht wird. So könnten Bedingungen erzeugt werden, die der in der Industrie ähnlicher sind, als die Versuche in Techne-Kulturflaschen.

Interessant ist eine weitere Untersuchung der anderen Gallensäuren, da sich Deoxycholsäure in sehr geringen Konzentrationen vielversprechend gezeigt hat. Eventuell haben Kombinationsexperimente der verschiedenen Gallensäuren untereinander ein positiveres Ergebnis zur Folge, als die hier durchgeführten.

Eine Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse an anderen Zelllinien ist sinnvoll. Sollten sich gleiche oder ähnliche Überlebensraten ergeben, wäre Cholsäure als ein weiteres Additiv im industriellen Maßstab geeignet und denkbar. In diesem Fall sollten Vergleiche mit dem zur Zeit häufig verwendeten Pluronic F68 vorgenommen werden. In diesen sollten die Wirkungen der Additive auf Stoffwechsel, Produktivität des Zielproteins und in wirtschaftlicher Richtung untersucht werden. Gerade weil Cholsäure

ein preiswertes Produkt ist, könnte es hier Vorteile gegenüber den herkömmlichen Additiven zur Scherstressminderung besitzen.

Eine weitere denkbare Alternative zum Einsatz der Cholsäure ist das Einpflanzen des Gens für die Cholsäure-Produktion in die gewünschte Zelllinie. Auf diese Weise würde eine ständige Zugabe zum Kultivierungsmedium entfallen. Die Kosten für die Cholsäure würden durch das einmalige Verändern der Zelllinie entfallen, da die Zellen es selbst produzieren würden. Mit dieser veränderten Zelllinie müssten erneut Experimente zur Scherstressminderung durchgeführt werden. Außerdem sollte die Cholsäure-Produktion im Experimentverlauf verfolgt werden. Auch dürfte die Cholsäure-Expression nicht die Produktion des Zielproteins in Quantität und Qualität beeinträchtigen.

Anhang

A Aminosäuren

	Zeit [h]→	0	16	40	65	88
	Amino- säure ↓					
Referenz	Asp [mg/l]	20	23	31	25	20
	Glu [mg/l]	24	31	39	27	14
	Asn [mg/l]	76	76	78	48	27
	Ser [mg/l]	87	88	97	67	53
	Gly [mg/l]	32	34	42	37	53
	Ala [mg/l]	6	8	17	20	57
	Gln [mg/l]	159	128	88	21	0
Kultur 100	Asp [mg/l]	23	26	30	31	24
	Glu [mg/l]	33	41	44	40	24
	Asn [mg/l]	88	87	78	63	37
	Ser [mg/l]	84	91	90	82	62
	Gly [mg/l]	27	32	35	40	41
	Ala [mg/l]	4	6	14	20	24
	Gln [mg/l]	177	149	106	39	4
Kultur 125	Asp [mg/l]	19	27	24	18	20
	Glu [mg/l]	24	35	29	19	16
	Asn [mg/l]	69	90	61	36	30
	Ser [mg/l]	77	101	76	52	56
	Gly [mg/l]	30	37	33	30	59
	Ala [mg/l]	5	7	12	14	65
	Gln [mg/l]	144	157	72	17	0

Tab. A1 Aminosäure-Konzentrationen von C07

	Zeit [h]→	0	17	41	66	89
	Amino- säure ↓					
Referenz	Asp [mg/l]	48	50	59	50	46
	Glu [mg/l]	27	50	64	49	36
	Asn [mg/l]	118	102	91	51	17
	Ser [mg/l]	167	145	139	90	69
	Gly [mg/l]	57	55	78	68	127
	Ala [mg/l]	0	12	47	42	27
	Gln [mg/l]	305	160	40	0	0
Kultur 100	Asp [mg/l]	46	46	58	44	38
	Glu [mg/l]	26	40	50	42	31
	Asn [mg/l]	115	98	81	48	16
	Ser [mg/l]	161	139	123	88	60
	Gly [mg/l]	51	54	64	58	67
	Ala [mg/l]	0	9	32	34	11
	Gln [mg/l]	298	172	46	0	0
Kultur 125	Asp [mg/l]	41	45	48	45	39
	Glu [mg/l]	23	38	47	43	32
	Asn [mg/l]	100	96	79	53	21
	Ser [mg/l]	133	133	117	90	64
	Gly [mg/l]	41	51	58	58	71
	Ala [mg/l]	0	8	28	21	11
	Gln [mg/l]	258	175	55	0	0

Tab. A2 Aminosäure-Konzentrationen von CV01

	Zeit [h]→	0	21	43	66	79	105	136	151
	Aminosäure ↓								
Referenz	Asp [mg/l]	44	38	36	36	33	43	21	19
	Glu [mg/l]	24	34	41	38	31	25	10	6
	Asn [mg/l]	107	91	79	65	43	3	8	6
	Ser [mg/l]	131	105	88	70	52	35	19	17
	Gly [mg/l]	60	60	68	77	82	90	91	93
	Ala [mg/l]	5	15	25	29	33	36	30	24
	Gln [mg/l]	154	110	74	52	41	39	38	36
Kultur 100	Asp [mg/l]	39	38	43	37	33	27	20	17
	Glu [mg/l]	23	30	37	37	26	17	6	3
	Asn [mg/l]	101	91	74	69	44	22	9	6
	Ser [mg/l]	121	106	92	73	51	31	16	11
	Gly [mg/l]	57	64	74	87	92	96	100	99
	Ala [mg/l]	4	13	25	30	30	29	22	17
	Gln [mg/l]	148	112	81	53	42	37	38	34

Tab. A3 Aminosäurenkonzentration von LC

	Zeit [h]→	0	24
	Amino- säure ↓		
Referenz	Asp [mg/l]	43	43
	Glu [mg/l]	25	30
	Asn [mg/l]	108	97
	Ser [mg/l]	129	120
	Gly [mg/l]	61	61
	Ala [mg/l]	4	9
	Gln [mg/l]	153	123
Kultur 100	Asp [mg/l]	45	59
	Glu [mg/l]	28	38
	Asn [mg/l]	97	77
	Ser [mg/l]	124	121
	Gly [mg/l]	57	59
	Ala [mg/l]	5	11
	Gln [mg/l]	138	118

Tab. A4 Aminosäure-Konzentration von LC, Scherexperiment

	Zeit [h]→	0	19	41	65	89
	Amino- säure ↓					
Referenz	Asp [mg/l]	44	45	46	41	48
	Glu [mg/l]	24	39	53	50	45
	Asn [mg/l]	108	113	103	78	47
	Ser [mg/l]	127	126	111	80	66
	Gly [mg/l]	55	62	72	75	84
	Ala [mg/l]	6	14	28	31	40
	Gln [mg/l]	164	145	99	64	58
Kultur 5	Asp [mg/l]	48	103	43	45	49
	Glu [mg/l]	27	103	46	53	58
	Asn [mg/l]	120	35	99	92	79
	Ser [mg/l]	144	131	109	97	84
	Gly [mg/l]	60	66	70	81	78
	Ala [mg/l]	7	16	26	36	41
	Gln [mg/l]	182	104	118	107	97
Kultur 2,5	Asp [mg/l]	45	57	45	47	47
	Glu [mg/l]	25	52	46	55	55
	Asn [mg/l]	114	91	101	91	85
	Ser [mg/l]	136	123	107	90	76
	Gly [mg/l]	64	62	69	78	88
	Ala [mg/l]	13	14	14	34	38
	Gln [mg/l]	173	130	113	95	84

