

# IDENTIFIKATION VON HOCHPRODUZIERENDEN SÄUGETIERZELLEN UND DIE AUFREINIGUNG IHRER PRODUKTE

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologe Daniel Landgrebe  
geboren am 5. Oktober 1980 in Sottrum

2012

**Referent** Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover

**Korreferent** PD. Dr. rer. nat. Ursula Rinas  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover

**Tag der Promotion** 10. August 2012

*Wir sollten tun was er sagt. Er ist Walbiologe.*



# I. ZUSAMMENFASSUNG

---

Für die Herstellung von rekombinanten Proteinen werden in der Biotechnologie seit den achtziger Jahren zunehmend Säugerzelllinien eingesetzt. Säugerzelllinien sind für die häufig benötigten Proteinmodifikationen, welche für komplexe Proteine und auch die Bioaktivität nötig sind, unerlässlich. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Produktivität dieser Zellen, verglichen mit der prokaryotischer Expressionssysteme, bedarf es häufig einer aufwendigen Optimierung der Produktionsprozesse. Aber auch die Zelllinien selbst können in Hinblick auf ihre Produktivität und Stoffwechseleigenschaften optimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Produktions- und Aufreinigungsprozess für die Herstellung eines rekombinanten Proteins aus Zellen, welche häufig einen Einsatz in der industriellen Produktion finden, etabliert. Ebenfalls wird ein Verfahren zur Selektion von hoch-produzierenden Zellen erarbeitet und seine Auswirkung auf die Zellen untersucht.

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt die Produktion und Aufreinigung des Wachstumsfaktors Activin A aus rekombinanten CHO-Zellen. Zunächst wurde dazu ein Signalpeptid ermittelt, welches die Sekretion des Proteins in den Kulturüberstand gewährleistet und somit die Aufreinigung erleichtert. Die transfizierte Zelllinie zeigte ein stabiles Wachstum und wurde für die Produktion im Bioreaktor eingesetzt. Eine anschließende Aufreinigung erfolgte unter der Verwendung von Anionenaustausch- und Hydrophober Interaktionschromatographie.

Für die Testung der biologischen Aktivität von Activin A wurde ein Proliferationsassay etabliert. Es wurde gezeigt, dass Activin A die Proliferation der murinen Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 unterstützt.

Zur Optimierung der Produktivität von Zelllinien wurde ein zytometrisches Verfahren anhand einer Modellzelllinie entwickelt, welches auf die Verwendung von spezifischen Färbemethoden verzichtet. Hierbei wurden Zellen, die im Zytometer ein hohes Seitwärtsstreulicht zeigten, separiert und für die Erstellung von Subzelllinien verwendet. Dabei wird die Annahme getroffen, dass ein hohes Seitwärtsstreulicht durch einen hohen Mitochondriengehalt in den Zellen verursacht wird.

Die Produktivität und die Stoffwechseleigenschaften der Ausgangszelllinie und der Subzelllinien wurden untersucht und miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Subzelllinien nach wiederholter Sortierung eine Verdopplung des Produkttiters erreichen. Ebenfalls konnten positive Effekte in Bezug auf die Stoffwechselfunktionen bei den sortierten Zellen durch eine Metabolomanalyse festgestellt werden. Die starke Lactatbildung, welche für kontinuierliche Zelllinien typisch ist, setzt später im Kultivierungsverlauf ein. Zudem zeigen diese Zelllinien eine um bis zu 20 % erhöhte Zelldichte.

Schlagworte: Rekombinante Proteine, Hochproduzierende Zellen, Durchflusszytometrie

## II. ABSTRACT

---

Since the early 1980s mammalian cells were used for the biotechnological production of recombinant proteins. The usage of mammalian cells is often necessary because the posttranslational modifications of the proteins are important for the formation of complex protein structures and their bioactivity. Compared to other expression systems, especially to bacterial systems, mammalian cells show a relatively low productivity. This makes an optimization of the production processes necessary. Furthermore the cell lines themselves provide a field for optimization.

In this work a production process for a recombinant protein is developed using a production cell line, which is widely used in industrial processes. Additionally, a technique for the optimization of a cell line was established and its influence onto the cells was investigated.

The first part of this work deals with the establishment of a production and purification process for recombinant Activin A from CHO cells. First, a suitable signal peptide for the secretion of the protein was identified. The transfected cell line shows stable growth and was used for the production in bioreactor scale. The purification of the protein was performed using ion exchange and hydrophobic interaction chromatography.

To detect the biological activity of the protein, a proliferation assay using a murine fibroblast cell line was established. It was shown that Activin A induces proliferation of the cell line NIH-3T3.

A cytometric assay was developed to optimize the productivity of the production cell line. It was developed by the use of a model cell line, whereby the application of any staining dyes is avoided. Cells, which show a high side scatter were separated via FACS and were used to establish subpopulations. This approach is based on the assumption that these cells show a high amount of mitochondria.

The productivity and the metabolic characteristics of the subpopulations and the initial population were compared. The results show that the subpopulations reach a twofold product titer compared to the initial population. Furthermore positive effects concerning the metabolic characteristics were observed. It is shown that the lactate formation rates are decreased in the beginning of the cultivation. Also the cell density is increased up to 20 percent.

Key words: recombinant proteins, high producing cells, flow cytometry

### III. VERZEICHNISSE

---

#### INHALT

---

I.	Zusammenfassung.....	5
II.	Abstract.....	6
III.	Verzeichnisse.....	7
III.I.	Abkürzungsverzeichnis .....	10
III.II.	Abbildungsverzeichnis .....	12
III.III.	Tabellenverzeichnis .....	14
1.	Einleitung und Zielsetzung.....	15
2.	Theoretische Grundlagen .....	16
2.1.	Produktionszelllinien .....	16
2.1.1.	Entwicklung von Produktionszelllinien .....	17
2.1.2.	Häufig verwendete Zelllinien .....	18
2.1.2.1.	Humane Zelllinien .....	18
2.1.2.2.	Weitere Zelllinien.....	19
2.1.2.3.	Hybridomzellen.....	19
2.1.3.	Stoffwechseleigenschaften von Zelllinien.....	20
2.1.4.	Erstellung von Zelllinien.....	23
2.2.	Identifikation von Hoch-Produzenten .....	26
2.2.1.	Einzelzellklonierung .....	26
2.2.2.	Immobilisierungsassays .....	27
2.2.3.	Weitere Selektionssysteme .....	29
3.	Experimenteller Teil .....	32
3.1.	Einleitung.....	32
3.2.	Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Activin A in CHO-Zellen .....	32
3.2.1.	Erstellung der CHO-Zelllinie.....	32
3.2.2.	Kultivierung von CHO-Zellen/Produktion von Activin A.....	34
3.2.3.	Aufreinigung von rekombinanten Activin A.....	36
3.2.3.1.	Affinitätschromatographie.....	37
3.2.3.2.	Unspezifische Chromatographiemethoden .....	46
3.2.4.	Activin A Aktivitätsassay .....	51
3.2.5.	Zusammenfassung.....	53

3.3.	Identifikation von Hoch-produzierenden Zellen .....	54
3.3.1.	Sortierung am FACS .....	54
3.3.2.	Kultivierung von SC-71-Zellen.....	57
3.3.3.	Vergleich der sortierten Zelllinien.....	58
3.3.4.	Zusammenfassung.....	68
4.	Zusammenfassung und Ausblick .....	69
5.	Anhang .....	71
5.1.	Literaturverzeichnis .....	71
5.2.	Materialien .....	77
5.2.1.	Geräte.....	77
5.2.2.	Verbrauchsmaterialien .....	78
5.2.3.	Chemikalien .....	79
5.2.4.	Antikörper, Zellkulturmedien und Kits.....	81
5.2.5.	Zelllinien .....	81
5.3.	Methoden.....	82
5.3.1.	Zellkulturtechniken .....	82
5.3.1.1.	Kultivierung von CHO-Zellen .....	82
5.3.1.2.	Kultivierung von Hybridomzelllinie SC-71 .....	83
5.3.1.3.	Kultivierung von NIH-3T3-Zellen .....	83
5.3.1.4.	Kryokonservierung und Revitalisierung .....	83
5.3.1.5.	Viabilitäts- und Zellzahlbestimmung.....	84
5.3.1.6.	Vitalitätbestimmung .....	84
5.3.2.	Analytische Methoden.....	84
5.3.2.1.	SDS-PAGE und Silberfärbung .....	84
5.3.2.2.	Western Blot.....	86
5.3.2.3.	Glucose- und Lactatbestimmung.....	87
5.3.2.4.	ELISA .....	87
5.3.2.5.	Bradford-Assay .....	88
5.3.2.6.	HPLC-Aminosäuren-Analytik.....	88
5.3.2.7.	HILIC-MS .....	89
5.3.3.	Zytometrische Methoden .....	89
5.3.3.1.	Sortierung nach SSC.....	89
5.3.3.2.	SSC-Messung.....	90

5.3.4.	Präparative Methoden.....	91
5.3.4.1.	Metallchelate-Affinitätschromatographie .....	91
5.3.4.2.	HA-Affinitätschromatographie.....	93
5.3.4.3.	Heparin-Affinitätschromatographie.....	94
5.3.4.4.	Hydrophobe-Interaktionschromatographie .....	94
5.3.4.5.	Ionenaustausch-Chromatographie .....	95
5.3.4.6.	TCA-Fällung.....	96
5.3.4.7.	Ultrafiltration .....	96
5.3.4.8.	Cross-Flow-Filtration.....	97
5.3.4.9.	Zellaufschluss.....	97
5.3.5.	Online-Tools .....	97
5.3.5.1.	Bestimmung des pI .....	97
5.4.	Datenauswertung.....	98
5.4.1.	SC-71-Kultivierungen .....	98
5.4.2.	Berechnung der spezifischen Produktivität .....	102
5.5.	Messdaten.....	102
5.5.1.	Metabolomanalyse.....	102
	Danksagungen.....	105
	Lebenslauf.....	106

### III.I.

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% Vol.	Volumenprozent
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
c	Konzentration
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>forward scatter</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	Gauge
G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Gew.-%	Gewichtsprozent
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GOI	<i>gene of interest</i>
GS	Glutamin-Synthetase
HA	Hämagglutinin
HCP	<i>host cell proteins</i>
HEK	human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HILIC	<i>hydrophobic interaction liquid chromatography</i>
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HT	Hypoxanthin/Thymidin
Hz	Hertz
IDA	Iminodiessigsäure
IEX	<i>ion-exchange chromatography</i>
IgGκ	Immunglobulin G, Isotyp κ
IL-2	Interleukin-2
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LEAP	<i>laser-enabled analysis and processing</i>
LEW	<i>lysis-equilibration-wash</i>
Lys	Lysin
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MS	Massenspektrometrie
MTX	Methotrexat
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadeninukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadeninukleotid
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd

P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Pyruvatcarboxylase
pcd	<i>piko-gram per cell per day</i>
pcG	<i>Polycomb-group</i>
PDC	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Propidium-Iodid
psi	<i>pound per square inch</i>
Q	Quaternäre Ammoniumverbindung
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Sulfonsäure
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SSC 0-II	Zelllinien sortiert nach <i>side scatter</i> , Populationen 0-II
SSC	<i>side scatter</i>
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TBST	<i>TRIS buffered saline with Tween</i>
TCA	Trichloressigsäure
TED	TRIS-Carboxymethylethylendiamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UCOE	<i>ubiquitous chromatin opening elements</i>
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	Voll-entsalztes Wasser

### III.II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 - Darstellung der Etablierung einer Zelllinie zur Produktion von rekombinanten Proteinen .....	17
Abbildung 2 - Darstellung der Haupt-Energiestoffwechselwege der Zelle I .....	21
Abbildung 3 - Darstellung der Haupt-Energiestoffwechselwege der Zelle II .....	22
Abbildung 4 - Schematische Darstellung des <i>affinity matrix</i> Assays.....	28
Abbildung 5 - Schematische Darstellung der <i>gel microdroplet technology</i> .....	29
Abbildung 6 - Verwendeter Plasmid für die Herstellung von rekombinanten CHO-Zellen .....	33
Abbildung 7 - Western Blot zur Kontrolle der Sekretion von Activin A.....	34
Abbildung 8 - Lebendzellzahl und Viabilität der CHO-Zellen im Verlauf der Vorversuch-Bioreaktorkultivierung .....	35
Abbildung 9 - Lebendzellzahl und Viabilität der CHO-Zellen im Verlaufe der Bioreaktorkultivierung zur Produktion von rekombinanten Activin A .....	35
Abbildung 10 - SDS-PAGE zur Visualisierung der Proteine im Zellkulturüberstand .....	36
Abbildung 11 - FPLC-Chromatogramm zur IMAC-Cu <sup>2+</sup> -IDA.....	38
Abbildung 12 - SDS-PAGE zur Visualisierung der Aufreinigung mittels IMAC-Cu <sup>2+</sup> -IDA .....	38
Abbildung 13 - Schematische Darstellung der mehrfachen Beladung des Membranadsorbers.....	39
Abbildung 14 - FPLC-Chromatogramm zur IMAC-Cu <sup>2+</sup> -IDA mit mehrfacher Probenauftragung .....	40
Abbildung 15 - SDS-PAGE zur Visualisierung der Aufreinigung mittels IMAC-Cu <sup>2+</sup> -IDA nach mehrfacher Probenauftragung .....	40
Abbildung 16 - FPLC-Chromatogramm zur IMAC-Cu <sup>2+</sup> -IDA mit denaturierter Probe.....	41
Abbildung 17 - SDS-PAGE zur Visualisierung der Aufreinigung mittels IMAC-Cu <sup>2+</sup> -IDA mit denaturierter Probe.....	42
Abbildung 18 - Western Blot zur Visualisierung der Aufreinigung mittels IMAC-Cu <sup>2+</sup> -IDA mit denaturierter Probe .....	42
Abbildung 19 - SDS-PAGE zur Visualisierung der Aufreinigung mittels Ni <sup>2+</sup> -TED .....	43
Abbildung 20 - SDS-PAGE zur Visualisierung der Aufreinigung mittels Anti-HA-Affinitätschromatographie .....	44
Abbildung 21 - FPLC-Chromatogramm zur Heparin-Affinitätschromatographie .....	45
Abbildung 22 - Flussdiagramm zur 2-Schritt-Aufreinigung von Activin A .....	46
Abbildung 23 - FPLC-Chromatogramm zur IEX-Q .....	47
Abbildung 24 - SDS-PAGE zur Visualisierung der Aufreinigung mittels IEX-Q.....	47
Abbildung 25 - Western Blot zur Visualisierung der Aufreinigung mittels IEX-Q.....	48
Abbildung 26 - FPLC-Chromatogramm zur HIC.....	49
Abbildung 27 - Western Blot zur Visualisierung des zweiten Aufreinigungsschrittes mittels HIC .....	49
Abbildung 28 - Aktivitätstest von aufgereinigtem Activin A.....	51
Abbildung 29 - Schematische Darstellung der Sortierungsversuche .....	55
Abbildung 30 - Sortierung nach SSC, Histogramm 1: Gate zur Diskriminierung von Zellaggregaten ....	55
Abbildung 31 - Sortierung nach SSC, Histogramm 2: Gate zur Diskriminierung von Zellfragmenten ...	56
Abbildung 32 - Sortierung nach SSC, Histogramm 3: Gate zur Diskriminierung von nicht-viablen Zellen .....	56
Abbildung 33 - Sortierung nach SSC, Histogramm 4: <i>gate</i> zur Sortierung .....	57

Abbildung 34 - Proliferationsverhalten im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII .....	58
Abbildung 35 - Viabilität im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII...	59
Abbildung 36 - Glucosekonzentration im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII .....	59
Abbildung 37 - Glutaminkonzentration im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII .....	60
Abbildung 38 - Lactatkonzentration im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII .....	60
Abbildung 39 - Konzentrationen der Komponenten der Glycolyse zu zwei Zeitpunkten im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII.....	62
Abbildung 40 - Konzentrationen der Komponenten des Citratzyklus zu zwei Zeitpunkten im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII .....	63
Abbildung 41 - Konzentrationen der Nukleotiddi- und triphosphate zu zwei Zeitpunkten im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII .....	64
Abbildung 42 - Konzentrationen von NADH und NAD <sup>+</sup> zu zwei Zeitpunkten im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII.....	65
Abbildung 43 - Produktkonzentration im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0 und SSCII.....	65
Abbildung 44 - Spezifische Produktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Standardkultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII .....	66
Abbildung 45 - SSC der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII nach 20.Passagen .....	67

### III.III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 - Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Selektionsmethoden von Hochproduzenten ....	31
Tabelle 2 - Überprüfung des SSC der sortierten Zelllinien .....	67
Tabelle 3 - Kultivierungsparameter der CHO-Bioreaktorkultivierung .....	82
Tabelle 4 - Zusammensetzung SDS-Gele .....	85
Tabelle 5 - HPLC Lösemittelgradienten.....	89
Tabelle 6 - Parameter der SSC-Sortierung .....	90
Tabelle 7 - IMAC-IDA, Flussraten .....	91
Tabelle 8 - IMAC-TED, Volumina.....	92
Tabelle 9 - Anti-HA-Affinitätschromatographie, Flussraten.....	93
Tabelle 10 - Heparin-Affinitätschromatographie, Flussraten .....	94
Tabelle 11 - Hydrophobe Interaktionschromatographie, Flussraten.....	95
Tabelle 12 - Ionenaustauschchromatographie, Flussraten.....	96
Tabelle 13 - Datensätze der Kultivierung der Zelllinie SSC0.....	98
Tabelle 14 - Datensätze der Kultivierung der Zelllinie SSCI.....	99
Tabelle 15 - Datensätze der Kultivierung der Zelllinie SSCII.....	101
Tabelle 16 - Datensatz der Metabolomanalyse .....	102

## 1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

---

In der roten Biotechnologie werden für die Herstellung von komplexen Proteinen im Wesentlichen Säugetierzellen eingesetzt. Diese Zellen sind in der Lage, die häufig benötigten Proteinmodifikationen durchzuführen. Im Vergleich zu anderen Expressionssystemen zeichnen sie sich allerdings durch eine verhältnismäßig geringe Produktion und aufwendige Kultivierungsbedingungen aus. Ein weiterer kritischer Faktor ist die Stabilität der Expression der gewünschten Proteine. Diese kann im Laufe der Zeit abnehmen oder vollständig verloren gehen. So ist, neben der Optimierung von Wachstumsmedien und des Kultivierungsprozesses, auch die Optimierung der Zelllinien selbst von entscheidender Bedeutung bei der Etablierung des gesamten Produktionsprozesses.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Zytokin Activin A in einer rekombinanten CHO-Zelllinie produziert und aufgereinigt. *In vivo* erfüllt dieses Zytokin hormonelle Funktionen und ist an der FSH-Regulation beteiligt. Ebenfalls wurden zahlreiche *in vitro* Funktionen von Activin A in der Literatur beschrieben. Für verschiedene Zelltypen sind unterschiedliche Wirkungen wie die Induktion von Differenzierungen oder Proliferation aufgezeigt worden. Activin A nimmt unter anderem eine regulative Rolle in der Hämatopoese ein. Die Proliferation von B-Zellen wird durch Activin A inhibiert und die Erythropoese angeregt (Shav-Tal 2002). Ebenso ist Activin A an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von humanen embryonalen Stammzellen beteiligt (James 2005). Eine anti-proliferative Wirkung auf verschiedene maligne Zellen wurde ebenfalls beschrieben (Risbridger 2001; Matsuo 2006), sowie eine Wirkung Aktivierung von Keratinozyten im Rahmen der Wundheilung (Bamberger 2005).

Die eingesetzte rekombinante CHO-Zelllinie zeigt allerdings eine vergleichsweise geringe Produktionsfähigkeit. Diese Problematik ist in der Literatur häufig beschrieben. Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ursachen für diese Beobachtungen dargestellt. Häufig sind sie auf *gene silencing* Effekte oder eine geringe Transfektionseffizienz zurückzuführen.

In der Literatur sind zahlreiche Möglichkeiten für die Optimierung der Produktivität von Zelllinien beschrieben. Diese stellen sich jedoch häufig als zeit- oder kostenintensiv dar. Im zweiten Teil der Arbeit wird die Optimierung einer Zelllinie mittels durchflusszytometrischer Verfahren beschrieben. Für das hier etablierte Verfahren sind keine produkt-spezifischen Färbungen nötig und es wird auf die Anwendung einer zeitaufwendigen Einzelzellklonierung verzichtet. Die Auswirkungen der Sortierungen auf wichtige Stoffwechselwege, wie die Glycolyse und den Citratzyklus sowie auf die Produktivität der Zellen anschließend untersucht und beschrieben.

## 2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

---

### 2.1. PRODUKTIONSZELLINIEN

Produktionszelllinien werden seit den achtziger Jahren für die Herstellung von Proteinen verwendet. Die Produkte lassen sich in folgende Kategorien einteilen:

1. Rekombinante Formen von natürlichen Proteinen (zum Beispiel Zytokine und Wachstumsfaktoren)
2. Derivate von natürlichen Proteinen (Fusionsproteine und Vakzine)
3. Monoklonale Antikörper

Für die Herstellung von rekombinanten Proteinen werden ebenfalls mikrobielle Systeme, insbesondere *E. coli* eingesetzt. Diese zeigen gegenüber Säugetierzellen deutliche Nachteile. So sind Prokaryonten nicht in der Lage, bestimmte posttranslationale Modifikationen durchzuführen. Diese sind insbesondere für die Herstellung von komplexen Proteinen nötig (Mahmoud 2007). Zudem spielt die Glycosylierung eine wichtige Rolle für die Bioaktivität der Proteine (Beck 2008).

Bei der Verwendung von Säugetierzellen als Produzenten sind permanente Zelllinien Standard. Sie stehen nahezu unbegrenzt zur Verfügung und mit ihnen ist es möglich, reproduzierbare Versuche und Prozesse zu etablieren. Permanente Zelllinien müssen zunächst den Prozess der Transformation durchlaufen haben, bei welchen sie immortalisiert und so unbegrenzt teilungsfähig werden. Zum Einen kann die Transformation *in vivo* erfolgt sein. In diesem Fall entstammt die Zelllinie aus Tumorgewebe. Zum Anderen kann die Transformation *in vitro* durch gentechnische Eingriffe erfolgen. Dazu werden verschiedene Techniken verwendet, wie zum Beispiel der Einsatz von viralen Onkogenen, chemische Karzinogene oder radioaktive Strahlung. Etablierte Zelllinien selbst unterscheiden sich nach längerer Kultivierungsdauer stark von den ursprünglichen Zellen. Sie sind an das Wachstum in Suspension adaptiert und zeigen in der Regel Chromosomenaberrationen. Desweiteren gleicht der Stoffwechsel von kontinuierlichen Zelllinien, welche durch *in vitro* Transformation generiert worden sind, in vielen Punkten denen von Tumorzellen (Schmitz 2009). Dies betrifft insbesondere den erhöhten Bedarf an Glutamin und die hohe Lactatproduktion. Auf diese Eigenschaften wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

Der Herstellung von rekombinanten Proteinen in Säugetierzellen geht eine arbeitsintensive Prozessentwicklung voraus. Zunächst muss das GOI (*gene of interest*, Zielgen) in die Zellen eingebracht werden. Es folgt eine Selektion von erfolgreich transfizierten Zellen, welche zudem gewünschte Eigenschaften, wie zum Beispiel einen hohen Produkttiter zeigen. Diese Selektion ist sehr zeitaufwendig, da in der Regel eine Einzelzellklonierung durchgeführt wird. Für die Etablierung des Produktionsprozesses müssen ein *upscaling* und eine Optimierung der Kultivierungsparameter folgen. Zusammengenommen nimmt die gesamte Entwicklung circa ein Jahr in Anspruch (Wurm 2004). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über diese Entwicklung und ihre wichtigen Abschnitte.

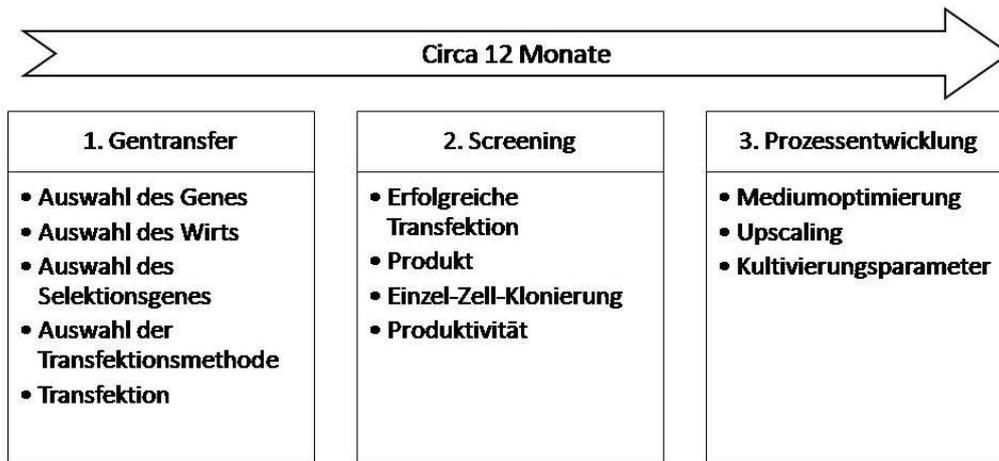


ABBILDUNG 1 - DARSTELLUNG DER ETABLIERUNG EINER ZELLINIE ZUR PRODUKTION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN, VERÄNDERT NACH (WURM 2004)

Nach dem Gentransfer ist eine stabile Produktion der Zellen nicht immer gegeben. Etwa die Hälfte aller Zellen verliert ihre Expressionsfähigkeit innerhalb der ersten Tage nach der Transfektion. Zusätzlich zeigt ungefähr ein Drittel der Zelllinien eine graduelle Abnahme der Produktionsrate während der folgenden sechs Monate, wenn der Selektionsdruck entfernt wird. Insgesamt sind nur circa 20 % der Zellen zu einer langfristigen, stabilen Expression in der Lage und können für die Erstellung einer Zelllinie verwendet werden (De Jesus 2011).

Nachfolgend soll ein Überblick über Produktionszelllinien und ihre Stoffwechseleigenschaften gegeben werden. Es wird erläutert, welche Faktoren die Stabilität der Genexpression beeinflussen, und es werden Möglichkeiten aufgezeigt, diese zu stabilisieren. Im Anschluss werden Selektionsverfahren für die Identifizierung von hoch-produzierenden Zellen dargestellt.

### 2.1.1. ENTWICKLUNG VON PRODUKTIONSZELLINNIEN

Die Produktivität einer Zelllinie wird durch die erreichbare Zelldichte und die spezifische Produktivität bestimmt (Song 2011). Die maximale Zelldichte verschiedener Zelllinien konnte durch die Optimierung der eingesetzten Medien und die der Kultivierungsprozesse deutlich erhöht werden (Hacker 2009). Zu Beginn der Zellkultur in den achtziger Jahren sind maximale Zelldichten von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht worden. Inzwischen werden in *Batch*-Verfahren Zelldichten von bis zu  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht (De Jesus 2011). Einzelne Zelllinien erreichen in *high-density*-Perfusionsverfahren eine Zelldichte von bis zu  $1,5 \times 10^8$  Zellen/ml (Schirmer 2010).

Auch die spezifische Produktivität der Zelllinien konnte in den letzten Dekaden durch die Verwendung von Selektionsgenen und die Verhinderung von *gene silencing* Effekten deutlich gesteigert werden (Girod 2007; Haase 2010). Häufig wird die Angabe pcd (*pikogram pro cell pro day*, Pikogramm pro Zelle pro Tag) für die spezifische Produktivität verwendet. Ebenso findet die Bezeichnung Produkttiter Anwendung, welche in Masse pro Volumen der Kultivierung angegeben wird. Bei Zelllinien in den achtziger Jahren war eine spezifische Produktivität unter 10 pcd,

beziehungsweise einen Titer von circa 50 mg/l üblich. Moderne Zelllinien erreichen bis zu 90 pcd beziehungsweise einen Titer von bis zu 10 g/l (Wurm 2004; Huang 2010).

## 2.1.2. HÄUFIG VERWENDETE ZELLINIEN

CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-Zellen gehören mit 70 % zu den am häufigsten verwendeten Zelllinien für die Herstellung von rekombinanten Proteinen. Weitere Zelllinien, die einen häufigen Einsatz finden sind NS0-Zellen (murine Myelomzellen), HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen), BHK21-Zellen (*Baby Hamster Kidney*), PER-C6 (humane Retinazellen) und Hybridomzellen. Alle diese Zelllinien lassen sich an die Kultivierung in Suspension adaptieren und sind somit für ein *scale-up* in industriellen Prozessen geeignet (Butler 2005; Jayapal 2007).

### 2.1.2.1. HUMANE ZELLINIEN

Der Vorzug von humanen Zelllinien ist die Tatsache, dass die produzierten Proteine ein humanes Glycosylierungsmuster tragen, was einen Einfluss auf die Aktivität der Proteine haben kann. Außerdem können nicht-humane oder fehlende Glycosylierungen an Proteinen potentiell immunogen beim Menschen wirken, was ihre Verwendung im klinischen Bereich einschränkt (Borrebaeck 1993; Jones 2003).

Die humane Zelllinie PER-C6 wurde durch eine Immortalisierung von embryonalen Retinazellen durch adenovirale Gene erzeugt (Fallaux 1998). Sie wird häufig für die Produktion von Vektoren für die Genterapie verwendet. Allerdings findet sie auch Anwendung zur Produktion von rekombinanten Proteinen (insbesondere humane Immunglobuline). PER-C6-Zelllinien erreichen bei der Produktion von rekombinanten Antikörpern einen Produkttiter von bis zu 2 g/L (Jones 2003; Tchoudakova 2009). Wie auch bei CHO-Zellen, können Zelldichten von mehr als  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in *Fed-Batch* Prozessen erreicht werden (Kuczewski 2011).

HEK293-Zellen wurden ebenfalls mittels adenoviralen Genen aus embryonalen Nierenzellen erzeugt (Graham 1977). Diese Zelllinie wird häufig für Forschungszwecke für die Produktion von Proteinen mit humanem Glycosylierungsmuster verwendet. Bei Produktionsprozessen werden im *Batch*-Betrieb Zelldichten von bis zu  $1 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht. HEK293-Zellen werden häufig für die Herstellung von Adenoviren eingesetzt. Diese finden Anwendung in genterapeutischen Ansätzen (Cote 1998; Iyer 1999; Galvez 2011).

#### 2.1.2.2. WEITERE ZELLINIEN

CHO-Zellen wurden 1957 aus einer primären Zellkultur gewonnen, welche spontan immortalisierte Zellen bildete. Die daraus resultierende Zelllinie wird als CHO-K1 bezeichnet. Die häufig verwendeten Zelllinien CHO-DXB11 und CHO-DG44 wurden durch Mutagenese hergestellt. Diesen Zelllinien sind aufgrund einer Gen-Deletion nicht in der Lage, das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) zu exprimieren und sind somit auf Hypoxanthin und Thymidin (HT) als Medienzusätze angewiesen (Urlaub 1983; Krämer 2008). Zu Selektionszwecken wird das Gen für DHFR meist zusammen mit dem GOI transfiziert (Gasser 1982; Lucas 1996).

CHO-Zellen werden hauptsächlich für die Produktion von rekombinanten Proteinen und Antikörpern eingesetzt. In optimierten Prozessen kann ein Produkttiter von bis zu 10 g/L erreicht werden (Huang 2010). In der Literatur werden maximale Zelldichten von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml (Kou 2011; Taschwer 2012) bis zu  $2 \times 10^7$  Zellen/ml (Huang 2010; Florin 2011) beschrieben.

Die murine NS0-Zelllinie stammt von Plasmozytomzellen ab, welche in den sechziger Jahren isoliert worden sind. Sie stellt eine Tochterzelllinie dar, welche die Fähigkeit zur Produktion von Immunglobulinen verloren hat. Die Zelllinie wird nach der Transfektion zur Produktion oder für die Herstellung von Hybridomzellen verwendet. NS0-Zellen sind GS (Glutamin-Synthetase)-negativ und somit nicht in der Lage, Glutamin zu synthetisieren. GS kann somit als Selektionsmarker in dieser Zelllinie eingesetzt werden (Barnes 2000). NS0-Zellen sind in der Lage, in Protein-freiem Medium zu wachsen, ohne dass eine Zugabe von Wachstumsfaktoren notwendig ist (Spens 2009). In der Literatur sind keine Angaben zu Kultivierungen zu finden, welche eine höhere Zelldichte als  $3 \times 10^6$  Zellen/ml erreichen (Okonkowski 2007; de la Luz-Hernandez 2008; Ho 2011).

BHK21-Zellen sind aus Nierenzellen von Hamster-Embryonen gewonnen worden. Es können Zelldichten von bis zu  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml im Perfusionsbetrieb oder bis zu  $2 \times 10^6$  Zellen/ml im *Batch*-Betrieb erreicht werden (Cruz 2002; Irani 2002).

#### 2.1.2.3. HYBRIDOMZELLEN

Hybridomzellen stellen eine Besonderheit innerhalb der Produktionszelllinien dar und können nur für die Herstellung von Antikörpern verwendet werden. Sie werden nicht, wie andere Zelllinien, mit dem GOI transfiziert, sondern aus B-Lymphozyten hergestellt, welche über die Fähigkeit verfügen, den gewünschten Antikörper herzustellen. Dazu findet zunächst eine Immunisierung eines Versuchstieres mit dem Antigen, gegen welches der Antikörper seine Spezifität zeigen soll, statt. Im Zuge der Immunantwort auf dieses Antigen werden vom Immunsystem des Versuchstieres B-Zellen gebildet, welche gegen das Antigen spezifische Antikörper bildet. Diese Zellen können aus der Milz des Versuchstieres isoliert werden. B-Zellen selbst zeigen allerdings (je nach Differenzierungsstadium) keine Proliferation und können nicht für eine großtechnische Herstellung verwendet werden. Um dies zu erreichen, werden sie mit Myelomzellen (wie zum Beispiel NS0-Zellen) fusioniert. Die fusionierten Zellen zeigen anschließend beide relevanten Eigenschaften der Ausgangszellen: Sie produzieren Antikörper und sie sind in der Lage, sich unbegrenzt zu teilen. Die Fusionierung

geschieht durch die Zugabe von Chemikalien (zum Beispiel Polyethylenglycol (PEG)) oder durch Elektrofusion, einem Vorgang, welcher der Elektroporation ähnlich ist. Nach der Fusionierung folgt eine Selektion der Zellen. Dabei werden Hybridomzellen ausselektiert, die aus B-Zellen und Myelomzellen entstanden sind. Dazu wird ein Gendefekt in den Myelomzellen ausgenutzt, welche auf die Zugabe von Purinderivaten im Medium angewiesen sind und infolgedessen nur in Form der Hybridzelle in einem Selektionsmedium überleben können. Nach einer sich anschließenden Einzelzellklonierung kann in den Überständen der so gebildeten Klone der Hybridomzellen die Produktion des gewünschten Antikörpers überprüft werden. Stabile Klone, welche den gewünschten Antikörper produzieren, werden als Zelllinie eingesetzt und in großtechnischen Prozessen verwendet (Nelson 2000). Die typische Zelldichte einer Hybridomzellkultivierung liegt bei  $6 \times 10^7$  Zellen/ml in einem *Fed-Batch*-Prozess (Zhang 2004).