Tab. A5 Aminosäure-Konzentrationen von E03

	Zeit [h]→	0	21	49	75	99		Zeit [h]→	0	20	43	68	93	122	140
	Amino- säure ↓							Amino- säure ↓							
Referenz	Asp [mg/l]	59	34	42	53	-	Referenz	Asp [mg/l]	48	43	37	37	31	22	19
	Glu [mg/l]	35	25	40	54	-		Glu [mg/l]	27	35	38	36	21	6	2
	Asn [mg/l]	133	67	75	76	-		Asn [mg/l]	122	108	86	79	53	22	11
	Ser [mg/l]	159	66	83	89	-		Ser [mg/l]	139	120	94	82	55	29	18
	Gly [mg/l]	55	35	46	55	-		Gly [mg/l]	50	52	51	63	74	75	79
	Ala [mg/l]	5	9	25	32	-		Ala [mg/l]	0	12	17	23	24	19	11
	Gln [mg/l]	251	99	64	21	-		Gln [mg/l]	189	128	54	16	0	0	0
Kultur 5	Asp [mg/l]	37	51	51	50	40	Kultur 50	Asp [mg/l]	43	40	40	36	31	25	23
	Glu [mg/l]	22	37	47	51	39		Glu [mg/l]	23	34	45	40	27	12	6
	Asn [mg/l]	81	104	88	71	48		Asn [mg/l]	107	100	91	72	49	27	17
	Ser [mg/l]	95	122	102	82	59		Ser [mg/l]	122	111	98	74	52	31	22
	Gly [mg/l]	44	46	46	50	53		Gly [mg/l]	40	43	43	46	50	56	61
	Ala [mg/l]	4	13	22	29	27		Ala [mg/l]	0	0	19	28	28	31	34
	Gln [mg/l]	217	153	84	16	5		Gln [mg/l]	167	116	55	17	0	0	0
Kultur 2,5	Asp [mg/l]	51	51	59	48	55*	Kultur 25	Asp [mg/l]	47	38	39	37	34	30	27
	Glu [mg/l]	30	37	52	46	53*		Glu [mg/l]	26	33	46	44	33	22	14
	Asn [mg/l]	116	107	99	68	61*		Asn [mg/l]	120	94	90	76	61	44	32
	Ser [mg/l]	135	124	118	77	79*		Ser [mg/l]	137	104	95	77	57	35	24
	Gly [mg/l]	46	51	57	60	73*		Gly [mg/l]	48	47	54	60	70	72	59
	Ala [mg/l]	5	22	25	32	35*		Ala [mg/l]	0	12	19	20	18	16	27
	Gln [mg/l]	153	153	78	21	5*		Gln [mg/l]	186	106	52	20	0	0	0

Tab. A6 Aminosäure-Konzentration von CH04

Tab. A7 Aminosäure-Konzentration von LCH

	Zeit [h]→	0	24
	Aminosäure ↓		
Referenz	Asp [mg/l]	42	43
	Glu [mg/l]	23	30
	Asn [mg/l]	105	104
	Ser [mg/l]	122	121
	Gly [mg/l]	44	47
	Ala [mg/l]	0	11
	Gln [mg/l]	162	138
Kultur 50	Asp [mg/l]	44	41
	Glu [mg/l]	24	26
	Asn [mg/l]	108	99
	Ser [mg/l]	126	116
	Gly [mg/l]	46	41
	Ala [mg/l]	0	10
	Gln [mg/l]	163	133
Kultur 25	Asp [mg/l]	39	42
	Glu [mg/l]	21	32
	Asn [mg/l]	96	97
	Ser [mg/l]	111	109
	Gly [mg/l]	36	48
	Ala [mg/l]	0	25
	Gln [mg/l]	147	86

Abb. A8

Aminosäure-Konzentrationen von LCH Scherexperiment

	Zeit [h]→	0	18	41	65	89		Zeit [h]→	0	17	54	65	97	
	Amino-								Amino-					
	säure ↓								säure ↓					
Referenz	Asp [mg/l]	38	40	40	40	37	Referenz	Asp [mg/l]	19	19	18	18	15	
	Glu [mg/l]	20	29	36	38	34		Glu [mg/l]	20	27	39	39	32	
	Asn [mg/l]	77	80	73	65	50		Asn [mg/l]	31	26	14	10	4	
	Ser [mg/l]	113	116	102	91	72		Ser [mg/l]	38	31	11	8	6	
	Gly [mg/l]	36	40	45	48	50		Gly [mg/l]	33	35	40	43	42	
	Ala [mg/l]	0	0	21	24	28		Ala [mg/l]	0	14	25	24	24	
	Gln [mg/l]	254	232	149	92	34		Gln [mg/l]	185	114	21	0	0	
Kultur 10	Asp [mg/l]	40	41	42	42	45	Kultur 50	Asp [mg/l]	19	20	22	21	17	
	Glu [mg/l]	21	28	37	40	43		Glu [mg/l]	19	28	47	47	38	
	Asn [mg/l]	80	80	74	67	62		Asn [mg/l]	30	27	17	14	7	
	Ser [mg/l]	120	115	102	91	83		Ser [mg/l]	39	33	16	12	7	
	Gly [mg/l]	38	41	46	48	54		Gly [mg/l]	32	36	42	43	38	
	Ala [mg/l]	0	0	20	25	23		Ala [mg/l]	0	16	25	26	22	
	Gln [mg/l]	264	229	162	118	87		Gln [mg/l]	176	118	33	22	0	
Kultur 4	Asp [mg/l]	40	38	39	41	42	Kultur 25	Asp [mg/l]	19	20	21	22	19	
	Glu [mg/l]	21	30	38	42	43		Glu [mg/l]	19	29	46	52	45	
	Asn [mg/l]	81	77	68	65	59		Asn [mg/l]	30	26	16	14	7	
	Ser [mg/l]	119	108	92	89	80		Ser [mg/l]	40	34	15	11	6	
	Gly [mg/l]	37	41	43	48	53		Gly [mg/l]	34	36	42	69	43	
	Ala [mg/l]	0	0	20	22	24		Ala [mg/l]	0	0	0	30	25	
	Gln [mg/l]	264	209	130	100	66		Gln [mg/l]	179	110	25	0	0	

Tab. A9 Aminosäure-Konzentrationen von D01

Tab. 3.A10

Aminosäure-Konzentrationen von PC01

	Zeit [h]→	0	16	36	59	85	113	140	158
	Aminosäure ↓								
Referenz	Asp [mg/l]	22	21	20	18	10	8	7	7
	Glu [mg/l]	22	34	40	29	4	1	0	0
	Asn [mg/l]	36	31	24	13	4	2	1	1
	Ser [mg/l]	46	36	25	16	10	12	6	5
	Gly [mg/l]	40	42	51	56	51	53	52	53
	Ala [mg/l]	2	5	9	13	13	6	6	3
	Gln [mg/l]	163	89	17	0	0	0	0	0
Kultur 50	Asp [mg/l]	20	19	21	19	15	8	6	7
	Glu [mg/l]	20	23	27	29	18	1	0	0
	Asn [mg/l]	33	30	24	18	9	4	3	2
	Ser [mg/l]	41	36	33	16	8	6	4	4
	Gly [mg/l]	39	44	49	59	56	58	57	63
	Ala [mg/l]	1	5	10	12	10	7	5	4
	Gln [mg/l]	155	111	30	0	0	0	0	0
Kultur 25	Asp [mg/l]	21	20	21	16	10	5	6	7
	Glu [mg/l]	21	24	29	22	5	0	0	0
	Asn [mg/l]	34	32	25	15	6	3	2	2
	Ser [mg/l]	44	38	32	16	9	5	7	5
	Gly [mg/l]	50	43	53	54	57	47	50	51
	Ala [mg/l]	2	5	10	11	11	5	4	4
	Gln [mg/l]	142	102	36	8	0	0	0	0

Tab. 3.A11 Aminosäure-Konzentrationen von LPC01

	Zeit [h]→	0	24
	Aminosäure ↓		
Referenz	Asp [mg/l]	20	20
	Glu [mg/l]	20	26
	Asn [mg/l]	33	32
	Ser [mg/l]	43	39
	Gly [mg/l]	42	44
	Ala [mg/l]	2	4
	Gln [mg/l]	141	117
Kultur 50	Asp [mg/l]	19	20
	Glu [mg/l]	18	27
	Asn [mg/l]	28	28
	Ser [mg/l]	41	38
	Gly [mg/l]	44	36
	Ala [mg/l]	4	7
	Gln [mg/l]	135	106
Kultur 25	Asp [mg/l]	19	18
	Glu [mg/l]	18	21
	Asn [mg/l]	28	26
	Ser [mg/l]	40	34
	Gly [mg/l]	39	37
	Ala [mg/l]	4	8
	Gln [mg/l]	134	99