### 2.1.3. STOFFWECHSELEIGENSCHAFTEN VON ZELLINIEN

Glutamin stellt neben Glucose eine der Hauptenergiequellen für Säugetierzelllinien dar. Das aufgenommene Glutamin wird über die Glutaminolyse zu Glutamat, Aspartat,  $\text{CO}_2$ , Lactat, Ammonium, Alanin und Citrat umgewandelt. Ein Großteil (circa 50%) wird dabei in Alanin umgewandelt (Petch 1994). Das entstehende Ammonium, welches während des Kultivierungsverlaufes im Medium akkumuliert, hat negative Effekte auf die Wachstumseigenschaften der Zellen. Für Hybridomzellen sind diese Effekte ab einer Konzentration von 3 mM beobachtet worden (Reuveny 1986; Dodge 1987).

Abbildung 2 zeigt die Haupt-Energiestoffwechselwege der Zelle. Gezeigt sind die Glycolyse, der Citratzyklus und die Glutaminolyse in vereinfachter Form.

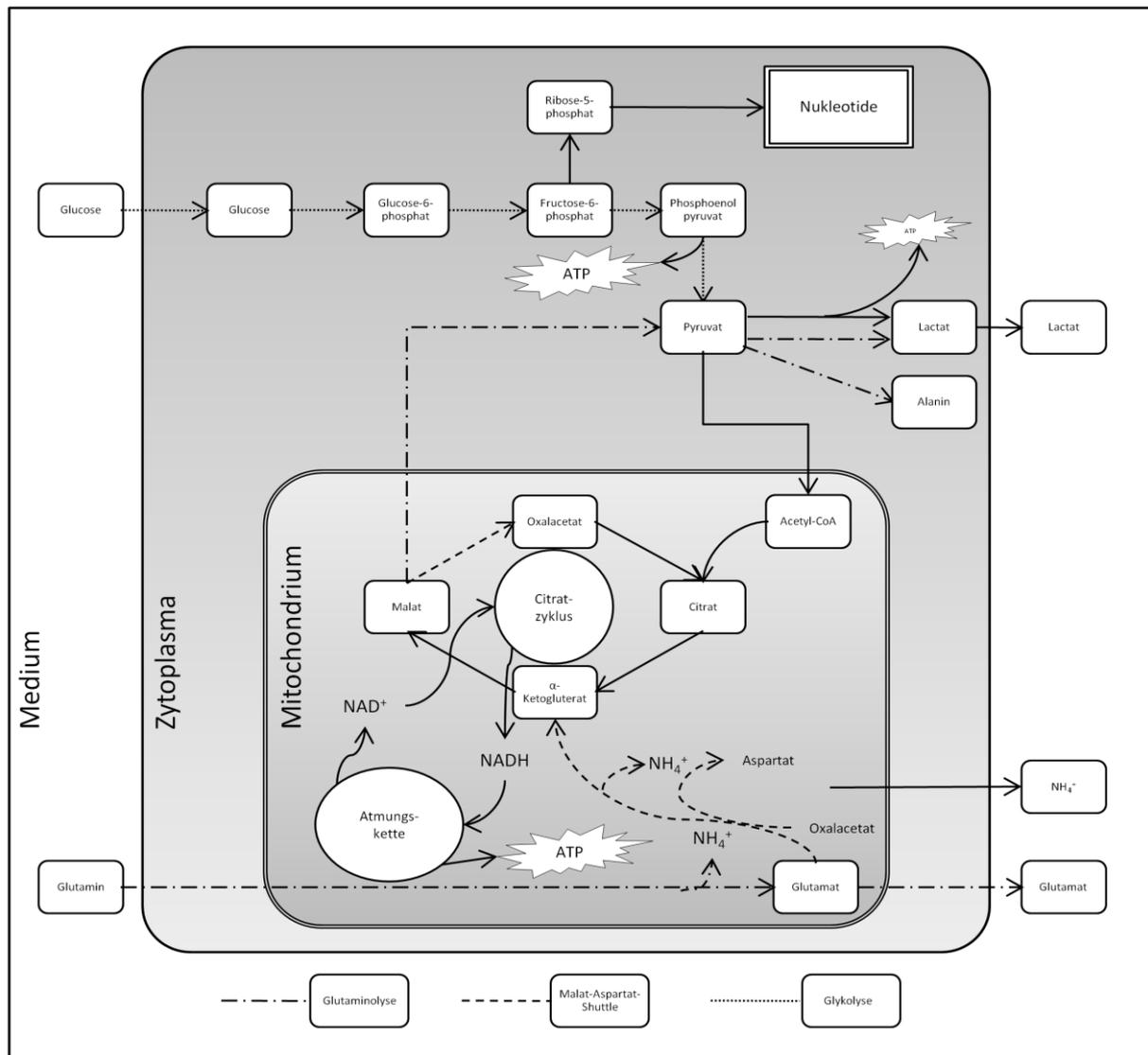


ABBILDUNG 2 - DARSTELLUNG DER HAUPT-ENERGIESTOFFWECHSELWEGE DER ZELLE. GEZEIGT SIND DIE GLYKOLYSE, DIE MILCHSÄUREGÄRUNG, DER CITRATZYKLUS, DIE GLUTAMINOLYSE UND RELEVANTE TEILE DES MALAT-ASPARTAT-SHUTTLES. DIE DARSTELLUNG IST ZUR ÜBERSICHT AUF DIE BETEILIGTEN STOFFE REDUZIERT WORDEN, VERÄNDERT NACH (GAMBHIR 2003; BERG 2007; MULUKUTLA 2010)

Die Glutaminolyse gliedert sich in drei Teile. Zunächst wird Glutamin zu Glutamat und Ammonium desaminiert. Glutamat wird in weiteren Schritten zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt. Für den zweiten Teil werden Reaktionsschritte aus dem Citratzyklus und dem Malat-Aspartat-Shuttle rekrutiert. Das Malat-Aspartat-Shuttle ist für den indirekten Transport von NADH über die innere Mitochondrienmembran zuständig. Dabei werden Aspartat und  $\alpha$ -Ketoglutarat aus der Matrix in den Intrazellularraum befördert. Dort werden sie über Zwischenschritte reduziert, um NAD<sup>+</sup> zu bilden. Aus Aspartat wird Malat gebildet, welches zurück in die Matrix transportiert wird. Hier wird es über Zwischenschritte oxidiert, wobei wiederum Aspartat und NADH gebildet wird (Berg 2007).

Im Rahmen der Glutaminolyse wird aus dem gebildeten  $\alpha$ -Ketoglutarat über Zwischenschritte des Citratzyklus Malat gebildet. Dieses wird von dem Enzym Malat-Decarboxylase (MD) zu Pyruvat decarboxyliert. Das Pyruvat wird wiederum für die Energiegewinnung zu Lactat oder für die Proteinsynthese zu Alanin umgewandelt (Mulukutla 2010).

Bei kontinuierlich wachsenden Zelllinien wird ein Großteil der aufgenommenen Glucose in Lactat umgewandelt. Über 80 % des in der Glycolyse gebildeten Pyruvats werden bei der Milchsäuregärung durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) in Lactat umgewandelt. Die umgesetzte Menge schwankt von Zelllinie zu Zelllinie bis zu über 99 % (Lanks 1988; Neermann 1996). Durch diesen Effekt reichern sich während eines typischen Säugetierzellen-Prozessverlauf bis über 4,5 g/l Lactat im Medium an (Mulukutla 2010). Die Anreicherung von Lactat im Kultivierungsmedium hat einen negativen Effekt auf das Zellwachstum und die Produktivität (Omasa 1992; Ozturk 1992; Lao 1997).

Als Ursache für dieses Phänomen werden verschiedene Faktoren diskutiert. Häufig wird die verringerte Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (DPC) aufgeführt, welcher Pyruvat decarboxyliert und dem Citratzyklus zuführt, sowie das Enzym Pyruvatcarboxylase (PC), welches an analplerotischen Reaktionen beteiligt ist (Fitzpatrick 1993; Petch 1994). Die Wirkungsweise der Enzyme ist Abbildung 3 zu entnehmen.

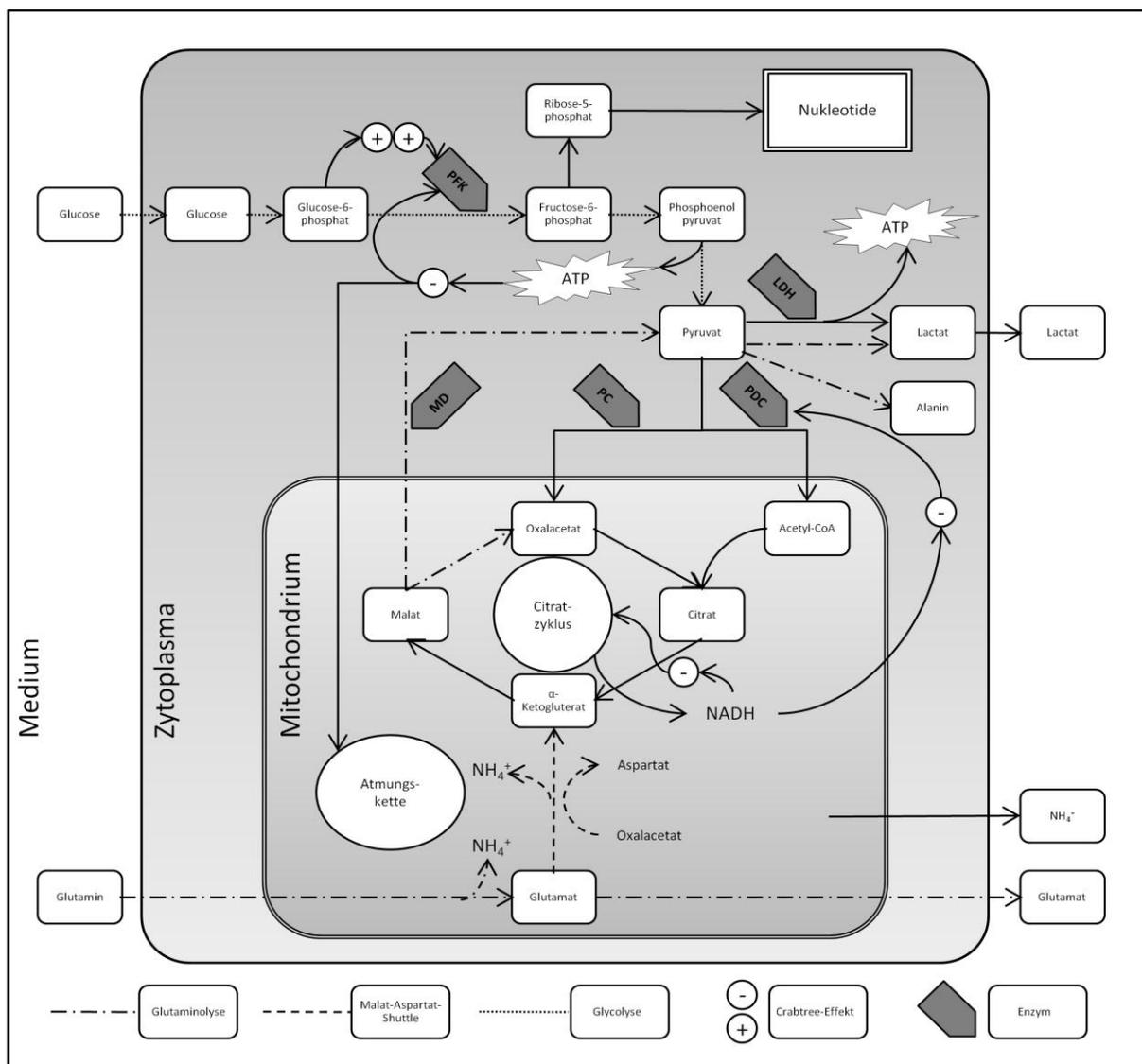


ABBILDUNG 3 - DARSTELLUNG DER HAUPT-ENERGIESTOFFWECHSELWEGE DER ZELLE. GEZEIGT SIND DIE GLYCOLYSE, DIE MILCHSÄUREGÄRUNG, DER CITRATZYKLUS, DIE GLUTAMINOLYSE UND RELEVANTE TEILE DES MALAT-ASPARTAT-SHUTTLES, SOWIE DER CRABTREE-EFFEKT. DIE ENZYME PC UND PDC ZEIGEN EINE VERRINGERTE AKTIVITÄT (PETCH 1994). DIE DARSTELLUNG IST ZUR ÜBERSICHT AUF DIE BETEILIGTEN STOFFE REDUZIERT WORDEN, VERÄNDERT NACH (GAMBHIR 2003; BERG 2007; MULUKUTLA 2010; DIAZ-RUIZ 2011)

Als weitere Ursache wird der sogenannte Crabtree-Effekt genannt. Das beobachtete Phänomen, bei dem unter aeroben Bedingungen Gärungsprozesse ablaufen, wird hier durch die hohe Glucosekonzentration im Medium erklärt. Bei Hybridomzellen kommt es bei Glucosekonzentrationen von über 0,18 g/l im Medium aufgrund des reduzierten Ablaufes der oxidativen Phosphorylierung zu einer Abnahme des Sauerstoffumsatzes (Barnabe 2000). Die hohe Glucoseaufnahme führt zu einer Anreicherung von Fructose-6-Phosphat, dessen Bildung unter normalen Bedingungen durch eine Feedback-Hemmung durch ATP inhibiert wird. Die Anreicherung von Fructose-6-Phosphat führt allerdings zu einer Überlagerung dieser Hemmung und somit zu einer Anreicherung von ATP im Zytosol. Dies wiederum hat eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und einem Anstieg der NADH-Konzentration in den Mitochondrien zur Folge. Aus der hohen NADH-Konzentration resultiert eine Hemmung des Citratzyklus, wodurch sich Pyruvat im Zytosol anreichert und kein NAD<sup>+</sup> bereitgestellt werden kann. Um dennoch eine Bereitstellung von NAD<sup>+</sup> zu ermöglichen, wird Pyruvat zu Lactat umgewandelt. So findet unter aeroben Bedingungen Gärung statt (Link 2003). Der Crabtree-Effekt und die damit verbundene hohe Lactatproduktion werden auch bei Tumorzellen beobachtet. In Kombination mit einer Überexpression der Lactatdehydrogenase und weiterer veränderter Enzymaktivitäten ist dieser Effekt als Warburg-Effekt bekannt (Diaz-Ruiz 2011; Herling 2011). Abbildung 3 stellt schematisch den Einfluss des Crabtree-Effektes auf die Energiestoffwechselwege der Zelle dar.

Als dritte Ursache für die erhöhte Lactatbildung wird in der Literatur eine Anreicherung von NADH im Zytosol beschrieben. Ursache hierfür ist die geringe Aktivität des Malat-Aspartat-Shuttles, welches NADH aus dem Zytosol in die Mitochondrien transportiert. NADH, welches bei der Glycolyse gebildet wird, verschiebt das Gleichgewicht der Lactatbildungs-Reaktion in Richtung des Lactats (Perez-Rodriguez 1987). Die Beteiligung des Malat-Aspartat-Shuttles an der Glutaminolyse widerspricht der Theorie eines Defekts dieses Transportersystems. Denkbar wäre eine Überlastung des Shuttles durch die starke Glutaminolyse bei dem Transport von Malat, als Zwischenprodukt der Lactat- und Alanin-Bildung.

#### 2.1.4. ERSTELLUNG VON ZELLINIEN

Für die Generierung von Produktionszelllinien wird das GOI, in der Regel zusammen mit einem Selektionsmarker, in die Zellen eingeschleust. Ein Selektionsmarker ist notwendig, da die Transfektionseffizienz je nach verwendeter Methode sehr unterschiedlich sein kann. Im Durchschnitt liegt diese bei 30 % (Xiong 2005). Nach der Transfektion schließt sich eine Selektionsphase an, in welcher die Zellen auf ihre Fähigkeit zu Expression des GOI mit Hilfe des Selektionsmarkers selektiert werden. Anschließend erfolgt eine Selektion nach der Produktivität und eventuell nach anderen Eigenschaften, wie zum Beispiel Proliferationsverhalten aus Einzelklonen der Zellen. Dann erst können die Zellen für die Produktion eingesetzt werden. Diese Vorgänge nehmen in der Regel mehrere Monate in Anspruch (Seth 2007).

Verschiedene Studien zeigen, dass das Level der GOI-mRNA direkt mit der Produktivität korreliert (Borth 1999; Fann 1999; Jiang 2006). Dies liegt unter anderem an einer höheren Zahl an Kopien des

GOI, die in das Genom integriert sind. So sind Zellen, welche einen Selektionsmarker tragen und dem entsprechendem Selektionsdruck ausgesetzt sind, mit einer hohen Anzahl an Kopien in ihrem Genom versehen (Kaufman 1981; Strutzenberger 1999; Fann 2000).

Über die Verwendung von Selektionsmarkern soll sicher gestellt werden, dass die transfizierten Zellen das gewünschte Protein exprimieren. Durch Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks soll gewährleistet sein, dass diese Eigenschaft nicht verloren geht.

Die häufig verwendete Zelllinie CHO-DG44 ist eine auxotrophe Mutante, die das Enzym DHFR nicht exprimiert. DHFR reduziert Folsäure zu Tetrahydrofolsäure, welche als Co-Substrat an der Biosynthese von Purinen beteiligt ist. Aus Purinen werden in der Zelle die Nukleotide Adenin und Guanin synthetisiert. Ebenso wirken sie als Co-Substrat des Enzyms Thymidylat-Synthase, welche das Nukleotid Thymidinmonophosphat synthetisiert (Klon 2002). Es ist üblich, bei der Transfektion ebenfalls Gene für DHFR als Selektionsmarker in das Genom zu integrieren. Um DHFR-negativen (DHFR<sup>-</sup>) Zellen die Synthese von DNA zu ermöglichen, werden dem Medium die Purinderivate HT zugegeben (Ringold 1981). Eine Selektion erfolgreich transfizierter Zellen erfolgt durch den Einsatz von HT-freiem Medium. Häufig wird ein zusätzlicher Selektionsdruck durch Zugabe von Methotrexat (MTX) erzeugt, welches DHFR inhibiert. So können innerhalb einiger Wochen Zellen selektiert werden, welche mehrere Kopien des Selektionsmarkers tragen und damit auch des GOI tragen. Diese Methode wurde bereits in den achtziger Jahren etabliert und ist heute noch gängig (Ringold 1981; De Jesus 2011).