Tab. A12 Aminosäure-Konzentrationen von LPC01, Scherexperiment

	Zeit [h]→	0	19	44	70	93
	Aminosäure ↓					
Referenz	Asp [mg/l]	24	22	--	--	--
	Glu [mg/l]	24	37	--	--	--
	Asn [mg/l]	39	30	--	--	--
	Ser [mg/l]	51	36	--	--	--
	Gly [mg/l]	45	50	--	--	--
	Ala [mg/l]	2	12	--	--	--
	Gln [mg/l]	383	248	--	--	--
Kultur 150	Asp [mg/l]	20	20	20	20	19
	Glu [mg/l]	20	28	46	57	60
	Asn [mg/l]	33	30	22	15	10
	Ser [mg/l]	42	34	18	9	6
	Gly [mg/l]	40	45	48	50	50
	Ala [mg/l]	2	10	23	30	29
	Gln [mg/l]	209	158	56	19	0
Kultur 75	Asp [mg/l]	22	20	21	20	18
	Glu [mg/l]	21	31	49	56	56
	Asn [mg/l]	35	30	22	14	9
	Ser [mg/l]	46	32	17	8	6
	Gly [mg/l]	43	47	48	50	44
	Ala [mg/l]	3	10	24	30	28
	Gln [mg/l]	213	152	43	9	0

Tab. A13 Aminosäure-Konzentrationen von T01

	Zeit [h]→	0	19	41	66	89	114	145	157
	Aminosäure ↓								
Referenz	Asp [mg/l]	21	20	19	14	12	9	9	9
	Glu [mg/l]	20	36	42	30	14	5	5	4
	Asn [mg/l]	33	26	14	4	1	0	0	0
	Ser [mg/l]	42	27	11	7	8	7	6	5
	Gly [mg/l]	40	44	47	47	38	39	36	35
	Ala [mg/l]	2	12	22	27	25	20	7	8
	Gln [mg/l]	211	93	0	0	0	0	0	0
Kultur 150	Asp [mg/l]	21	21	21	20	20	20	21	
	Glu [mg/l]	21	40	55	61	62	58	57	--
	Asn [mg/l]	35	30	22	15	11	9	7	--
	Ser [mg/l]	43	30	17	9	6	7	4	--
	Gly [mg/l]	42	51	53	56	50	49	59	--
	Ala [mg/l]	2	16	27	32	32	31	32	--
	Gln [mg/l]	220	118	37	14	0	0	0	--
Kultur 75 II	Asp [mg/l]	21	21	21	22	21	--	--	--
	Glu [mg/l]	21	28	38	48	48	--	--	--
	Asn [mg/l]	35	32	27	21	18	--	--	--
	Ser [mg/l]	44	36	27	18	15	--	--	--
	Gly [mg/l]	42	45	45	51	51	--	--	--
	Ala [mg/l]	2	9	22	32	33	--	--	--
	Gln [mg/l]	219	150	82	33	25	--	--	--
Kultur 75 I	Asp [mg/l]	21	20	21	--	--	--	--	--
	Glu [mg/l]	21	35	57	--	--	--	--	--
	Asn [mg/l]	34	29	21	--	--	--	--	--
	Ser [mg/l]	43	30	15	--	--	--	--	--
	Gly [mg/l]	43	48	52	--	--	--	--	--
	Ala [mg/l]	2	13	26	--	--	--	--	--
	Gln [mg/l]	217	123	29	--	--	--	--	--

Tab. A14 Aminosäure-Konzentrationen von LT01

	Zeit [h]→	0	24
	Aminosäure ↓		
Referenz	Asp [mg/l]	21	21
	Glu [mg/l]	21	33
	Asn [mg/l]	34	30
	Ser [mg/l]	45	38
	Gly [mg/l]	44	48
	Ala [mg/l]	3	9
	Gln [mg/l]	155	111
	Kultur 150	Asp [mg/l]	21
Glu [mg/l]		21	30
Asn [mg/l]		33	32
Ser [mg/l]		45	41
Gly [mg/l]		46	51
Ala [mg/l]		3	9
Gln [mg/l]		158	131

	Zeit [h]→	0	24
Kultur 75 II	Asp [mg/l]	21	21
	Glu [mg/l]	21	25
	Asn [mg/l]	34	33
	Ser [mg/l]	44	44
	Gly [mg/l]	46	49
	Ala [mg/l]	3	6
	Gln [mg/l]	158	143

Tab. A15 Aminosäure-Konzentrationen von LT01 Scherexperiment

	Zeit [h]→	0	19	44	70	93
	Amino- säure ↓					
Referenz	Asp [mg/l]	46	51	45	24	28
	Glu [mg/l]	26	42	37	18	10
	Asn [mg/l]	117	94	58	35	4
	Ser [mg/l]	138	118	80	48	30
	Gly [mg/l]	54	55	52	75	98
	Ala [mg/l]	6	20	37	43	42
	Gln [mg/l]	175	112	47	36	41
Kultur 5	Asp [mg/l]	42	40	38	31	25
	Glu [mg/l]	24	36	44	33	20
	Asn [mg/l]	107	99	77	51	28
	Ser [mg/l]	128	114	84	52	31
	Gly [mg/l]	67	66	77	92	98
	Ala [mg/l]	4	17	46	56	54
	Gln [mg/l]	163	119	54	46	43
Kultur 2,5	Asp [mg/l]	41	39	37	28	26
	Glu [mg/l]	23	35	41	30	22
	Asn [mg/l]	103	93	73	50	34
	Ser [mg/l]	123	105	81	49	33
	Gly [mg/l]	63	59	71	73	100
	Ala [mg/l]	5	17	41	45	47
	Gln [mg/l]	158	107	49	39	45

Tab. A16 Aminosäure-Konzentrationen von R05

	Zeit [h]→	0	24
	Amino- säure ↓		
Referenz	Asp [mg/l]	38	39
	Glu [mg/l]	20	32
	Asn [mg/l]	155	145
	Ser [mg/l]	111	106
	Gly [mg/l]	34	35
	Ala [mg/l]	0	11
	Gln [mg/l]	236	178
Kultur 5	Asp [mg/l]	37	38
	Glu [mg/l]	20	28
	Asn [mg/l]	153	151
	Ser [mg/l]	109	111
	Gly [mg/l]	33	35
	Ala [mg/l]	0	0
	Gln [mg/l]	225	195

	Zeit [h]→	0	23	46	70	94	120	145
	Amino- säure ↓							
Referenz	Asp [mg/l]	41	36	37	36	28	17	14
	Glu [mg/l]	22	33	40	38	26	5	1
	Asn [mg/l]	82	70	62	52	32	12	5
	Ser [mg/l]	120	98	88	82	57	39	23
	Gly [mg/l]	34	34	39	43	46	47	51
	Ala [mg/l]	0	8	13	22	26	29	20
	Gln [mg/l]	198	122	50	15	0	0	0
Kultur 5	Asp [mg/l]	38	38	38	39	39	39	37
	Glu [mg/l]	21	29	39	46	50	49	43
	Asn [mg/l]	77	77	70	66	57	49	40
	Ser [mg/l]	112	109	99	93	81	69	56
	Gly [mg/l]	33	36	39	42	45	49	51
	Ala [mg/l]	0	0	17	20	17	16	23
	Gln [mg/l]	184	151	100	72	41	25	17
Kultur 2,5	Asp [mg/l]	38	38	38	37	34	26	18
	Glu [mg/l]	20	36	44	43	39	19	5
	Asn [mg/l]	76	73	64	56	42	25	13
	Ser [mg/l]	110	102	89	79	61	45	31
	Gly [mg/l]	33	36	38	41	48	51	53
	Ala [mg/l]	0	15	19	23	27	29	30
	Gln [mg/l]	184	126	60	24	0	0	0

Tab. A17 Aminosäure-Konzentrationen von LR

	Zeit [h]→	0	24
Kultur 2,5	Asp [mg/l]	37	39
	Glu [mg/l]	19	26
	Asn [mg/l]	148	150
	Ser [mg/l]	107	112
	Gly [mg/l]	33	36
	Ala [mg/l]	0	11
	Gln [mg/l]	231	203

Tab. A17 Aminosäure-Konzentrationen von LR, Scherexperiment

		Zeit [h]→				
		0	16	42	66	91
		Aminosäure ↓				
Referenz	Asp [mg/l]	43	48	41	38	37
	Glu [mg/l]	23	36	45	44	39
	Asn [mg/l]	104	116	90	72	55
	Ser [mg/l]	120	130	99	78	62
	Gly [mg/l]	42	49	46	50	56
	Ala [mg/l]	0	16	22	23	25
	Gln [mg/l]	165	151	64	23	0
Kultur 100	Asp [mg/l]	41	38	37	35	41
	Glu [mg/l]	22	31	44	44	46
	Asn [mg/l]	102	93	80	65	60
	Ser [mg/l]	117	103	87	70	67
	Gly [mg/l]	41	42	43	48	65
	Ala [mg/l]	0	16	23	25	29
	Gln [mg/l]	162	118	54	22	14
Kultur 75	Asp [mg/l]	40	36	41	40	39
	Glu [mg/l]	22	30	51	53	48
	Asn [mg/l]	101	89	88	76	61
	Ser [mg/l]	116	98	96	84	70
	Gly [mg/l]	41	41	47	51	52
	Ala [mg/l]	0	15	23	24	23
	Gln [mg/l]	161	110	58	30	17

Tab. A18 Aminosäure-Konzentrationen von β -CD01

		Zeit [h]→				
		0	19	47	66	92
		Aminosäure ↓				
Referenz	Asp [mg/l]	40	38	36	35	26
	Glu [mg/l]	21	29	37	32	19
	Asn [mg/l]	79	76	66	56	34
	Ser [mg/l]	119	108	87	72	44
	Gly [mg/l]	36	40	49	49	50
	Ala [mg/l]	0	13	28	32	36
	Gln [mg/l]	265	210	98	39	0
Kultur 100	Asp [mg/l]	39	34	33	31	24
	Glu [mg/l]	21	27	33	29	16
	Asn [mg/l]	78	69	60	52	33
	Ser [mg/l]	117	99	79	67	45
	Gly [mg/l]	36	37	41	45	53
	Ala [mg/l]	0	13	26	33	37
	Gln [mg/l]	259	187	88	42	0
Kultur 75	Asp [mg/l]	40	36	35	32	--
	Glu [mg/l]	21	29	38	33	--
	Asn [mg/l]	79	71	65	57	--
	Ser [mg/l]	117	100	83	66	--
	Gly [mg/l]	35	36	44	58	--
	Ala [mg/l]	0	15	28	32	--
	Gln [mg/l]	261	189	96	52	--

Tab.A19 Aminosäure-Konzentrationen von M-CD01

		Zeit [h]→				
		0	19	42	68	91
		37 °C			31 °C	
		Aminosäure ↓				
Referenz	Asp [mg/l]	21	21	19	17	15
	Glu [mg/l]	21	40	42	33	28
	Asn [mg/l]	34	26	13	5	3
	Ser [mg/l]	42	29	13	10	8
	Gly [mg/l]	36	41	45	44	43
	Ala [mg/l]	0	22	29	33	36
	Gln [mg/l]	214	96	0	0	0
Kultur 125	Asp [mg/l]	20	20	18	17	16
	Glu [mg/l]	20	40	45	43	39
	Asn [mg/l]	32	26	11	5	3
	Ser [mg/l]	39	29	10	9	8
	Gly [mg/l]	34	39	42	49	50
	Ala [mg/l]	0	0	22	22	22
	Gln [mg/l]	198	104	0	0	0

		Zeit [h]→				
		0	19	42	68	91
		37 °C			31 °C	
		Aminosäure ↓				
Kultur 100	Asp [mg/l]	18	21	21	22	20
	Glu [mg/l]	19	38	45	48	46
	Asn [mg/l]	30	27	17	11	6
	Ser [mg/l]	37	28	16	13	8
	Gly [mg/l]	32	39	41	46	48
	Ala [mg/l]	0	15	27	33	34
	Gln [mg/l]	185	108	29	0	0

Tab. A20 Aminosäure-Konzentrationen von CT01

		Zeit [h]→				
		0	18	44	68	92
		37 °C			31 °C	
Amino- säure ↓						
Referenz	Asp [mg/l]	20	20	24	26	26
	Glu [mg/l]	20	29	48	52	51
	Asn [mg/l]	32	27	21	18	15
	Ser [mg/l]	40	31	19	18	16
	Gly [mg/l]	34	35	43	47	46
	Ala [mg/l]	0	14	25	32	33
	Gln [mg/l]	194	123	52	36	25
Kultur 50	Asp [mg/l]	18	20	22	22	26
	Glu [mg/l]	18	27	39	40	47
	Asn [mg/l]	29	27	22	18	17
	Ser [mg/l]	37	32	21	16	17
	Gly [mg/l]	31	35	38	39	44
	Ala [mg/l]	0	13	20	23	21
	Gln [mg/l]	180	130	65	45	37
Kultur 25	Asp [mg/l]	20	21	24	24	24
	Glu [mg/l]	20	30	46	49	50
	Asn [mg/l]	32	27	22	19	17
	Ser [mg/l]	40	32	21	17	14
	Gly [mg/l]	33	36	42	43	43
	Ala [mg/l]	0	14	22	26	26
	Gln [mg/l]	194	120	58	43	34

Tab. A21 Aminosäure-Konzentrationen von CHT01

		Zeit [h]→				
		0	12	37	62	85
Amino- säure ↓						
Referenz	Asp [mg/l]	20	20	26	29	26
	Glu [mg/l]	20	32	62	69	57
	Asn [mg/l]	32	30	26	17	10
	Ser [mg/l]	43	38	30	17	11
	Gly [mg/l]	45	46	49	52	48
	Ala [mg/l]	2	3	10	18	23
	Gln [mg/l]	319	262	172	67	15
Kultur 50	Asp [mg/l]	20	21	22	29	29
	Glu [mg/l]	20	31	47	64	63
	Asn [mg/l]	33	31	20	15	8
	Ser [mg/l]	45	39	27	19	13
	Gly [mg/l]	46	49	42	52	54
	Ala [mg/l]	2	3	8	15	21
	Gln [mg/l]	334	273	132	58	10

		Zeit [h]→				
		0	20	44	68	93
Amino- säure ↓						
Referenz	Asp [mg/l]	23	21	21	23	24
	Glu [mg/l]	23	31	44	50	54
	Asn [mg/l]	37	31	24	20	16
	Ser [mg/l]	47	38	26	21	17
	Gly [mg/l]	44	41	43	47	50
	Ala [mg/l]	0	0	18	26	29
	Gln [mg/l]	231	163	91	61	39
Kultur 5	Asp [mg/l]	20	21	21	22	23
	Glu [mg/l]	20	31	44	50	54
	Asn [mg/l]	33	32	26	22	19
	Ser [mg/l]	41	41	31	25	20
	Gly [mg/l]	37	41	43	47	53
	Ala [mg/l]	--	--	--	--	--
	Gln [mg/l]	200	172	109	83	65
Kultur 2,5	Asp [mg/l]	20	22	23	23	24
	Glu [mg/l]	21	32	44	47	51
	Asn [mg/l]	33	32	27	21	18
	Ser [mg/l]	41	39	30	22	18
	Gly [mg/l]	37	41	45	47	50
	Ala [mg/l]	--	--	--	--	--
	Gln [mg/l]	207	169	107	74	57