Ein weiterer, häufig verwendeter Selektionsmarker ist die GS. In NS0-Zellen und einigen CHO-Stämmen wird dieses Enzym nicht oder nur gering exprimiert, so dass den Zellen Glutamin zugeführt werden muss. Wird GS zusammen mit den Genen für das GOI transfiziert, kann als Selektionsdruck Medium ohne Glutaminzusätze verwendet werden (Butler 2005). Ein zusätzlicher Selektionsdruck zur Amplifizierung des GOI kann durch Verwendung von Methioninsulfoximin (MSO oder auch MSX) erreicht werden (Barnes 2000).

Weitere Selektionsmarker stellen Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika dar. Zu diesen gehören Geneticin (Davies 1980), Hygromycin (Blochlinger 1984), Neomycin (Hermonat 1984) und Zeocin (van Blokland 2007).

Die Reduzierung des Selektionsdruckes führt häufig dazu, dass die Fähigkeit zur Produktion des GOI zurückgeht. So zeigen nur circa 20 % aller Zelllinien ihre ursprüngliche Produktivität in Abwesenheit des Selektionsdruckes. Hier geht die Produktivität über einen Kultivierungszeitraum von sechs Monaten zurück. Dieser Verlust ist unabhängig von der Methode der Transfektion (Chenuet 2008; De Jesus 2011).

Es können allerdings auch Fälle auftreten, bei denen die Expression des GOI im Laufe der Zeit abnimmt, ohne dass der Selektionsdruck entfernt wird oder eine geringere Anzahl an Genen des GOI in den untersuchten Klonen vorliegen. Dies betrifft sowohl Zelllinien mit dem Selektionsmarker DHFR (Kim 1998; Fann 2000) als auch mit dem Selektionsmarker GS (Barnes 2001; Jun 2006).

Diese Zelllinien zeigen neben einer vergleichsweise niedrigen Produktivität auch ein niedriges Level an mRNA des GOI. Dies lässt den Schluss zu, dass die Transkription des GOI graduell zurückgeht. Bei diesen sogenannten *gene silencing* Effekten sind insbesondere Modifikationen der Histone und die

Methylierung der DNA von Bedeutung (Yang 2010). Histone sind Proteine, die nur in eukaryotischen Zellkernen vorkommen. Die DNA ist zur Kompaktierung um diese gewickelt. Eine weitere Funktion der Histone ist die Möglichkeit, durch ihre Modifikationen bestimmte DNA-Bereiche für die Transkription zugänglich zu machen. So sind Bereiche, die eine sehr kompakte Struktur aufweisen, das Heterochromatin, nicht für die Transkription zugänglich. Gesteuert werden diese Eigenschaften durch verschiedene Modifikationen der Histone, wie zum Beispiel Methylierungen, Acetylierungen oder Phosphorylierungen (Jenuwein 2001; Kim 2009).

Bei der DNA-Methylierung werden einzelne Basen der DNA durch das Enzym DNA-Methyltransferase methyliert. Diese Modifikation spielt bei eukaryotischen Zellen während der Embryonal- und Gametenentwicklung eine Rolle. In adulten Zellen, welche die Produktionszellen darstellen, dienen sie zum Schutz der DNA vor endogenen Transposons (Kim 2009). DNA-Bereiche, welche keine Methylierungen tragen, zeigen in der Regel eine höhere Transkriptions-Aktivität. Hier handelt es sich zum Beispiel um Bereiche, welche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren darstellen (Reik 2001; Fan 2007).

Zurzeit gibt es keine Möglichkeiten, die aufgeführten Effekte der Reduktion der Produktivität zu identifizieren, beziehungsweise für eine Zelllinie vorherzusagen. Allerdings gibt es Methoden, welche diese Effekte reduzieren oder umgehen können.

Eine Möglichkeit stellt die Flankierung des GOI mit sogenannten *anti-repressor elements* dar. Dies sind DNA-Fragmente, welche zusammen mit dem GOI in einem Vektor transzfiziert werden. Die Co-Transfektion führt nicht nur zu einer erhöhten Produktivität, sondern auch zu einer stabilen Transfektion und somit zu einer Expression der GOI über mehrere Monate. Bei den *anti-repressor elements* handelt es sich um DNA-Sequenzen, die durch einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus die Histone-Deacetylierung durch sogenannte *Polycomb-group* (PcG) Proteine verhindern. So wird ein *gene silencing* durch die Bildung von Heterochromatin vermieden (Kwaks 2003; Otte 2007).

Zur Verhinderung von *gene silencing* Effekten, welche durch die Methylierung von DNA verursacht werden, können UCOE (*ubiquitous chromatin opening elements*) eingesetzt werden. Diese flankieren das GOI und bestehen aus Sequenzfragmenten, welche im Wirt zu den *house keeping genes* gehören (Zhang 2010).

Weiterhin gibt es die Möglichkeit des *gene targeting*. Bei den üblichen Transfektionsmethoden wird das GOI an zufälligen Stellen in das Genom integriert. Dadurch kann die Expression von den Eigenschaften des Locus im Gen abhängig sein. Die Nähe zu einem Repressor oder die Lage im Heterochromatin kann zu einer geringen Expression des GOI führen. Beim *gene targeting* wird das GOI durch den Einsatz von spezifischen Rekombinasen in einen Bereich des Genoms integriert, welcher nicht solchen negativen Regulationen unterworfen ist (Zhou 2010). Durch den Einsatz dieser Technik wurden, verglichen mit einer zufälligen Integration des GOI, eine bis zu 60-fach höhere Expressionsrate in CHO-Zellen beobachtet (Thyagarajan 2005).

## 2.2. IDENTIFIKATION VON HOCH-PRODUZENTEN

Die Selektion von erfolgreich transfizierten Zellen über die Co-Transfektion von Selektionsmarkern stellt eine zuverlässige Methode zur Selektion dar. Über einen gerichteten Selektionsdruck bietet es darüber hinaus die Möglichkeit, Zellen mit mehreren Kopien des GOI zu erhalten und somit Zelllinien mit relativ hoher Produktivität zu erhalten. Dazu wird schrittweise der Selektionsdruck erhöht. So kann zum Beispiel eine sukzessive Erhöhung von MTX oder GS zur Selektion von Zellen mit mehreren Kopien des GOI führen. Wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben, muss dieser Effekt allerdings nicht stabil sein.

Zahlreiche weitere Methoden zur Erhöhung der Produktivität von Zelllinien, die nicht auf gentechnische Modifikationen oder den Einsatz von Selektionsmarkern basieren, werden in der Literatur beschrieben.

### 2.2.1. EINZELZELLKLONIERUNG

Eine häufig verwendete Methode ist die Einzelzellklonierung. Hierbei werden Zellen in Suspension verdünnt und auf Mikrotiterplatten verteilt. Dabei soll, statistisch nur eine Zelle in ein *well* gelangen. Ziel ist es hier, homogene Populationen zu erhalten, welche dann auf ihre Produktivität oder andere Eigenschaften hin untersucht werden können.

Diese Methode ist eine kostengünstige Alternative, wenn die nötigen Geräte, wie zum Beispiel automatisierte Systeme (siehe unten) nicht zur Verfügung stehen. Allerdings birgt sie einen großen Zeit- und Arbeitsaufwand. Die Zellen benötigen mehrere Wochen, bis ausreichend Material für die entsprechenden Tests zu Verfügung steht. Des Weiteren sollten mehrere hundert Ansätze parallel durchgeführt werden, da nur ein geringer Teil der Zellen wachsende Populationen hervorbringt. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass diese Methode auf einer zufälligen Selektion basiert und die Möglichkeit besteht, dass keiner der Ansätze die gewünschten Ergebnisse zeigt. Auch ist es möglich, dass erwünschte Eigenschaften, wie die Erhöhung der Produktivität, zusammen mit unerwünschten Eigenschaften der Zellen selektiert werden. So könnte eine neue Population zum Beispiel einen nicht optimalen Energiemetabolismus oder eine geringe Wachstumsrate zeigen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass auch bei ausreichender Verdünnung die Wahrscheinlichkeit besteht, dass mehrere Zellen in ein *well* gelangen. So ist eine Monoklonalität der Zellen durch dieses Verfahren nicht immer gewährleistet (Coller 1986; Underwood 1988; Caron 2009).

Sinnvoller ist es, die Zellen gezielt nach bevorzugten Eigenschaften zu selektieren. Dazu muss zunächst ein Assay durchgeführt werden, welches ermöglicht, einzelne Zellen oder eine Subpopulation mit den gewünschten Eigenschaften zu identifizieren. Anschließend bedarf es eines Selektionsverfahrens, welches erlaubt, dass diese Zellen mit großer Reinheit vom Rest der Population getrennt werden. Sowohl das Assay als auch das Separationsverfahren muss unter sterilen Bedingungen durchführbar sein und gewährleisten, dass die Zellen den Vorgang unbeschadet überstehen. Für die Separation ist FACS (*fluorescence-activated cell sorting*, fluoreszenzbasierte Zellsortierung) das Mittel der Wahl.

### 2.2.2. IMMOBILISIERUNGSASSAYS

Um die Produktivität von einzelnen Zellen innerhalb einer Population zu quantifizieren, ist es nötig Assays zu verwenden, mit denen sich die Produktivität auf Einzelzellniveau quantifizieren lässt.

Eine Möglichkeit hierzu ist die Immobilisierung des Produktes auf der Zelloberfläche direkt nach der Sezernierung. Dazu wird ein molekulares Konstrukt auf der Zelloberfläche gebunden, welches eine Affinität zu dem Produkt besitzt. Wenn die Zelle dann das Produkt sezerniert, bindet es direkt an dieses Konstrukt und kann mittels Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden. Für den Nachweis von Proteinen bieten sich Fluorophor-gekoppelte Antikörper an. Bei Zellen, die nach der Färbung eine starke Fluoreszenz zeigen, wird davon ausgegangen, dass sie mehr Produkt sezerniert haben als Zellen mit geringerer Fluoreszenz. Anschließend können die Zellen per FACS separiert werden. Hierbei ist sowohl eine Einzelzellsortierung möglich, als auch eine *bulk*-Sortierung, bei der mehrere Zellen mit den gewünschten Eigenschaften separiert werden. Letzteres erspart ein zeitaufwendiges Heranwachsen der neuen Population.

Das Affinitäts-Matrix-Assay (*affinity matrix*) stellt einen dieser molekularen Anker dar. Hierbei wird ein Antikörper, welcher für das Produkt spezifisch ist, auf der Zelloberfläche gebunden. Dieser dient dazu, das Produkt nach der Sezernierung abzufangen. Anschließend können die Zellen mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper, welcher spezifisch für das Produkt ist, gefärbt werden.

Zur Durchführung dieses Assays wird die Zelloberfläche der eingesetzten Zellen biotinyliert. Dazu wird NHS-Biotin (Sulfosuccinimidyl-Biotin) eingesetzt, welches unspezifisch an Aminogruppen von Oberflächenproteinen bindet. An dieses wird anschließend ein Avidin-gekoppelter Antikörper gebunden, welcher spezifisch für das Produkt der Zellen ist. Es folgt das *capturing* (Abfangen) des Produktes, welches von den Zellen sezerniert wird. Um eine Kreuzdetektion zu vermeiden, werden die Zellen dabei in Gelatine-haltigem Medium inkubiert, was die Diffusion des Produktes zwischen den Zellen reduzieren soll. Anschließend werden die Zellen mit einem Produkt-spezifischen Fluorophor-gekoppelten Antikörper gefärbt. Zellen, die eine starke Fluoreszenz zeigen, werden mittels FACS separiert und für den Aufbau einer neuen Population verwendet (Manz 1995). Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung des Assays.

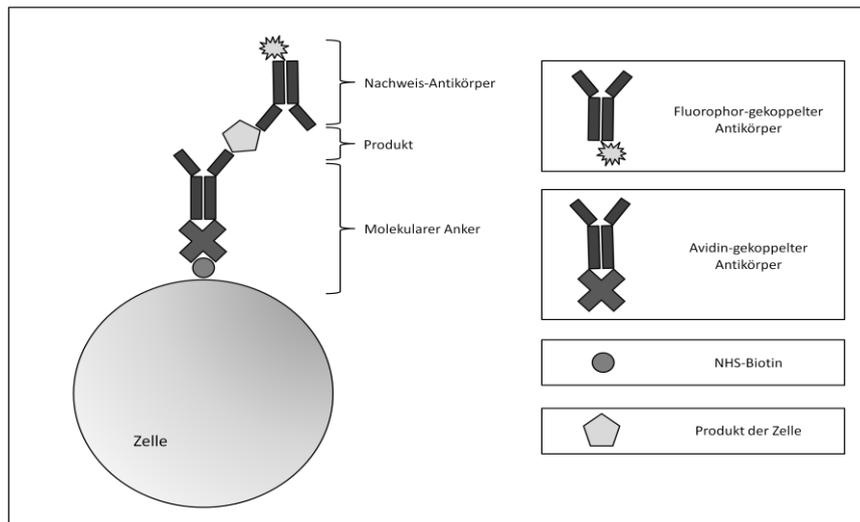


ABBILDUNG 4 - SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES AFFINITY MATRIX ASSAYS, NACH (MANZ 1995)

#### Kälte-Inkubationsassay

Eine weitere Möglichkeit, das Produkt auf der Zelloberfläche zu immobilisieren, ist eine kurzzeitige Inkubation der Zellen bei geringer Temperatur (*cold capture assay*). Dazu werden die Zellen bei 4 °C inkubiert und anschließend mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper, welcher für das Produkt spezifisch ist, gefärbt. Der Mechanismus der Immobilisierung ist nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass das Produkt kurzzeitig in der Glycokalyx der Zellen verbleibt und erst nach einiger Zeit abdiffundiert. Die Färbung ist bei niedriger Temperatur für mindestens 24 Stunden stabil und der Effekt bleibt auch bei Raumtemperatur noch für einige Stunden bestehen, so dass eine Sortierung per FACS durchgeführt werden kann. Die Viabilität der Zellen wird durch die geringe Temperatur nicht oder nur geringfügig beeinflusst. In Kombination mit einer Amplifizierung des GOI mittels einer MTX-Selektion kann eine Produktivitätssteigerung bis über das 100-fache erreicht werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass auf das aufwendige *capturing* verzichtet werden kann (Brezinsky 2003; Pichler 2009).

Für Hybridomzellen gibt es eine simple Möglichkeit Hochproduzenten zu identifizieren. B-Zellen, aus denen Hybridomzellen hergestellt werden, tragen ihre produzierten Antikörper auf der Zelloberfläche. In vielen Fällen gibt eine Korrelation zwischen sekretierten Antikörpern und diesen Oberflächen-Antikörpern. Somit ist es möglich, direkt die Oberflächenantikörper zu färben und damit die Produktivität der Zellen zu quantifizieren. Für die Färbung werden Ig (Immunglobulin)-spezifische Antikörper verwendet (Marder 1990; Sen 1990).

### Gel microdrop technology

Bei dieser Technik werden einzelne Zellen in *beads* (Kügelchen) aus biotinylierter Agarose eingeschlossen. Ähnlich wie bei dem *affinity matrix* Assay wird das Produkt über einen, mittels Avidin immobilisierten, Produkt-spezifischen Antikörper gebunden und in der Peripherie der Zelle zurückgehalten. Nach einer Färbung des Produktes mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper können die *beads* mittels FACS sortiert werden (Abbildung 5). *Beads*, die Zellen mit einer hohen Produktivität enthalten, zeigen eine starke Fluoreszenz und diese können für die Bildung einer neuen Population eingesetzt werden (Powell 1990; Weaver 1997).

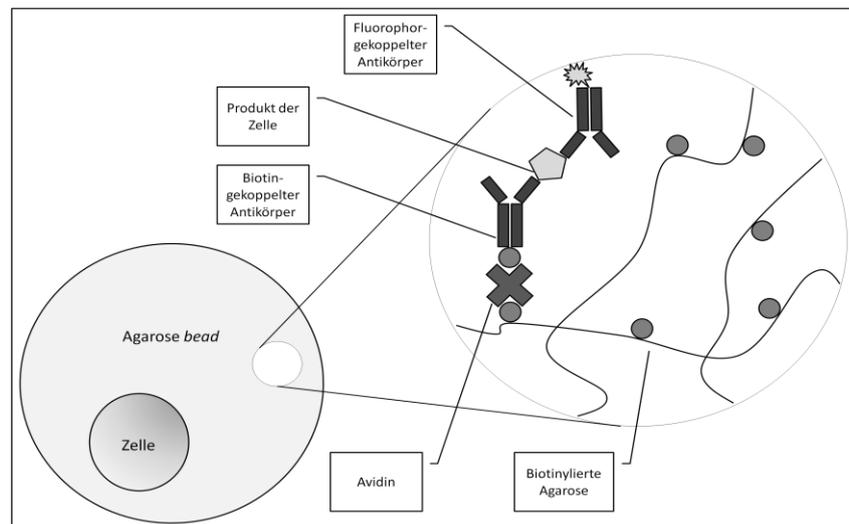


ABBILDUNG 5 - SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GEL MICRODROPLET TECHNOLOGY, NACH (WEAVER 1997; BROWNE 2007)

### 2.2.3. WEITERE SELEKTIONSSYSTEME

#### Co-Expression von GFP

GFP (*green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein) ist einer der gängigen Marker für Genexpression. Durch die Co-Expression mit dem GOI ist es möglich, die Produktivität mit der GFP-Fluoreszenz zu korrelieren. Allerdings kann eine hohe GFP-Konzentration in den Zellen zu einem Anstieg der Apoptoserate führen (Liu 1999).

#### MACS

MACS (*magnetic cell sorting*, Magnetische Zellsortierung) der Firma Miltenyi Biotec wird hauptsächlich für die Separation von Immunzellen eingesetzt. Dabei werden Antikörper verwendet, welche an magnetische Partikel gekoppelt sind. Zellen, die diese Antikörper auf der Oberfläche binden, können in einem Magnetfeld zurückgehalten und wieder eluiert werden. Das *cytokine secretion assay* (Miltenyi Biotec) bietet darüber hinaus die Möglichkeit, über bispezifische Antikörper-Konjugate sekretierte Produkte auf der Zelloberfläche zu immobilisieren. Ein Teil des Konjugats bindet an die Zelloberfläche während, der andere spezifisch für das Produkt ist und dieses somit auf

der Zelloberfläche immobilisiert. Über einen zweiten, mit einem magnetischen Partikel-gekoppelten Antikörper können dann die Zellen markiert werden (Hoch 2010).

LEAP (*laser-enabled analysis and processing*, Laserbasierte Analyse und Verarbeitung)

Die Zellen werden auf einer *Capture*-Matrix ausgesät welche eine für das Produkt spezifische Komponente enthält. So wird das Produkt in der Peripherie der Zelle zurückgehalten und kann dort durch Antikörper nachgewiesen werden. Zellen, die in ihrer Peripherie keine oder nur geringe Mengen des Produktes zeigen, werden durch einen Laser lysiert und somit aus der Population entfernt. Durch diese Methode ist eine Steigerung der Produktivität um das 5- bis 20-fache möglich (Hanania 2005).

#### Automatisierte Systeme

Für die Selektion von Hochproduzenten können auch automatisierte Systeme, wie ClonePix (Genetix, Großbritannien) oder CellCelector (ALS, Deutschland) eingesetzt werden. Über spezielle Pipetten können diese Systeme mittels einer computergestützten Bilderkennung Zellen einzeln auswählen und umsetzen. Die Einzelzellen werden in viskosem Medium immobilisiert und dort kultiviert. Das sekretierte Produkt wird somit in der Nähe der jeweiligen Zellen zurückgehalten. Die Produktivität kann durch Zugabe von Produkt-spezifischen Fluoreszenz-gelabelten Antikörpern erfasst werden. Über das System können gewünschte Zellen ausgewählt und isoliert werden (Caron 2009).

Über das Cello-System (TAP-Biosystems) können ebenfalls automatisch Einzelzellklone erstellt werden. Dies wird in diesem System über Verdünnungsschritte erreicht. Das Gerät ermöglicht einen hohen Durchsatz durch die gleichzeitige Verwendung von bis zu 800 96-*well*-Platten. Passagieren von Suspensionszellen und adhärenen Zellen, sowie Probenentnahmen finden in einem sterilem geschlossenen System statt (Browne 2007).

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Vor- und Nachteile der verschiedenen Selektionsmethoden.

**TABELLE 1 - VOR- UND NACHTEILE DER UNTERSCHIEDLICHEN SELEKTIONSMETHODEN VON HOCHPRODUZENTEN, VERÄNDERT NACH (BROWNE 2007)**

<b>Methode</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Einzelzellklonierung	Kostengünstig	Zeitaufwendig, Monoklonalität nicht gewährleistet
Co-Expression von GFP	Keine spezifischen Antikörper nötig	Toxizität von GFP in der Zelle
Immobilisierungsassays	Geringer Zeitaufwand	Spezifische Antikörper nötig, Aufwendige Optimierung für jede Zelllinie nötig
Kälte-Inkubationsassay	Geringer Zeitaufwand	
Gel microdrop technology	Hohe Sensitivität	Benötigt Erfahrung
MACS	Geringer Zeitaufwand	Kein hoher Durchsatz möglich
LEAP	Automatisiert	Kostenintensiv
Automatisierte Systeme	Automatisiert	Kostenintensiv

## 3. EXPERIMENTELLER TEIL

---

### 3.1. EINLEITUNG

Der experimentelle Teil dieser Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte.

Der erste Abschnitt beschreibt die Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Activin A aus CHO-Zellen. Hier wird zunächst auf die Erstellung der Zelllinie eingegangen. Anschließend wird die Kultivierung der Zellen beschrieben und die Etablierung der ersten Schritte des Aufreinigungsprozesses dargestellt. Zudem wird ein Aktivitätstest für Activin A etabliert.

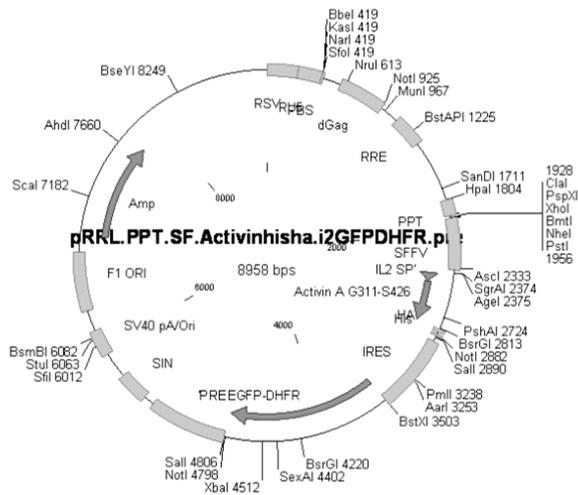
Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Optimierung einer Zelllinie mittels durchflusszytometrischer Verfahren. Diese werden mit Hilfe einer Modellzelllinie, der Hybridomzelllinie SC-71, entwickelt. Es wird eine Methode zur Steigerung der Produktivität etabliert, welche keine komplexen Färbemethoden verwendet und auf die Anwendung einer zeitaufwendigen Einzelzellklonierung verzichtet.

### 3.2. PRODUKTION UND AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEN ACTIVIN A IN CHO-ZELLEN

In diesem Teil werden Versuche zur Produktion und Aufreinigung eines rekombinanten Proteins aus Säugetierzellen gezeigt. Die verwendeten CHO-Zellen werden dazu zunächst mit dem Gen für das Zytokin Activin A transfiziert. Es folgt die Produktion des Proteins im Bioreaktor und eine anschließende Aufreinigung mittels chromatographischer Methoden. Ein Test für die Überprüfung der Bioaktivität des Activin A wird im Anschluss dargestellt.

#### 3.2.1. ERSTELLUNG DER CHO-ZELLINIE

Die verwendete CHO<sup>SFS</sup>-Zelllinie wurde im Institut für Experimentelle Hämatologie der MHH lentiviral transfiziert (Schambach 2006a; Schambach 2006b). Ein Vektor für humanes Activin A und den Selektionsmarker DHFR wurden dabei stabil in das Genom integriert. Zur Sekretion von Activin A, wurde das Protein mit einer Signalsequenz versehen. Um die Aufreinigung zu erleichtern und eine Detektion mittels Western Blot zu ermöglichen, wurden an das C-terminale Ende der Untereinheiten zwei Protein-tags angefügt. Hierbei handelt es sich um ein His (Histidin)-tag und ein HA (Hämagglutinin)-tag. Abbildung 6 zeigt das transfizierte Plasmid.

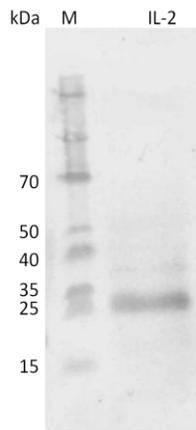


**ABBILDUNG 6 - VERWENDETER PLASMID FÜR DIE HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN CHO-ZELLEN**

Eine Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus aufgeschlossenen Säugetierzellen ist mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Die große Menge an zelleigenen Proteinen (*host cell proteins*; HCP) und die geringe Expressionsrate des rekombinanten Proteins erhöhen die Anzahl der nötigen Aufreinigungsschritte und erfordern eine intensive Optimierung dieser. Dies wurde in der Diplomarbeit von Estabraq Abdulkerim (2010) und der Bachelorarbeit von Christopher Goße (2009) gezeigt.

Aus diesen Gründen wurde zunächst die Sekretion des Activin A sicher gestellt. In einem ersten Schritt wurden dazu unterschiedliche Signalpeptide für die Sekretion von Activin A untersucht: die native Signalsequenz, die Sequenz für murines IgG $\kappa$  (Immunglobulin G Isotyp  $\kappa$ ), Interleukin-2 (IL-2) und die Sequenz für Luciferase aus *Gaussia princeps*. Eine Sekretion mit Hilfe dieser Signalsequenzen wurde bereits für andere rekombinante Proteine aus CHO-Zellen gezeigt (Liu 1997; Knappskog 2007; Haake 2012).

Nach der Transfektion mit den vier verschiedenen Varianten des Plasmids wurde im Institut für Technische Chemie jede Zelllinie auf ihre Fähigkeit zur Sekretion mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft (5.3.2.1, 5.3.2.2). Dazu wurde nach einer dreitägigen Kultivierung jeweils ein Zellaufschluss aus  $1 \times 10^6$  Zellen sowie 1 ml Zellkulturüberstand verwendet (5.3.1.1, 5.3.4.9). Abbildung 7 zeigt die Probe der Zelllinie, in welche der Vektor mit dem Signalpeptid von IL-2 transfiziert wurde.



**ABBILDUNG 7 - WESTERN BLOT ZUR KONTROLLE DER SEKRETION VON ACTIVIN A. M: MARKER; IL-2: PROBE AUS DEM ÜBERSTAND VON CHO-ZELLEN, TRANSFIZIERT MIT DEM SIGNALPEPTID FÜR INTERLEUKIN-2, GRÖÖE DER PROTEINE IN KDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (SM1841)**

Die Signalsequenzen von IgGk und die der Luciferase aus *G. princeps* führten nicht zu einer Sekretion des rekombinanten Activin A aus den jeweiligen Zelllinien ins Medium. Die für diese Signalsequenzen durchgeführten Western-Blots zeigten keine Banden in den Proben der Überstände (keine Abbildung).

### 3.2.2. KULTIVIERUNG VON CHO-ZELLEN/PRODUKTION VON ACTIVIN A

Nachdem die Zelllinie, welche eine Sekretion von Activin A zeigte, für die Produktion ausgewählt wurde, wurden die Zellen expandiert und eine Master-Zellbank angelegt. Die Zelllinie wurde hierzu fünfmal passagiert, alle Zellen in frisches Medium überführt und anschließend kryokonserviert (5.3.1.4). Die Expansion erfolgte zunächst in T-25-Flaschen bis zu einem Volumen von 5 ml. Für ein Volumen von bis zu 30 ml wurde die Expansion in T-75-Flaschen durchgeführt. Um den Erfolg der Konservierung zu überprüfen, wurden nach fünf Tagen die Zellen eines Kryogefäßes revitalisiert und auf ihre Wachstumsfähigkeit überprüft (5.3.1.4). Aus den Zellen dieser Kontrolle wurde wiederum nach weiteren fünf Expansionsschritten eine Arbeitszellbank angelegt, welche für die Durchführung der nachfolgenden Kultivierungen verwendet wurde.

Als Kultivierungsmedium wurde das Serum-freie Medium ProCHO5 verwendet. Die transfizierten Zellen trugen den Selektionsmarker DHFR<sup>+</sup>. Um einen Selektionsdruck zu generieren wird im verwendeten Kultivierungsmedium auf die Zugabe von Hypoxanthin und Thymidin verzichtet.

Zur Produktion des Activin A wurde eine Bioreaktorkultivierung durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Zellen in Erlenmeyerkolben expandiert. Die Bioreaktorkultivierung erfolgte in einem 1,5 l Edelstahlreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,1 l (5.3.1.1). Im Verlaufe der Kultivierung wurden zweimal täglich Proben entnommen. Eine Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität mittels Neubauer-Zählkammer erfolgte direkt im Anschluss an die Probenentnahme (5.3.1.5).

Um den Kultivierungsverlauf und die verwendeten Parameter zu überprüfen und eine vollständige Wachstumskurve zu erhalten, wurde zunächst eine Vorversuch-Kultivierung durchgeführt. Abbildung 8 zeigt den Verlauf dieser Kultivierung.

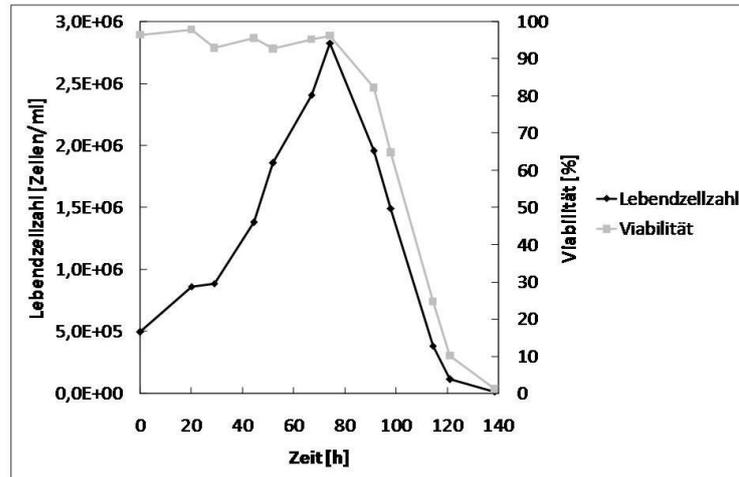


ABBILDUNG 8 - LEBENZZELLZAHL UND VIABILITÄT DER CHO-ZELLEN IM VERLAUF DER VORVERSUCH-BIOREAKTORKULTIVIERUNG ZUR ERSTELLUNG EINER WACHSTUMSKURVE

Es ist zu erkennen, dass bereits nach 74 Stunden die Viabilität stark sinkt und die Zellen in die Absterbephase übergehen. Eine Stationäre Phase ist in der Wachstumskurve nicht zu beobachten. Dies konnte bei allen weiteren Kultivierungen ebenfalls verzeichnet werden. Die transfizierte Zelllinie zeigt ein Wachstum, welches mit dem der untransfizierten Zelllinie ist (Vorversuche nicht gezeigt). Abbildung 9 zeigt den Verlauf der Zelldichte und der Viabilität der Bioreaktorkultivierung zu Produktion von Activin A.

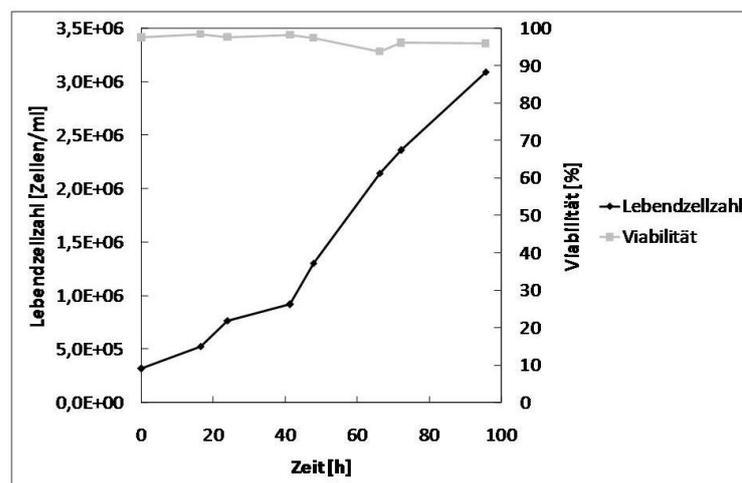


ABBILDUNG 9 - LEBENZZELLZAHL UND VIABILITÄT DER CHO-ZELLEN IM VERLAUFE DER BIOREAKTORKULTIVIERUNG ZUR PRODUKTION VON REKOMBINANTEN ACTIVIN A

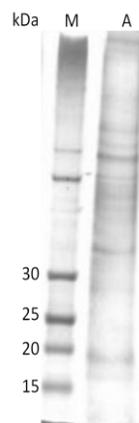
Die Zellen erreichten eine maximale Lebendzellzahl von circa  $3 \times 10^6$  Zellen/ml nach 96 Stunden Kultivierungsdauer. Die Bioreaktorkultivierung wurde abgebrochen sobald die im Vorversuch ermittelte maximale Zellzahl erreicht wurde. Die Beendigung erfolgte vor dem Erreichen der Absterbephase, um eine Verunreinigung des Mediums durch Proteine abgestorbener Zellen möglichst gering zu halten.

### 3.2.3. AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEN ACTIVIN A

Activin A besteht aus zwei Untereinheiten mit jeweils 116 Aminosäuren, welche ein Molekulargewicht von 12,8 kDa aufweisen. Hinzu kommen pro Untereinheit insgesamt 15 Aminosäuren der zwei *tags*. So erhöht sich die Größe auf circa 14,8 kDa pro Untereinheit. Laut Literatur beinhalten die Untereinheiten je vier intramolekulare Disulfidbrücke und werden durch eine weitere zu einem Dimer verknüpft (Stamler 2008). Das aufzureinigende Protein hat im nativen Zustand eine Gesamtgröße von 29,6 kDa.

Die Kultivierungen der CHO-Zelllinie erfolgten in Serum-freiem Medium. Durch den Verzicht auf Serum soll die Aufreinigung erleichtert werden, da diese dadurch nicht durch zusätzliche Fremdproteine erschwert wird. Im Überstand sind mittels SDS-PAGE dennoch zahlreiche weitere Proteine zu erkennen. Dabei handelt es sich um HCP, welche von den CHO-Zellen sekretiert werden und möglicherweise um intrazelluläre Proteine, die aus lysierten Zellen nach dem Absterben ausgetreten sind. Eine Bestimmung des Gesamtproteingehaltes im Überstand mittels eines Bradford-Assays ergab, dass nach einer dreitägigen Kultivierung ca. 75 µg/ml Protein enthalten ist (5.3.2.5).