Tab. A22 Aminosäure-Konzentrationen von RT01

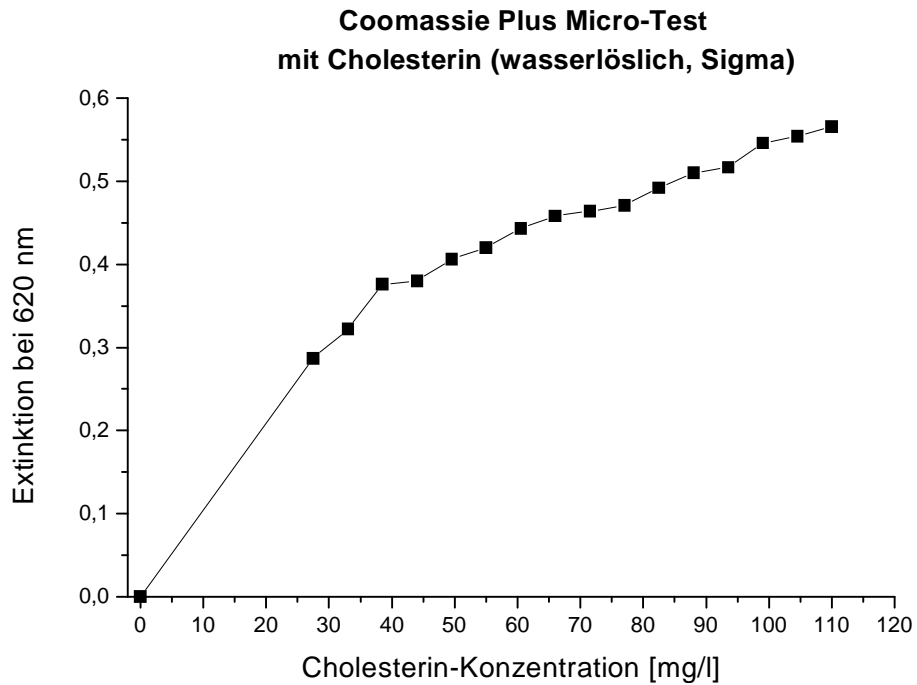
		Zeit [h]→				
		0	12	37	62	85
Amino- säure ↓						
Kultur 25	Asp [mg/l]	20	20	24	26	27
	Glu [mg/l]	19	32	59	64	62
	Asn [mg/l]	32	30	24	16	9
	Ser [mg/l]	43	39	29	19	13
	Gly [mg/l]	45	46	47	49	51
	Ala [mg/l]	2	4	10	16	23
	Gln [mg/l]	330	264	160	61	10

Tab. A23 Aminosäure-Konzentrationen von CHC01

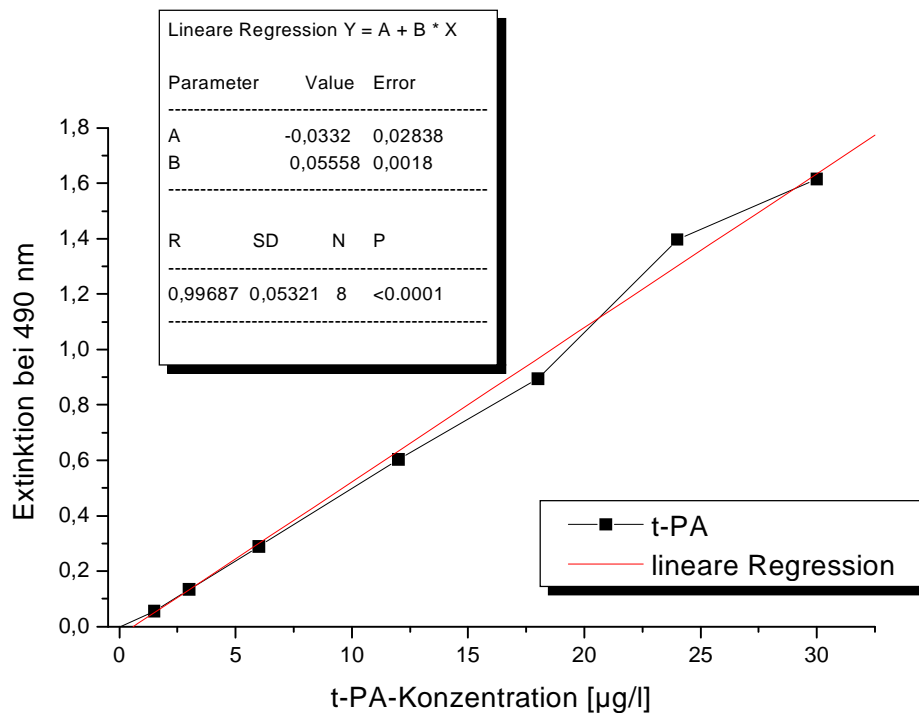
		Zeit [h]→	0	19	43	77	94
		Amino- säure ↓					
Referenz	Asp [mg/l]	20	27	30	22	17	
	Glu [mg/l]	18	44	54	38	25	
	Asn [mg/l]	31	31	18	3	1	
	Ser [mg/l]	40	34	15	6	6	
	Gly [mg/l]	42	46	40	37	37	
	Ala [mg/l]	3	13	26	30	29	
	Gln [mg/l]	435	252	58	0	0	
	Kultur 50	Asp [mg/l]	20	25	32	35	31
Glu [mg/l]		19	40	54	63	56	
Asn [mg/l]		33	30	19	6	3	
Ser [mg/l]		47	33	17	6	6	
Gly [mg/l]		44	40	39	45	45	
Ala [mg/l]		2	11	23	32	32	
Gln [mg/l]		462	269	76	0	0	
Kultur 25		Asp [mg/l]	20	24	32	28	20
	Glu [mg/l]	19	34	55	52	36	
	Asn [mg/l]	33	28	20	4	2	
	Ser [mg/l]	40	31	17	7	6	
	Gly [mg/l]	43	45	46	44	37	
	Ala [mg/l]	2	10	25	31	24	
	Gln [mg/l]	457	241	67	0	0	

Tab. A24 Aminosäure-Konzentrationen von CHPC01

B Standardreihen



Tab. B1 Coomassie Plus Micro-Test mit Cholesterin (wasserlöslich, Sigma)