Abbildung 10 zeigt ein SDS-PAGE-Gel von 10 µl Probe des zehnfach aufkonzentrierten Überstandes nach 3 Tagen Kultivierung. Es ist keine deutliche Bande der Activin A-Untereinheiten zu erkennen, die eine Größe von circa 15 kDa haben. Da die Nachweisgrenze einer Silberfärbung im Nanogramm-Bereich liegt, ist davon auszugehen, dass der Kultivierungsüberstand eine Activin A-Konzentration von unter 0,01 µg/ml enthielt. Verglichen mit modernen Produktionszelllinien ist diese Konzentration relativ gering (vergleiche 2.1.2).



**ABBILDUNG 10 - SDS-PAGE (12 %) ZUR VISUALISIERUNG DER PROTEINE IM ZELLKULTURÜBERSTAND, M: MARKER, A: PROBE, GRÖÖE DER PROTEINE IN kDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM0661), SILBERFÄRBUNG**

Aufgrund der geringen Konzentration im Kultivierungsüberstand wurde dieser für die nachfolgenden Aufreinigungsversuche aufkonzentriert. Dazu wurden zunächst die Zellfragmente durch Zentrifugation (15 min, 1000 × g) und anschließende Filtration (0,2 µm) entfernt. Es folgte eine Cross-Flow-Filtration (>3 kDa) unter gekühlten Bedingungen über 6 bis 8 Stunden (5.3.4.8). Der nun zehnfach aufkonzentrierte Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Durchführung der Aufreinigung wurden mehrere Strategien in Betracht gezogen. Da das rekombinante Activin A über einen His- und einen HA-tag verfügt, wurden zunächst entsprechende Affinitäts-Chromatographien für einen *Capture*-Schritt angewendet.

### 3.2.3.1. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Das rekombinante Activin A verfügt sowohl über ein His-als auch ein HA-tag und gehört zu TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*, transformierender Wachstumsfaktor) Proteinfamilie, welche spezifische Eigenschaften, sogenannte Heparinbindungsdomänen, besitzt (Oestereicher 2004). Diese Eigenschaften können für verschiedene Affinitätschromatographien genutzt werden.

#### IMAC-IDA

In den ersten Versuchen wurde die IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*, Metallchelate-Affinitätschromatographie) verwendet. Die ersten Versuche wurden unter dem Einsatz von IDA (Iminodiessigsäure)-Membranen als stationäre Phase durchgeführt.

Eine vorherige Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) des rekombinanten Activin A erfolgte über das Online-Tool *Compute pI/MW* (5.3.5.1). Da die tags beinahe 10 % der Größe der Untereinheiten ausmachen, wurden sie bei dieser Berechnung berücksichtigt. Der berechnete pI beträgt 6,6. Im Vergleich dazu beträgt der berechnete pI ohne die tags 7,1.

Für eine optimale Bindung des Zielproteins an die stationäre Phase sollte der pH-Wert des Bindungspuffers über dem isoelektrischen Punkt des Zielproteins liegen (Tsai 2002; Denizli 2003; Shi 2003; Wu 2003; Lakhiari 2004). Aus diesem Grund wurde für den Bindungspuffer ein pH-Wert von 7,6 gewählt. Außerdem ist eine Salzkonzentration von circa 500 mM zur Verhinderung von unspezifischen ionischen Wechselwirkungen im Bindungs- oder Waschungspuffer geeignet (Ueda 2003). Der Bindungspuffer wurde mit einer NaCl-Konzentration von 500 mM eingesetzt.

Für die Durchführung der Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde der zehnfach aufkonzentrierte Überstand über einen weiteren Schritt erneut fünffach aufkonzentriert. Dies erfolgte über eine Ultrafiltration (>3 kDa) mittels Zentrifugalkonzentratoren bei 4 °C (5.3.4.7). Eine weitere Aufkonzentration war in diesem Fall notwendig, weil der Überstand zur Umpufferung in Bindungspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 7,6) überführt wurde und somit wieder verdünnt wurde. Für die Versuche ist somit eine insgesamt fünffach aufkonzentrierte Probe eingesetzt worden.

Für die Aufreinigung wurde das automatische FPLC-System BioLogic DuoFlow von BioRad verwendet. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2  $\mu$ m) und im Ultraschallbad entgast. Die verwendeten IDA-Membranadsorber wurden mit 0,1 M Kupfersulfat-Lösung beladen. 1 ml des 50-fach aufkonzentrierten Überstands wurde in 9 ml Bindungspuffer gegeben und der pH-Wert eingestellt. Nach der Equilibrierung der Membran mit Bindungspuffer wurde die Membran mit der Probe beladen. Für die ersten Durchführungen wurden die Elutionen mit einem Stufengradient durchgeführt (50, 125, 190, 250 mM Imidazol in

Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,0)) (5.3.4.1). Abbildung 11 zeigt das FPLC-Chromatogramm unter den genannten Bedingungen.

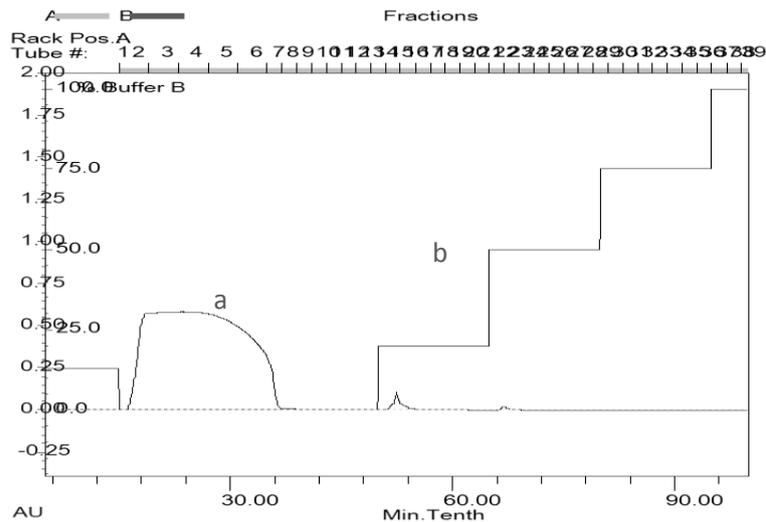


ABBILDUNG 11 - FPLC-CHROMATOGRAMM ZUR IMAC-Cu<sup>2+</sup>-IDA, X-ACHSE (UNTEN): VOLUMEN IN ML, X-ACHSE (OBEN): FRAKTIONEN, Y-ACHSE (LINKS): UV-ABSORPTION UND PUFFERZUSAMMENSETZUNG A: UV-INTENSITÄT, B: ANTEIL ELUTIONSPUFFER

Der *Peak* der Fraktionen 1-7 beinhaltet den Durchlauf der nicht-gebundenen Proteine. In den Elutionsfraktionen 15-16 ist ein *Peak* zu sehen, welcher gebundene Proteine beinhaltet. Zur Kontrolle des FPLC-Laufs wurden die Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (5.3.2.1, 5.3.2.2).

Abbildung 12 zeigt die Fraktionen des Durchlaufs und der Elution auf einem SDS-PAGE-Gel nach der Silberfärbung. In der Elutionsfraktion ist keine deutliche Bande der Untereinheiten von Activin A im erwarteten Größenbereich von 15 kDa zu erkennen.

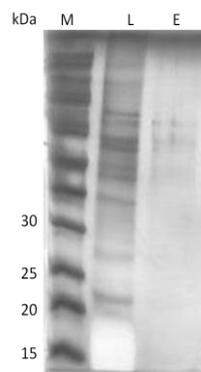


ABBILDUNG 12 - SDS-PAGE (12 %) ZUR VISUALISIERUNG DER AUFRÄUENIGUNG MITTELS IMAC-Cu<sup>2+</sup>-IDA, M: MARKER, L: DURCHLAUF, E: ELUTION, GRÖÖBE DER PROTEINE IN kDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM0661), SILBERFÄRBUNG

Der durchgeführte Western Blot zeigt, dass die Elutionsfraktionen kein Activin A enthielten. In den Fraktionen des Durchlaufes konnte es jedoch nachgewiesen werden (keine Abbildung). Es ist möglich, dass unter diesen Bedingungen kein Activin A an die Membran gebunden wurde. Möglich ist auch, dass eine sehr geringe Menge des Activin A gebunden hat, welcher aber unter der Nachweisgrenze des Western Blots liegt.

Die Aufreinigungsversuche über die IDA-Membranadsorber wurden unter verschiedenen veränderten Versuchsbedingungen wiederholt. Als weiterer Metallligand wurde Nickel verwendet. Ebenso wurde der pH-Wert des Bindungspuffers auf 8,5 erhöht. Beide Varianten und ihre Kombinationen zeigten jedoch keine Verbesserung der Aufreinigung. Activin A konnte hier nur in den Fraktionen des Durchlaufes nachgewiesen werden (keine Abbildungen).

Da eine einfache Beladung der IDA-Membranen keinen sichtbaren Aufreinigungseffekt zeigte, wurde versucht, über eine mehrfache Beladung der Membran eine größere Menge Activin A zu binden. Dazu wurde eine aufkonzentrierte Probe in Bindungspuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, pH 7,6) auf die Membranadsorber geladen und der Durchlauf zurück in das Probengefäß geführt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurden so 10 ml Probe über drei Stunden wiederholt auf die Membran gegeben. Der Versuch wurde unter gekühlten Bedingungen durchgeführt. Abbildung 13 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

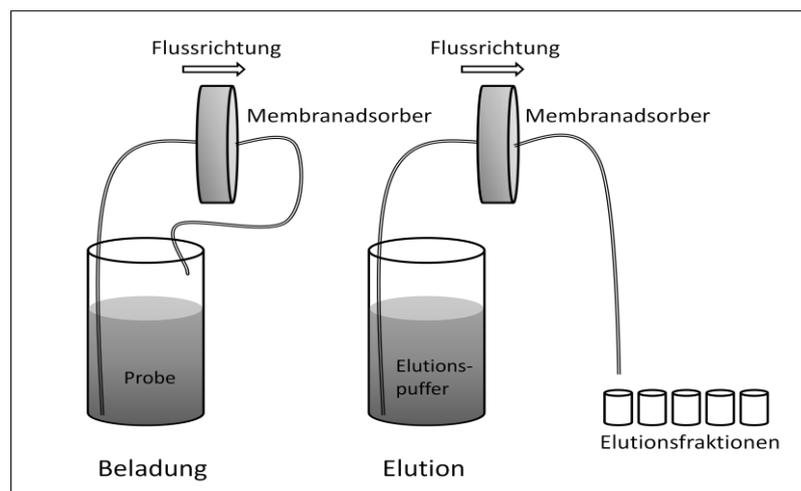
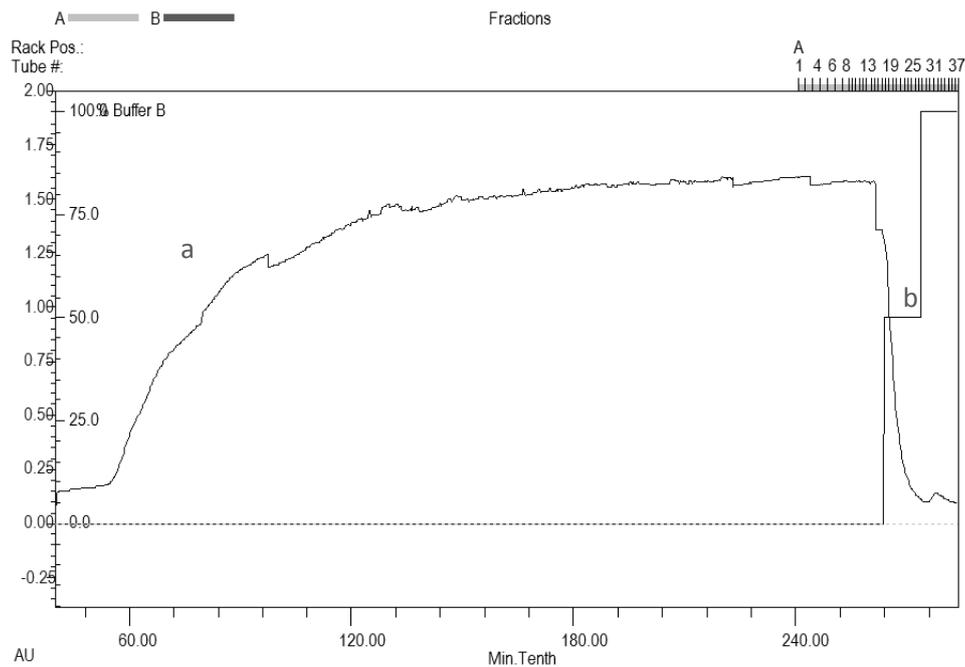


ABBILDUNG 13 - SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MEHRFACHEN BELADUNG DES MEMBRANADSORBERS

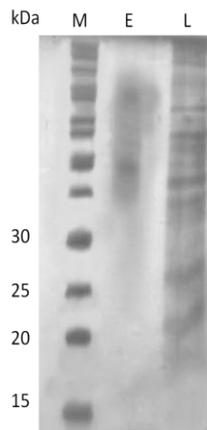
Abbildung 14 zeigt das Chromatogramm des FPLC-Laufes.



**ABBILDUNG 14 - FPLC-CHROMATOGRAMM ZUR IMAC-Cu<sup>2+</sup>-IDA MIT MEHRFACHER PROBENAUFTRAGUNG, X-ACHSE (UNTEN): VOLUMEN IN ML, X-ACHSE (OBEN): FRAKTIONEN, Y-ACHSE (LINKS): UV-INTENSITÄT UND PUFFERZUSAMMENSETZUNG, A: UV-ABSORPTION, B: ANTEIL ELUTIONSPUFFER**

Es ist zu erkennen, dass zunächst die unspezifisch gebundenen Proteine von der Membran gewaschen wurden. Danach folgte die Elution in zwei Schritten (100 mM und 200 mM Imidazol in Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,0)). Bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM ist ein Elutionspeak zu erkennen.

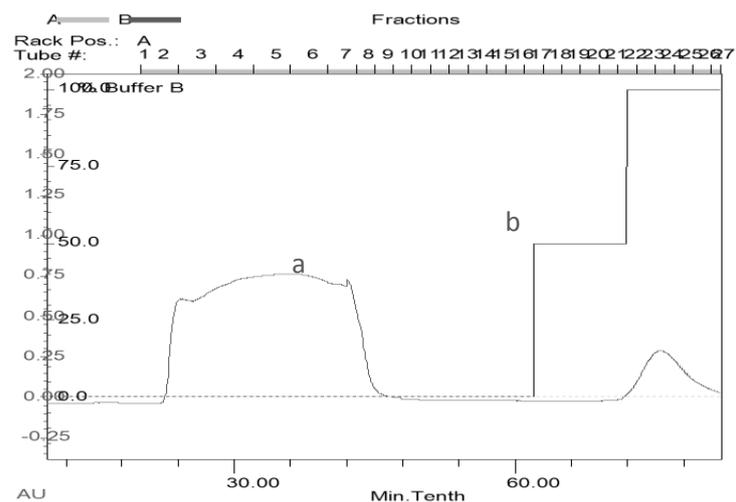
Die Fraktionen 29-32 wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Abbildung 15 zeigt das SDS-PAGE-Gel nach der Silberfärbung. Es ist zu erkennen, dass es sich bei den Eluat um unspezifisch gebundene Proteine handelt.



**ABBILDUNG 15 - SDS-PAGE (12 %) ZUR VISUALISIERUNG DER AUFRÄUFIGUNG MITTELS IMAC-Cu<sup>2+</sup>-IDA NACH MEHRFACHER PROBENAUFTRAGUNG, M: MARKER, L: DURCHLAUF, E: ELUTION, GRÖÖE DER PROTEINE IN KDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM0661), SILBERFÄRBUNG**

Activin A konnte nicht in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Ein Western Blot zeigte keine Banden in den entsprechenden Fraktionen (keine Abbildung).

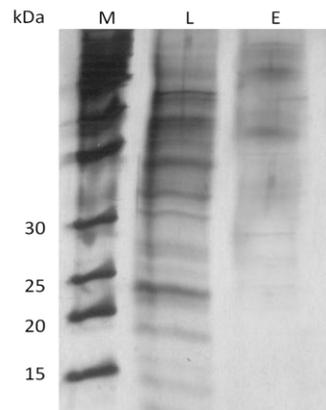
Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das His-tag nicht für den Metall-Liganden der stationären Phase zugänglich ist. Es könnte aufgrund der Proteinfaltung oder der Dimerbildung eine sterische Hinderung der Interaktion möglich sein. Um diesen Effekt zu überprüfen, wurde die IMAC mit denaturierter Probe durchgeführt. Dazu wurde dem aufkonzentrierten Überstand bis zu einer Endkonzentration von 8 M Harnstoff zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C über 60 min auf einer Schüttelplattform. Anschließend wurde die Probe in Bindungspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 7,6) überführt und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt. Es folgte ein FPLC-Lauf unter den gleichen Bedingungen, wie bei der nativen Probe. Eine Elution erfolgte durch Zugabe von Elutionspuffer (100 mM und 200 mM Imidazol in Bindungspuffer). Abbildung 16 zeigt das Chromatogramm des FPLC-Laufes mit denaturierter Probe.



**ABBILDUNG 16 - FPLC-CHROMATOGRAMM ZUR IMAC-Cu<sup>2+</sup>-IDA MIT DENATURIERTER PROBE, X-ACHSE (UNTEN): VOLUMEN IN ML, X-ACHSE (OBEN): FRAKTIONEN, Y-ACHSE (LINKS): UV-ABSORPTION UND PUFFERZUSAMMENSETZUNG, A: UV-INTENSITÄT, B: ANTEIL ELUTIONSPUFFER**

Die Fraktionen 2-8 beinhalteten den Durchlauf der ungebundenen Proteine. In den Fraktionen 22-27 sind eluierte Proteine enthalten. Es ist zu erkennen, dass der *Peak* der Elution eine stärkere UV-Absorption zeigt als der der nativen Probe (Abbildung 11).