Tab. B2 t-PA ELISA-Test, Standardreihe mit linearer Regression und Fehler

C Fotografien von gestressten und ungestressten Zellen

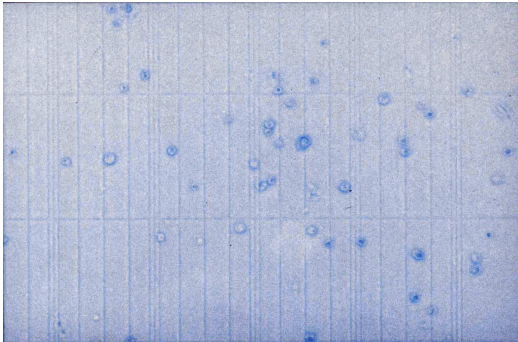


Abb. C1 Referenz-Kultur vor dem Scherexperiment

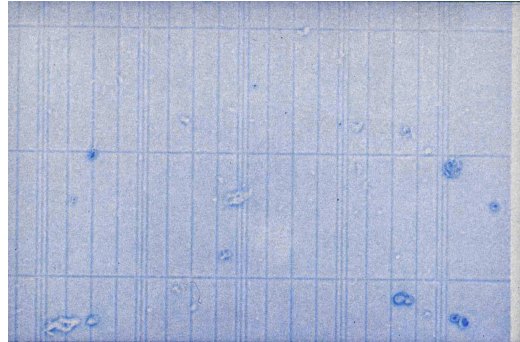


Abb. C2 Referenz-Kultur nach 3 h Scherexperiment bei Stufe 12

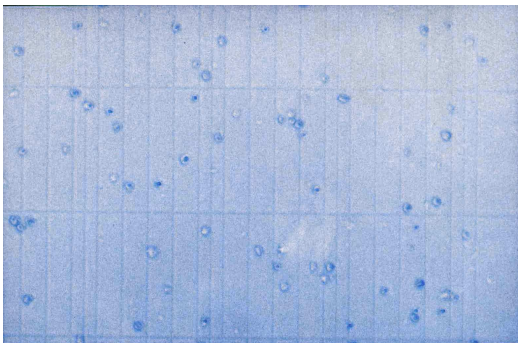


Abb. C3 Kultur 50 mit 50 mg/l Cholsäure vor dem Scherexperiment

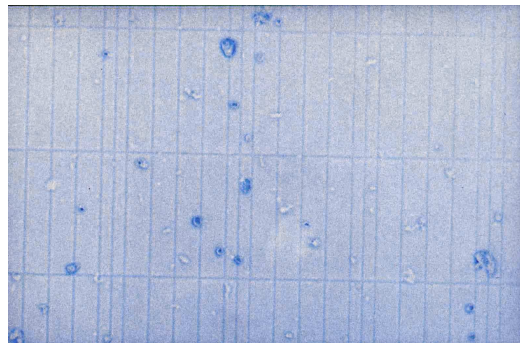


Abb. C4 Kultur 50 mit 50 mg/l Cholsäure nach 3 h Scherexperiment bei Stufe 12

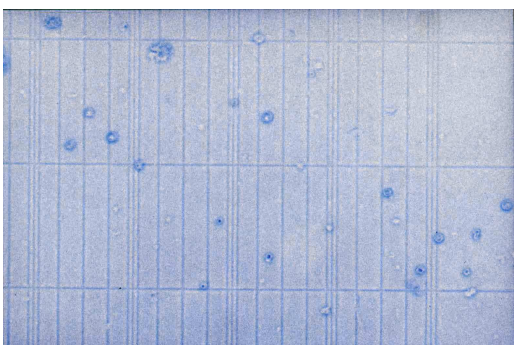


Abb. C5 Kultur 25 mit 25 mg/l Cholsäure vor dem Scherexperiment

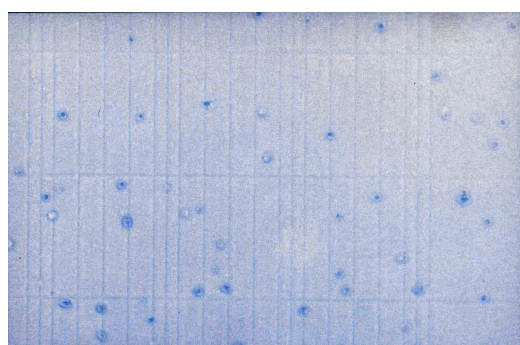


Abb. C6 Kultur 25 mit 25 mg/l Cholsäure nach 3 h Scherexperiment bei Stufe 12

D Literatur

- Abu-Reesh I., Kargi F.: Biological responses of hybridoma cells to hydrodynamic shear in agitated bioreactor, *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol. 13: 913-919; 1991
- Adams R.F., Jones R.L., Conway P.L.: High performance liquid chromatography of microbial acid metabolites, *J. Chromatography* Vol. 336: 125-137, 1984
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.: *Molekularbiologie der Zelle*, VCH, Weinheim, 3. Aufl., 1997
- biopool Firmenschrift t-PA: Imulyse™ t-PA Testkit-Bedienungsanleitung, biopool
- Boehringer Mannheim, Firmenschrift Ammoniak: Testkit-Bedienungsanleitung, Boehringer Mannheim 1998
- Bretscher M.S: Die Moleküle der Zellmembran, *Spektrum der Wissenschaft* Vol. 12: 90-99, 1985
- Butler M.: Growth limitations in high density microcarrier cultures, *Develop. Biol. Standard* Vol. 60, 269-270, 1985
- Chattopadhyay D., Rathman J.F., Chalmers J.J.: The protective effect of specific medium additives with respect to bubble rupture, *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 45: 473-480, 1995
- Cherry R.S., Papoutsakis E.T.: Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors, *Bioproc. Eng.*, Vol 1: 29-41, 1986
- Cherry R.S., Papoutsakis E.T.: Physical mechanisms of cell damage in microcarrier bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol 32: 1001-1014, 1988
- Debieu D., Gall C., Gredit M., Bach J., Malosse C., Leroux P.: Ergosterol biosynthesis and its inhibition by Fenpropimorph in *Fusarium* species, *Phytochem.* Vol. 31/4: 1223-1233, 1992
- Deborin G. A., Shibanova O.M.: Complexes of protein with lipids and their properties, *Biokhimiya* Vol. 18: 618ff., 1954
- Deutsche Industrievereinigung Biotechnologie: *Biotechnologie-Statistik*, Aug. 1999
- Duve C.: *Die Zelle - Expedition in die Grundstruktur des Leben*, Spektrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft Heidelberg, 1989
- Eagle H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture, *Science* Vol. 122: 501-504, 1955
- Exton J.H.: Signaling through phosphatidylcholine breakdown, *J. Biol. Chem.* Vol. 265: 1-4, 1990
- Feuerbache I.: Der Einfluß von Testosteron auf die Regulation der Körpertemperatur und des Energiestoffwechsels bei der Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*), Dissertation an der Universität Tübingen, 1981
- Filler D.A., Weinhold P.A.: Identification of a protein complex between choline-phosphate cytidyltransferase in Madin-Dary canine kidney cells, *J. Biol. Chem.* Vol. 267: 6719-6724, 1992
- Frederickson D.S.: *Harvey Lect.* Vol. 68: 185ff., 1974
- Gofman J.F.: *Plasma* Vol. 2: 413ff.; 1974
- Goldblum S., Bae Y.-K., Hink W.F., Chalmers J.: Protective effect of methylcellulose and other polymers on insect cells subjected to laminar shear stress, *Biotechnol. Prog.* Vol. 6: 383-390, 1990
- Goswami U.C., In: Ong A.S.H., Packer L., Eds.: *Lipid-soluble antioxidants: biochemistry and clinical applications*, Birkhäuser Verlag, Basel/Schweiz, 1992
- Griffiths J.B., Pirt S.J.: The uptake of amino acids by mouse cells during growth in batch culture and chemostat culture, *Roy. Soc.*, B168: 421ff, 1967
- Grigoriev I., Meilikov E., Eds.: *Handbook of physical quantities*, CRC Press, Boca Raton, 459, 1997
- Henzler H.-J., Biedermann A.: Modelluntersuchungen zur Partikelbeanspruchung in Reaktoren, *Chemie Ingenieur Technik* Vol.68: 1546-1561, 1996
- Hilker M.: Synthese von Gallensäuren-Derivaten zur Regulation der Cholesterin-Biosynthese, Dissertation Universität Dortmund, 1995

- Karlson P., Doenecke D., Koolman J.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1994
- Kennedy E.P., In: Vance, D.E., Ed.: *Phosphatidylcholine metabolism*, CRC Press, Boca Raton, Florida: 1-8, 1989
- Kent C.: Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis, *Prog. Lipid Res.* Vol. 29: 87-105, 1990
- Kolmogoroff A.N.: Die lokale Struktur der Turbulenz in einer inkompressiblen zähen Flüssigkeit bei sehr großen Reynold'schen Zahlen, *Sammelband der statistischen Theorie der Turbulenz*, Akademie-Verlag, Ost-Berlin, 1988
- Kretzmer G., Schügerl K.: Response of mammalian cells to shear stress, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 34: 613-616, 1991
- Kunas K.T., Papoutsakis E.T.: The protective effect of serum against hydrodynamic damage of hybridoma cells in agitated and surface-aerated bioreactors, *J Biotech.* Vol. 15: 57-70, 1990b
- Kunas K.T., Papoutsakis E.T.: Damage mechanism of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment, *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 36: 476-483, 1990a
- Kurano N., Leist C., Messi F., Kurano S., Fichter A.: Growth behavior of CHO in a compact loop, *Biotech.* Vol. 15: 101-112, 1990
- Leverett L.B., Hellums L.D., Alfrey C.P., Lynch E.C.: Red blood cell damage by shear stress, *Biophys. J.* Vol. 12: 257-268, 1972
- Levich V.: *Physical-Chemical Hydrodynamics*, Prentice Hall, New Jersey, 1962
- Lindl T., Bauer J.: *Zell- und Gewebekultur*, 3. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
- Loeffler R.S.T., Hayes A.L.: Sterols of the plant pathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Pyrenophora teres*, *Phytochem.* Vol 29/11: 3423-3425, 1990
- Lüdemann I., Pörtner R., Schaefer C., Schick K., Srámkova K., Reher K., Neumaier M., Franek F., Märkl H.: Improvement of the culture stability of non-anchorage-dependent animal cells grown in serum-free media through immobilization, *Cytotechnology* Vol. 19: 111-124, 1996
- Ludwig A., Kretzmer G., Schügerl K.: Determination of a „critical shear stress level“ applied to adherent mammalian cells, *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol. 44: 323-328, 1992
- Ludwig A., Tomeczkowski J., Kretzmer G.: Influence of the temperature on the shear stress sensitivity of adherent BHK 21 cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 38: 323-327, 1992
- Manusco A. et al.: Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 44: 563-585, 1994
- McQueen A., Bailey J.E.: Influence of serum level, cell line, flow type and viscosity on flow-induced lysis of mammalian tissue cells, *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 13: 409-418, 1989
- McQueen A., Meilhoc E., Bailey J.E.: Flow effects on the viability and lysis of suspended mammalian cells, *Biotechnol. Lett.* Vol. 9/12: 831-836, 1987
- Meyskens J.L. Jr., Prasad K.N., Eds.: *Vitamins and cancer*, Humana Press, Clifton, New Jersey, 1986
- Michaels J.D., Papoutsakis E.T.: Polyvinyl alcohol and polyethylene glycol as protectants against fluid-mechanical injury of freely-suspended animal cells (CRL 8018), *J. Biotechnol.* Vol. 19: 241-258, 1991
- Michaels J.D., Petersen J.F., McIntire L.V., Papoutsakis E.T.: Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL 8018) from fluid-mechanical injury. Visometric and bioreactor studies using serum, Pluronic F68 and polyethylene glycol. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 38: 169-180, 1991
- Michaels J.D., Nowak J.E., Mallik A.K., Koczo K., Wasan D.T., Papoutsakis E.T.: Analysis of cell-to-bubble attachment in spargers bioreactors in the presence of cell-protecting additives, *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 47: 407-419, 1995a
- Michaels J.D., Nowak J.E., Mallik A.K., Koczo K., Wasan D.T., Papoutsakis E.T.: Interfacial properties of cell culture media with cell-protecting additives, *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 47: 420-430, 1995b
- Minamoto Y., Ogawa K., Hideki A., Iochi Y., Mitsugi K.: Development of a serum-free and heat sterilizable medium and continuous high-density cell culture, *Cytotechnol.* Vol. 5: 35-51, 1991

- Müller H., Voigt B.: Bestimmung von freiem und gebundenem Ergosterol in Mikroorganismen, Zeitschrift f. allg. Mikrobiol. Vol 24/1: 61-64, 1984
- Müller H.-M., Schwadorf K., Modi R., Reimann J.: Ergosterin und Pilzkeimzahl in Malzkeimen und Grasmehl, Agribiol. Res. Vol 44/1: 49-53, 1991
- Murhammer D.W., Gooch C.F.: Scaleup of insect cell cultures: protective effects of Pluronic F68, Biotechnol. Vol. 6: 1411-1418, 1988
- Nevaril C.G., Lynch E.C., Alfrey C.P., Hellums J.D.: Erythrocyte damage and destruction induced by shearing stress. J. Lab. Clin. Med. Vol. 71: 784-789, 1968
- Newton A.C.: Measuring the sterol content of barley leaves infected with powdery mildew as a means of assessing partial resistance to *Erysiphe graminis f. sp. hordei*, Plant Pathology Vol 38: 534-540, 1994
- Nuhn P.: *Naturstoffchemie*, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1990
- Oh S.K.W., Nienow A.W., Al-Rubeai M., Emery A. N.: The effects of agitation intensity with and without continuous sparging on the growth and antibody production of hybridoma cells, J. Biotechnol. Vol. 12: 45-62, 1989
- Ohmori H.: Development of a serum free medium for in vitro immune responses by using β -cyclodextrin, J. Immunol. Meth. Vol. 112: 227-233, 1988
- Oncley J.S.: Harvey Lect. Vol. 50: 71ff., 1956
- Oram J.F.: Receptor-mediated transport of cholesterol between cultured cells and high density lipoproteins, Methods in enzymology Vol. 129: 645-659, 1986
- Orfanos C.E., Ehlert R., Gollnick H.: Drugs Vol. 24: 459-503, 1987
- Papoutsakis E.T.: Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage, TIBTECH Vol. 9: 316-324, 1991
- Parks L.W., Casey W.M.: Physiological implications of sterol biosyntheses in yeast, Annu. Rev. Microbiol. Vol. 49: 95-116, 1995
- Parks L.W.: Metabolism of sterols in yeast, CRC Critical Reviews in Microbiology Vol. 6/4: 301-341, 1978
- Piel G., Evrard B., van Hees T., Fernandez del Pozo C., Delattre L.: Development of a sustained release dosage form containing a diclofenac-cyclodextrin inclusion complex, 219-222
- Pierce Chemical Company, Firmenschrift: Protein Assay - Technical Handbook , Pierce (USA), 1999
- Pierce Chemical Company Firmenschrift: Introductions 23200, Coomassie Protein Assay Reagent Kit, Pierce (USA), 1998
- Puck: American Type Culture Collection, ATCC Ccl 61, CHO-K1, 1959?
- Reich T.: Untersuchungen zur Scherstreßempfindlichkeit von rekombinanten CHO-Suspensionszellen unter Variation verschiedener Parameter, Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, 1996
- Rodriguez J.R., Low C., Bottema C.D.K., Parks L.W.: Multiple functions for sterol in *Saccharomyces cerevisiae*, Biochim. Biophys. Acta Vol. 837: 336-343, 1985
- Schubert K., Rose G., Wachtel H., Hörhold C., Ikewana N.: Zum Vorkommen von Sterinen in Bakterien, Europ. J. Biochem. Vol. 5: 246-251, 1968
- Schwadorf K., Müller H.-M.: Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components and mixed feeds by liquid chromatography, J. Ass. Off. Analyt. Chem. Vol. 72/3: 457-462, 1989
- Seher H., Homberg E.: Die Untersuchung von Sterin-Gemischen II: Qualitative Analyse mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie, Fette, Seifen, Anstrichmittel Vol. 9: 557-560, 1971
- Seitz M., Mohr H.E., Burroughs R., Sauer D.B.: Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains, Cereal Chem. Vol. 54: 1207-1217, 1977
- Sherman M.I., Ed.: *Retinoids and cellular differentiation*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1986
- Shinitzky M.: An efficient method for modulation of cholesterol level in cell membranes, FEBS Letters Vol. 85: 317-320, 1978