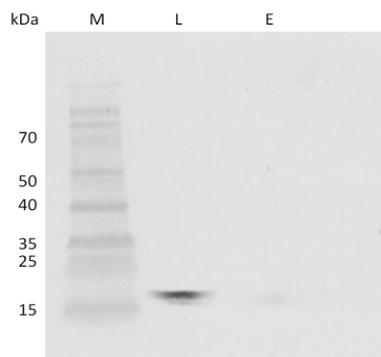
Eine Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot zeigte allerdings, dass es sich bei den eluierten Proteinen nicht um Activin handelte. Abbildung 17 zeigt das SDS-PAGE-Gel nach der Silberfärbung.



**ABBILDUNG 17 - SDS-PAGE (12 %) ZUR VISUALISIERUNG DER AUFRÄUIGUNG MITTELS IMAC-Cu<sup>2+</sup>-IDA MIT DENATURIERTER PROBE, M: MARKER, L: DURCHLAUF, E: ELUTION, GRÖÖE DER PROTEINE IN KDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM0661), SILBERFÄRBUING**

In den Elutionsfraktionen sind zahlreiche Proteine zu erkennen, die unspezifisch an die IDA-Cu<sup>2+</sup>-Membran gebunden haben.

Abbildung 18 zeigt den Western Blot der Durchlauf- und Elutionsfraktionen des FPLC-Laufes.



**ABBILDUNG 18 - WESTERN BLOT ZUR VISUALISIERUNG DER AUFRÄUIGUNG MITTELS IMAC-Cu<sup>2+</sup>-IDA MIT DENATURIERTER PROBE, M: MARKER, L: DURCHLAUF, E: ELUTION, GRÖÖE DER PROTEINE IN KDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM1811)**

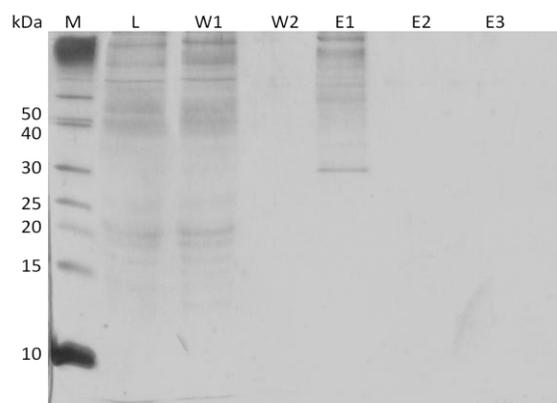
Im Durchlauf ist eine deutliche Activin A-Bande zu erkennen. Die Elutionsfraktionen zeigen nur eine schwache Bande. Activin A bindet demnach auch in denaturiertem Zustand nur geringfügig an die IDA-Cu<sup>2+</sup>-Membran. Eine Aufreinigung über diese Methode scheint, aufgrund des hohen Anteils an unspezifisch gebundenen Proteinen in den Elutionsfraktionen, nicht durchführbar zu sein. Möglicherweise liegen im denaturierten Zustand mehr Proteinstrukturen offen vor, die eine Affinität zu dem Bindungsligand zeigen. Grundsätzlich wäre eine Renaturierung von gebundenen Proteinen nach der Chromatographie möglich (Hanson 1998; Jungbauer 2004; Dong 2009).

## IMAC-TED

Da eine Aufreinigung mittels IDA-Membranen nicht möglich schien, wurde ein weiterer IMAC-Bindungsligand getestet. Die Protino-Säulen von Macherey-Nagel besitzen als Bindungsligand TED (TRIS-Carboxymethylethylendiamin), welches zu den verwendeten Metallionen einen fünfzahnigen Komplex bildet. IDA bildet im Gegensatz dazu einen dreizahnigen Komplex. Durch diese Variationen kann die Selektivität der verwendeten Metallchelate modifiziert werden. So zeigt die Kombination aus IDA und Kupfer zwar eine starke Adsorption aber eine geringe Spezifität. Die in diesem Versuchsteil verwendete Kombination aus Nickel und TED zeigt entgegengesetzte Eigenschaften (Chaga 2001).

Für diesen Versuch wurden die Protino Ni-TED-150-Chromatographiesäulen von Marchery-Nagel eingesetzt. Die Schwerkraftsäulen wurden nach Anleitung per Pipette beladen und eluiert. Für die Beladung wurde 1 ml der aufkonzentrierten Probe mit 3 ml LEW (*lysis-equilibration-wash*)-Puffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0) verdünnt. Die Equilibrierung und die Waschschritte erfolgten ebenfalls in LEW-Puffer. Die Elution wurde durch Imidazol (250 mM in LEW-Puffer) ausgelöst (5.3.4.1). Die Durchführung aller Schritte erfolgte gekühlt auf Eis. Die Durchläufe wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (5.3.2.1, 5.3.2.2).

Abbildung 19 zeigt ein SDS-PAGE-Gel der einzelnen Aufreinigungsschritte nach Silberfärbung. Es ist keine Activin A-Bande in den Elutionsfraktionen zu erkennen. Beim ersten Elutionsschritt wurden unspezifisch gebundene Proteine von der Säule eluiert.



**ABBILDUNG 19 - SDS-PAGE (12 %) ZUR VISUALISIERUNG DER AUFREINIGUNG MITTELS Ni<sup>2+</sup>-TED-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE, M: MARKER, L: BELADUNGSSCHRITT/DURCHLAUF, W: WASCHSCHRITT, E: ELUTIONSSCHRITT, GRÖÖE DER PROTEINE IN kDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM0661), SILBERFÄRBUNG**

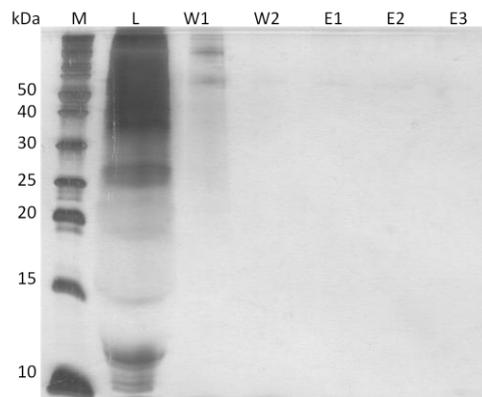
Der durchgeführte Western Blot zeigt schwache Activin A-Banden in den Durchläufen des Beladungs- und des ersten Waschschrilles (keine Abbildung). Die Verwendung von Ni-TED-Säulen zur Activin A-Aufreinigung ist nicht als *Capture*-Schritt geeignet.

## Anti-HA-Affinitätschromatographie

In den nachfolgenden Versuchen wurde die Verwendbarkeit der AntiHA-Affinitätschromatographie als *Capture*-Schritt überprüft.

Die verwendete Anti-HA *Affinity Matrix* der Firma Roche besteht aus einem Agarosegel, in welches ein Anti-HA-Antikörper kovalent gebunden ist. Diese wurden in eine Schwerkraftsäule gefüllt, welche von Hand beladen, gewaschen und eluiert wurde. Die aufkonzentrierte Probe wurde für die Beladung 1:9 mit Equilibrierungspuffer (20 mM TRIS, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 7,5) versetzt. Alle Schritte wurden auf Eis gekühlt durchgeführt. Die Elution erfolgte durch Zugabe des HA-Peptids in Equilibrierungspuffer. Es wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/ml zu dem Equilibrierungspuffer gegeben und für 15 min bei 37 °C auf der Säule belassen. Diese Inkubation wurde dreimal mit frischem Elutionspuffer wiederholt (5.3.4.2). Alle Durchläufe wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft (5.3.2.1, 5.3.2.2).

Abbildung 20 zeigt das SDS-PAGE-Gel mit den Durchläufen der einzelnen Chromatographiestritte nach der Silberfärbung.



**ABBILDUNG 20 - SDS-PAGE (12 %) ZUR VISUALISIERUNG DER AUFREINIGUNG MITTELS ANTI-HA-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE, M: MARKER, L: BELADUNGSSCHRITT/DURCHLAUF, W: WASCHSCHRITT, E: ELUTIONSSCHRITT; GRÖÖE DER PROTEINE IN kDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM0661), SILBERFÄRBUNG**

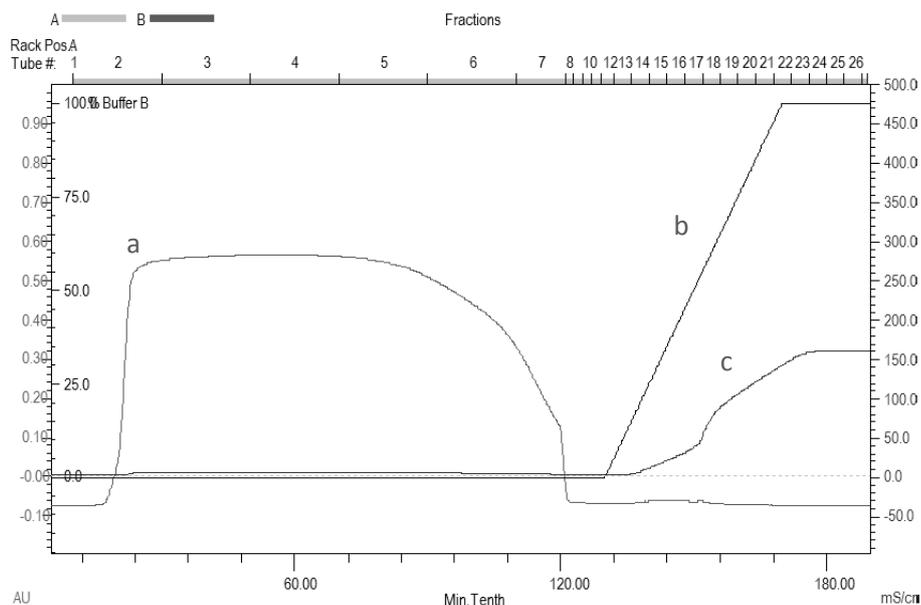
Es ist keine Activin A-Bande in den Elutionsfraktionen zu erkennen. Unspezifische Bindungen haben nur geringfügig stattgefunden und wurden mit dem ersten Waschschrift entfernt.

Der durchgeführt Western Blot zeigt Activin A-Banden in den Fraktionen des Durchlaufes der Beladung (keine Abbildung). Eine Bindung an die HA-Matrix der Säule hat nicht stattgefunden. Eventuell kommt es auch hier, bedingt durch die Proteinfaltung, zu sterischen Hinderungen, die eine Bindung des *tags* an die stationäre Phase unterbinden. Da das His- und das HA-*tag* in der Aminosäuresequenz des Activin A direkt hintereinander liegen, könnte eine sterische Hinderung beide *tags* betreffen. Möglich wäre auch eine geringfügige Bindung, welche in einer Elutionsfraktion mit einem Gehalt an Activin A unter der Nachweisgrenze des Western Blot resultierte. In beiden Fällen ist eine die Anti-HA *Affinity Matrix* nicht für einen *Capture*-Schritt geeignet.

## Heparin-Affinitätschromatographie

Activin A gehört zur der TGF- $\beta$ -Superfamilie (Funaba 1996). Diese Proteine weisen eine Heparin-Bindungsdomäne auf, welche eine Aufreinigung über eine Heparin-Affinitätschromatographie erlaubt.

Es wurde eine 1 ml Heparin HP HiTrap-Säule (GE Healthcare) eingesetzt. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2  $\mu$ m) und entgast. Der zehnfach aufkonzentrierte Überstand wurde über einen weiteren Schritt erneut fünffach aufkonzentriert. Dies erfolgte über eine Ultrafiltration (> 3 kDa) mittels Zentrifugalkonzentratoren unter gekühlten Bedingungen (5.3.4.7). 1 ml des so aufkonzentrierten Überstands wurde in 9 ml Bindungspuffer mit geringer Ionenstärke (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) gegeben und nach der Equilibration der Säule mit Bindungspuffer aufgetragen. Eine Elution wurde durch einen linearen Gradienten bis zu einer Ionenstärke von 2 M NaCl ausgelöst (5.3.4.3). Abbildung 21 zeigt das Chromatogramm unter den genannten Bedingungen.



**ABBILDUNG 21 - FPLC-CHROMATOGRAMM ZUR HEPARIN-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE, X-ACHSE (UNTEN): VOLUMEN IN ML, X-ACHSE (OBEN): FRAKTIONEN, Y-ACHSE (LINKS): UV-INTENSITÄT UND PUFFERZUSAMMENSETZUNG, Y-ACHSE (RECHTS): LEITFÄHIGKEIT, A: UV-ABSORPTION, B: ANTEIL ELUTIONSPUFFER, C: LEITFÄHIGKEIT**

Der *Peak* der Fraktionen 1-7 beinhaltet den Durchlauf der nicht-gebundenen Proteine. Eine Elution von gebundenen Proteinen ist nicht zu erkennen. Activin A konnte nach der Chromatographie nur in den Durchlauf-Fraktionen mittels Western Blot nachgewiesen werden (keine Abbildung). Eine erfolgreiche Auftrennung der Probe konnte nicht erreicht werden. Ursache für dieses Ergebnis könnte sein, dass in der Struktur von Activin A eine  $\alpha$ -Helix fehlt, welche sonst in der TGF- $\beta$ -Familie vertreten ist (Rider 2006). Möglicherweise führt dies zu einer geringeren Affinität zu Heparin.

Die Versuche zur Affinitäts-Chromatographie haben gezeigt, dass weder eine Aufreinigung über die angefügten *tags* noch eine Proteinfamilien-spezifische Chromatographie möglich ist. Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Frage. Es ist denkbar, dass die *tags* nicht für die Affinitätspartner der stationären Phase zugänglich sind. Dies konnte durch die Verwendung einer denaturierten Probe für die IDA-IMAC gezeigt werden. Hier hat eine geringe Bindung des Activin A stattgefunden. Es ist

möglich, dass die Lage der *tags* in der nativen Konformation des Proteins durch eine sterische Hinderung eine Bindung unmöglich macht. Dies könnte auf die native Proteinfaltung oder die räumliche Struktur des Dimers zurückzuführen sein.

### 3.2.3.2. UNSPEZIFISCHE CHROMATOGRAPHIEMETHODEN

Da ein *Capture*-Schritt über eine Affinitätschromatographie nicht etabliert werden konnte, wurde eine 2-Schritt-Aufreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie (IEX, *Ion Exchange Chromatography*) und Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) erarbeitet. Abbildung 22 zeigt ein Flussdiagramm, welches einen Überblick über die verschiedenen Schritte bietet.

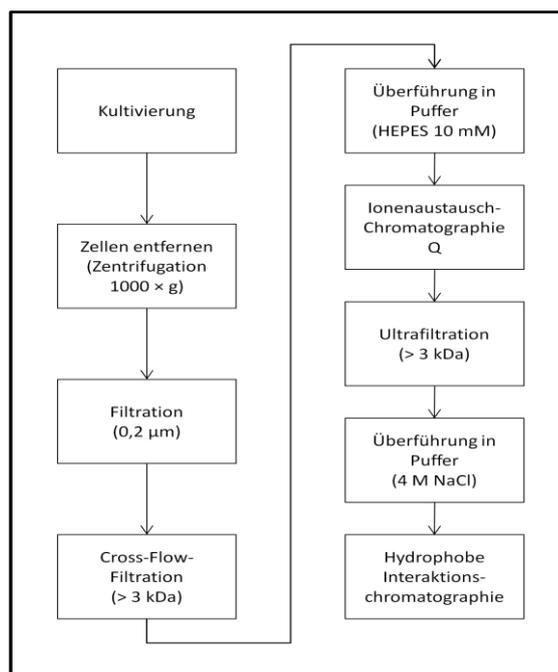


ABBILDUNG 22 - FLUSSDIAGRAMM ZUR 2-SCHRITT-AUFREINIGUNG VON ACTIVIN A

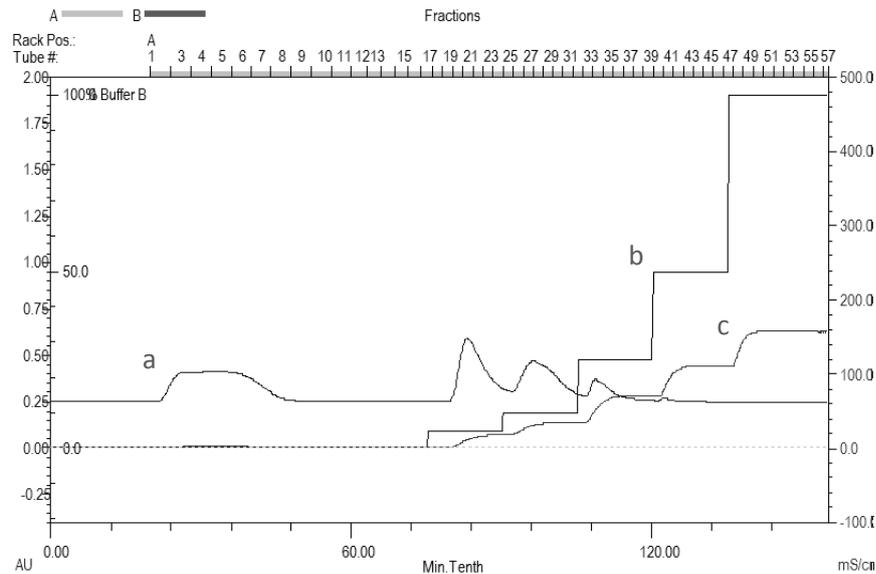
Für die Durchführung der Versuche zur Ionenaustausch-Chromatographie wurden verschiedene Bedingungen überprüft. Es wurden Anionen- und Kationenaustauscher-Membranen mit jeweils verschiedenen pH-Werten für die Bindung getestet. Hier werden die Ergebnisse, welche die deutlichste Trennung zeigten, beschrieben.

Eingesetzt wurde eine Anionenaustauscher-Membran bei einem pH-Wert von 7,6 für die Bindung. Der berechnete *pI* des Activin A beträgt 6,6. Unter diesen Bedingungen wurde Activin A an die stationäre Phase gebunden und konnte durch eine Erhöhung der Ionenstärke eluiert werden.