- Sigma-Aldrich, Firmenschrift Cholesterin.: Testkit-Bedienungsanleitung, Sigma-Aldrich 1998
- Sigma-Aldrich, Firmenschrift LDH Opt.: Testkit-Bedienungsanleitung, Sigma-Aldrich 1998
- Smith S.J., Crowley J.H., Parks L.W.: Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* Vol 16/10: 5427-5432, 1996
- Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S., Eds.: *The retinoids* Vol. 1 and 2, Academic Press, Orlando, FL., 1984
- Sporn M.B., Roberts A.B.: *Molec. Endocrinol.* Vol. 5:3-7, 1991
- Stein W.D.: *The movement of molecules across cell membranes*, Academic Press, New York, 1967
- Storhas W.: *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*, Vieweg Verlag, Wiesbaden, 1994
- Stryer L.: *Biochemie*, Spektrum-der-Wissenschaften-Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 1990
- Summerbell D., In: Hinchliffe J.R., Hurle J.M., Summerbell D., Eds.: *Developmental patterning of the vertebrate limbs*, Plenum Press, New York, 9-14 and 151-156, 1991
- Suter S.P., Mehrjadi M.H.: Deformation and fragmentation of human red blood cells in turbulent shear flow, *Biophys. J.* Vol 15: 1-12, 1975
- Thaller C., Eichele G.: *Nature* Vol. 345: 815-818, 1990
- Thiele O.W.: *Lipide, Isoprenoide mit Steroiden*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1979
- Thurman J.D., Creasia D.A., Trotter R.W.: Testosterone prevents T-2 toxin-induced adrenal cortical necrosis in mice, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick, Frederick, MD 21701-5011, Springfield, Va.: NTIS, 1988
- Tijburg L.B.M., Geelen M.J.H., van Golde L.M.G.: Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver, *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1004: 1-19, 1989
- Tomczkowski J., Ludwig A., Kretzmer. G.: Effect of cholesterol addition on growth kinetics and shear stress sensitivity of adherent mammalian cells, *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 15: 849-853, 1993
- Tothill I.E., magan N.: The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grain, *Mycolog. Res.* Vol. 96/11: 963-970, 1992
- Tramper J., Williams J. B., Joustra D., Vlak J.M.: Shear sensitivity of insect cells in suspension, *Enzyme Micob. Technol.* Vol. 8: 33-36, 1986
- Tronchère H., Record M., Tercé F., Chap H.: Phosphatidylcholine cycle and regulation of phosphatidylcholine biosynthesis by enzyme translocation, *Biochem. Biophys. Acta* Vol. 1212: 137-151, 1994
- van der Pol L.A., Tramper J.: Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective, *TIBTECH* Vol. 16: 232-328, 1998
- van der Pol L.A., Beeksmas I., Tramper, J.: Polyethylene glycol as protectant against damage caused by sparging for hybridoma suspension cells in a bubble column, *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 17:401-407, 1995a
- van der Pol L.A., Paijens I., Tramper, J.: Dextran as protectant against damage caused by sparging for hybridoma cells in a bubble column, *J Biotech.* Vol. 43. 1003-110, 1995b
- Vendt V.P.: Protein-sterol complexes, *Vitamins* Vol. 2: 30ff., 1956
- Vikman M., Kolbe I., Szejtli J.: Preparation and characterization of piroxicam alkali-salt γ -cyclodextrin complexes, 281-284, 1996?
- Weete J.D.; Laseter J.L.: Distribution of sterol in the fungi I. Fungal spores, *Lipids* Vol. 9: 575-581, 1974
- Williams J.L., Ianotti J.P., Ham A., Bleuit J., Chen J.H.: Effects of fluid shear stress on bone cells, *Biorheology* Vol. 31(2): 163-170
- Windaus, v. Werder, Lüttringhaus: *Liebigs Ann.* Vol 499: 188, 1932
- Xiao Z., Zhang Z., Diamond S.L.: Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated, *J. Cell. Physiol.* Vol. 171: 205-211, 1997
- Yamane I., Kan M., Minamoto Y., Amatsuji Y.: α -cyclodextrin a novel substitute for bovine albumin in

serum-free culture of mammalian cells, Proc. Japan Accad. Ser. B Vol. 57, 385-398, 1981

- Yao Z., Vance D.E.: The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes, J. Biol. Chem. Vol. 263: 2998-3004, 1988
- Yellow Springs Instruments, Firmenschrift: Bedienungsanleitung des YSI 2700 Select, Version 2.56 12/96
- Yoshikawa N., Ariyoshi H., Ikeda M., Sakon M., Kawasaki T., Monden M.: Shear-stress causes polarized change in cytoplasmic calcium concentration in human umbilical vein endothelial cells (HUVECS), Cell Calcium, Vol. 22/3: 189-194, 1997
- Zhang Z., Al-Rubeai M., Thomas C.R.: Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells, Enzyme Microbiol. Technol. Vol 14: 980-983, 1992
- Zhang Z., Ferenczi M.A., Thomas C.R.: A micromanipulation technique with a theoretical cell model for determining mechanical properties of single mammalian cells, Chem. Eng. Science Vol. 47: 1347-1354, 1992
- Zhang Z., Ferenczi M.A., Thomas C.R.: A novel micromanipulation technique for measuring the bursting strength of single mammalian cells, Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 36: 208-210, 1991

E Abkürzungen

β -CD	β -Cyclodextrin
η	Viskosität
ϵ	lokale massenspezifische Energiedissipation
\bar{M}	gemittelttes Drehmoment (Digitalanzeige)
v_{Fluid}	Fluid-Geschwindigkeit
σ_z	Oberflächenspannung der Zellmembran/Membranspannung
R_s	Überlebensrate
τ	Schubspannung
A	Fläche
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosinriphosphat
BCA	Bicinchinonic Acid
BHK	Baby hamster kidney
BSA	Beef serum albumin
CDP	Cytidinphosphat
CHO	Chineese hamster ovary
Cys	Cystein
D	Scherrate
d_{Kol}	Kolmogoroff-Durchmesser
dv/dx	Geschwindigkeitsgradient
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EtOH	Ethanol
F	Scherkraft
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Spalthöhe
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kap.	Kapitel
Ile	Isoleucin
LDH	Laktatdehydrogenase
Lys	Lysin
M	Molar (=Mol pro Liter)
M	Drehmoment
Met	Methionin
Methyl-CD	Methylcyclodextrin

M-CD	Methyl-Cyclodextrin
Mio.	Millionen
NaOH	Natriumhydroxid
Nr.	Nummer
OPA	ortho-Phthalaldehyd
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
PF68	Pluronic F68
Phe	Phenylalanin
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidin
r	Spaltgröße im Viskosimeter
Re	Reynolds-Zahl
R _s	Überlebensrate (prozentuale Anteil der lebenden Zellen nach dem Experiment in Bezug auf die Lebendzellzahl zu Beginn)
RP	reversed phase
r _z	Zellradius
Ser	Serin
SF	Spodoptera frugiperda
TBP	Tryptose Phosphat Broth (Tryptose-Phosphat-Lösung)
t _{Experiment}	Dauer des Experiments
Thr	Threonin
Tab.	Tabelle
t-PA	tissue Plasminogen-Activator
TPB	Tryptose phosphate broth (Tryptosephosphat-Brühe)
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
w _{Kol}	Kolmogoroff-Rotationsgeschwindigkeit
Ze	Zellen
μ	zellspezifische Wachstumsrate
X	Lebendzellkonzentration
t	Zeit
r _x	Wachstumsgeschwindigkeit
Q _s	spezifischer Verbrauchsrate
\bar{x}	mittlere Lebendzellzahl
S	Substratkonzentration

Lebenslauf

Name Petra Dinhof
Geburtsdatum 11.12.1972 in Hannover

Schulbesuch

1979 - 1983 Grundschule Schulenburg
1983 - 1985 Orientierungsstufe Pattensen
1985 - 1992 Gymnasium Sarstedt

Studium

Okt. 1992 - Nov. 1997 Chemie/Diplom, Universität Hannover
Apr. - Nov. 1997 Diplomarbeit im Arbeitskreis Tierzellkultivierung bei Frau PD Dr. Gerlinde Kretzmer am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover in Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover
Jan. 1998 Diplom Chemie
Feb. - Juli 1998 Werkvertrag bei der Sartorius AG
Aug. 1998 – Dez. 2000 Chemie/Promotion bei Frau PD Dr. Gerlinde Kretzmer, Universität Hannover