Für die Aufreinigungsversuche wurde das automatische FPLC-System BioLogic DuoFlow von BioRad verwendet. Es wurde ein Sartobind Q75-Ionenaustauscheinheit eingesetzt. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2 µm) und entgast. Der zehnfach aufkonzentrierte Überstand wurde über einen weiteren Schritt erneut fünffach aufkonzentriert. Dies erfolgte über eine Ultrafiltration (> 3kDa) mittels Zentrifugalkonzentratoren unter gekühlten Bedingungen (5.3.4.7). 1 ml des so aufkonzentrierten Überstands wurde in 9 ml

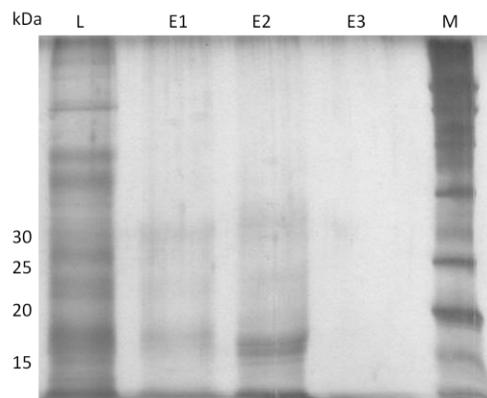
Bindungspuffer (10 mM HEPES, pH 7,6) gegeben und nach der Equilibrierung der Säule mit Bindungspuffer aufgetragen. Eine Elution erfolgte durch eine stufenweise Erhöhung der Ionenstärke bis 2 M NaCl (in Bindungspuffer) (5.3.4.5).

Abbildung 23 zeigt das Chromatogramm der FPLC unter den genannten Bedingungen.



**ABBILDUNG 23 - FPLC-CHROMATOGRAMM ZUR IEX-Q, X-ACHSE (UNTEN): VOLUMEN IN ML, X-ACHSE (OBEN): FRAKTIONEN, Y-ACHSE (LINKS): UV-ABSORPTION UND PUFFERZUSAMMENSETZUNG, Y-ACHSE (RECHTS): LEITFÄHIGKEIT, A: UV-INTENSITÄT, B: ANTEIL ELUTIONSPUFFER, C: LEITFÄHIGKEIT**

Der *Peak* der Fraktionen 2-7 beinhaltete den Durchlauf. Die Elution erfolgte schrittweise mit Erhöhung der NaCl-Konzentration. Die gesammelten Fraktionen des Durchlaufes und die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Aufgrund der geringen Konzentration der Proteine in den Fraktionen wurde diese vor der Analyse mittels TCA-Fällung aufkonzentriert (5.3.4.6). Abbildung 24 das SDS-PAGE-Gel der Chromatographie-Fraktionen nach der Silberfärbung.



**ABBILDUNG 24 - SDS-PAGE (12 %) ZUR VISUALISIERUNG DER AUFREINIGUNG MITTELS IEX-Q, M: MARKER, L: BELADUNGSSCHRITT/DURCHLAUF, E: ELUTIONSSCHRITTE (1: 100 mM, 2: 200 mM, 3: 500 mM); GRÖÖE DER PROTEINE IN KDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM0661), SILBERFÄRBUNG**

In den Elutionsfraktionen bei 100 mM und 200 mM NaCl sind Proteinbanden im Bereich von 15 kDa Größe zu erkennen. Abbildung 25 zeigt den Western Blot der Durchlauf- und Elutionsfraktionen.



**ABBILDUNG 25 - WESTERN BLOT ZUR VISUALISIERUNG DER AUFRÄUIGUNG MITTELS IEX-Q, M: MARKER, L: BELADUNGSSCHRITT/DURCHLAUF, E: ELUTIONSSCHRITTE (1: 100 mM NaCl, 2: 200 mM NaCl, 3: 500 mM NaCl, 4: 2000 mM NaCl), GRÖÖE DER PROTEINE IN kDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM1841)**

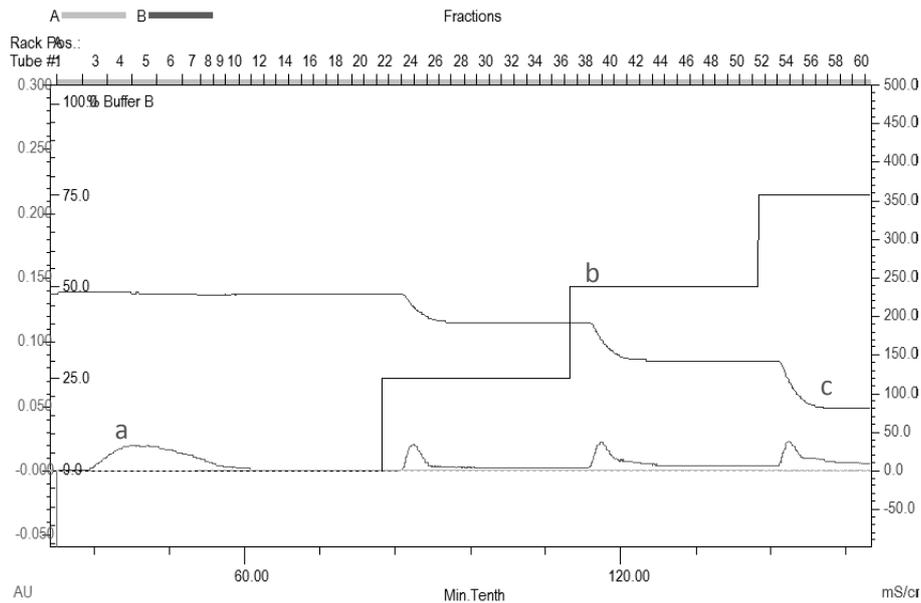
In der Abbildung ist eine Bande in den Proben der Elutionsfraktion bei 200 mM NaCl zu erkennen. Eine Bindung von Activin A konnte unter den genannten Bedingungen erreicht werden. Wie in Abbildung 24 zu erkennen, enthält diese Elutionsfraktion noch weitere Proteine, die eine Verunreinigung darstellen und durch einen zweiten Schritt getrennt werden können. Die Fraktionen 26-31 des IEX-Laufes wurden für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

Als zweiter Aufreinigungsschritt wurde eine HIC durchgeführt. Dafür wurden die Sartobind Phenyl nano-Membraneinheiten (3 ml) verwendet.

Für die Aufreinigung wurde das automatische FPLC-System BioLogic DuoFlow von BioRad eingesetzt. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2  $\mu$ m) und entgast. Für die Durchführung der Hydrophoben Interaktionschromatographie wurden die Fraktionen 26-31 der zuvor durchgeführten IEX-Q mittels Ultrafiltration (>3 kDa) fünfmal aufkonzentriert (5.3.4.7). 4 ml des so aufkonzentrierten Probe wurde in 8 ml Bindungspuffer mit hoher Ionen-Stärke (6 M NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) gegeben, um eine NaCl-Konzentration von 4 M einzustellen. Diese wurde nach einer Equilibrierung der Säule mit Bindungspuffer aufgetragen. Eine Elution wurde durch eine stufenweise Reduzierung der Ionen-Stärke (3 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0,2 M, 0,1 M und 0 M) ausgelöst (5.3.4.4).

Eine Ionenstärke von 4 M im Bindungspuffer wird vom Hersteller der Membranen empfohlen. Geringere NaCl-Konzentrationen (1 M und 2 M) im Bindungspuffer wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen keine Bindung von Activin A an die Membranen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

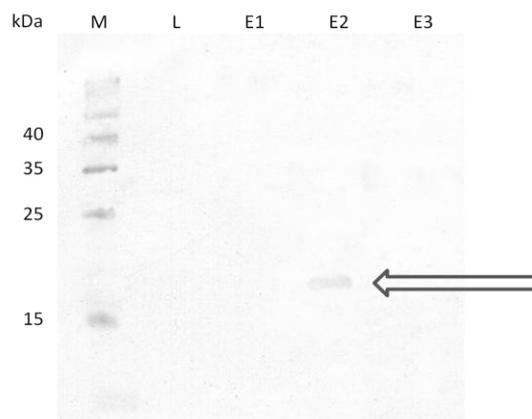
Abbildung 26 zeigt das FPLC-Chromatogramm zu der HIC. Es ist deutlich ein Durchlauf an Proteinen zu erkennen, die nicht an die Säule gebunden haben. Durch eine Verringerung der Salzkonzentration wird die Elution der Proteine ausgelöst. Abbildung 26 zeigt den Chromatographieverlauf bis zum Elutionsschritt von 1 M NaCl. Eine weitere Verringerung der Ionenstärke führte zu keiner weiteren Elution von Proteinen.



**ABBILDUNG 26 - FPLC-CHROMATOGRAMM ZUR HIC, X-ACHSE (UNTEN): VOLUMEN IN ML, X-ACHSE (OBEN): FRAKTIONEN, Y-ACHSE (LINKS): UV-INTENSITÄT UND PUFFERZUSAMMENSETZUNG, Y-ACHSE (RECHTS): LEITFÄHIGKEIT, A: UV-ABSORPTION, B: ANTEIL ELUTIONSPUFFER, C: LEITFÄHIGKEIT, ZU BEACHTEN IST DIE SKALIERUNG DER UV-ABSORPTION**

Bei Abbildung 26 ist zu beachten, dass die Skalierung der UV-Intensität geändert wurde, um die *Peaks* hervorzuheben. Die Proben enthielten nach der IEX nur eine sehr geringe Konzentration an Proteinen.

Die Fraktionen des Durchlaufes und die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (5.3.2.1, 5.3.2.2). Da eine geringe Proteinkonzentration erwartet wurde, wurden die gesammelten Fraktionen mittels TCA-Fällung 20-fach aufkonzentriert. Trotz dieser Erhöhung der Konzentration waren auf dem Gel der SDS-PAGE nach Silberfärbung keine Proteinbanden zu erkennen (keine Abbildung). Der Western Blot zeigte eine Bande in den Elutionsfraktionen 39-41 (siehe Abbildung 27).



**ABBILDUNG 27 - WESTERN BLOT ZUR VISUALISIERUNG DES ZWEITEN AUFRÄUENIGUNGSSCHRITTES MITTELS HIC, M: MARKER, L: BELADUNGSSCHRITT/DURCHLAUF, E: ELUTIONSSCHRITTE (1: 3 M NaCl, 2: 2 M NaCl, 3: 1 M NaCl), GRÖÖE DER PROTEINE IN kDa ENTSPRECHEND ZUM VERWENDETEN MARKER (FERMENTAS, SM1841), DER PFEIL MARKIERT DIE ACTIVIN A-BANDE**

Eine weitere Auftrennung der Proben konnte mittels HIC erfolgreich durchgeführt werden. Allerdings kann keine genaue Aussage über den Grad der zurückbleibenden Verunreinigungen gemacht werden, da diese nicht visualisiert werden können.

Vergleicht man die Western Blots, welche direkt nach der der Transfektion und bei den späteren Aufreinigungsschritten durchgeführt worden sind, fällt auf, dass eine stärkere Aufkonzentrierung der letzteren notwendig ist. Der frühere Blot zeigte deutliche Banden. Bei der Verwendung von 1 ml, mittels Cross-Flow-Filtration und TCA-Fällung aufkonzentriertem Überstand der Bioreaktorproben waren nur schwache Banden zu erkennen. Die Nachweisgrenze eines Western-Blot liegt bei optimaler Durchführung im unteren Nanogramm- bis Pikogramm-Bereich (Luttmann 2006). Die Konzentration von Activin A liegt somit im Bereich von einigen Pikogramm pro ml. Ein Nachweis über SDS-PAGE und Silberfärbung ist nicht mehr möglich (Tunon 1984). Zu Beginn der Versuche, direkt nach der Transfektion, war keine solche Aufkonzentrierung notwendig um eine deutliche Bande auf einem Western Blot zu erhalten. Die Konzentration des Activin A sollte somit ursprünglich im Bereich von einigen Nanogramm pro ml gelegen haben. Bei diesem Vergleich ist eine Verdünnung der Proben während der Chromatographie berücksichtigt.

Eine Aufreinigung aus Proben mit solch geringen Mengen des Zielproteins ist nur begrenzt sinnvoll. Ein Nachweis des Activin A kann nur mittels eines zeitaufwendigen Western Blot erfolgen. Außerdem ist es nicht möglich, eine Aussage über die Reinheit der Proben zu treffen, da ebenfalls HCP vorliegen können, deren Visualisierung nicht möglich ist.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte ein Verlust der Expressionsfähigkeit der Zellen sein. Zum Zeitpunkt der Bioreaktorkultivierung sind bereits 15 Passagierungs- beziehungsweise Expansionsschritte durchgeführt wurden. Die Zellen befinden sich demnach circa in der 50. Generation nach der Transfektion. Es ist nicht auszuschließen, dass in dieser Zeit bereits *gene silencing* Effekte aufgetreten sind. Dies ist auch bei einer erneuten Revitalisierung der transfizierten Zellen zu beobachten. Diese zeigten nach circa 35 Generationen eine deutlich geringere Produktivität. Dies konnte über einen Vergleich von Banden im Western Blot nachvollzogen werden (Versuche dazu nicht gezeigt). Auch in der Dissertationsarbeit von Claas Haake (2011) ist bei der Verwendung eines vergleichbaren Vektors *gene silencing* Effekte beobachtet worden.

### 3.2.4. ACTIVIN A AKTIVITÄTSASSAY

Für die Aktivitätstestung wurde im Rahmen dieser Arbeit die proliferationsstimulierende Wirkung von Activin A auf Fibroblasten getestet. Diese ist unter der Verwendung von Lungen-Fibroblasten publiziert (Ohga 1996).

Für den Versuch wurde die murine, embryonale Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 verwendet. Die Zellen werden nach dem Expandieren in einer 96-well-Platte ausgesät (5.3.1.3). Jedes well wurde mit  $4 \times 10^3$  Zellen in 200  $\mu$ l DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*)-Medium (10 % Vol. FKS) angeimpft. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 72 Stunden Kultivierungsdauer wurde das Medium entfernt und durch Medium mit reduziertem Serumgehalt (1 % Vol.) ersetzt. Dies sollte einen Einfluss von Wachstumsfaktoren, welche im Serum enthalten sind, auf das Experiment verringern. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium entfernt und mit Medium, welchem Activin A-Proben zugesetzt wurden, ersetzt. Um die Wirkung von Activin A zu überprüfen, wurde kommerzielles Activin A als Standard, in den Konzentrationen von 1-1000 nM, eingesetzt. Der Standard wurde in sterilem PBS verdünnt. Von der aufgereinigten Activin A-Probe wurden 50  $\mu$ l eingesetzt. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne Activin A eingesetzt. Alle Messungen wurden in einer vierfach-Bestimmung durchgeführt. Nach 72 Stunden Inkubation wurde die Proliferation der Zellen analysiert. Dazu wurde das CellTiter-Blue-Kit von Promega verwendet. Jeweils 20  $\mu$ l der CellTiter-Blue-Lösung wurden direkt zu den Zellen jedes wells gegeben. Die Lösung enthält den Farbstoff Resazurin, welche von vitalen Zellen zu Resorufin umgewandelt wird. Dieser Farbstoff wurde am Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emission von 590 nm ausgelesen (5.3.1.6). Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen und lässt damit einen Rückschluss auf die Proliferationsstimulierende Wirkung von Activin A zu. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der Absorptionsmessungen.

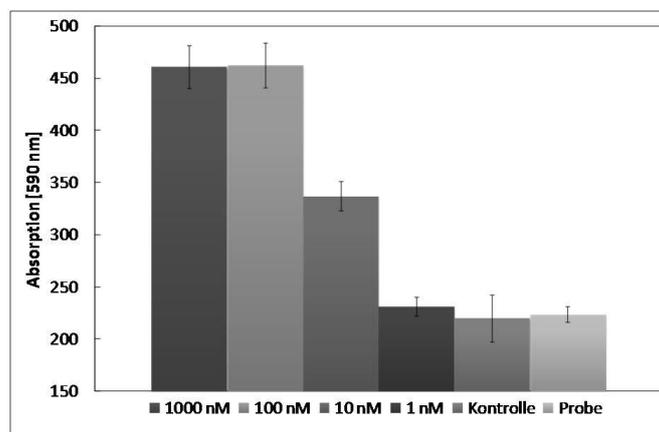


ABBILDUNG 28 - AKTIVITÄTSTEST VON AUFGEREIGTEM ACTIVIN A, DIE FESTEN KONZENTRATIONEN SIND DIE DER EINGESETZTEN STANDARDS, BALKEN MIT STANDARDABWEICHUNG

Es ist zu erkennen, dass der Activin A-Standard, in Abhängigkeit von seiner eingesetzten Konzentration, eine Proliferation der Zellen induzierte. Ab einer Konzentration von 100 nM trat eine Sättigung ein. Mittels höherer Konzentrationen konnte keine Zunahme der Proliferation beobachtet werden. Die geringste Konzentration von 1 nM zeigte, verglichen mit der Kontrolle, nur einen minimalen Effekt, der allerdings im Bereich der Standardabweichung der Kontrolle liegt.

Die Proben des aufgereinigten Activin A zeigten ebenfalls nur einen minimalen Effekt. Die Wirkung entsprach einer Activin A-Konzentration von circa 1,1 nM verglichen mit den Medianwerten des Standards. Allerdings liegt die Wirkung im Bereich der Standardabweichung der Kontrolle und des Standards und kann somit nicht als signifikant bezeichnet werden. Dies könnte auf die geringe Konzentration zurückzuführen sein (vergleiche 3.2.3). Da die Proben eindeutig Activin A enthalten, könnte durch den Einsatz einer größeren Probenmenge ein sichtbarer Effekt erzielt werden. Weitere Kultivierungen zur Produktion von entsprechenden Proteinmengen konnten allerdings aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden.

### 3.2.5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Versuche der Dissertation wurden CHO-Zelllinien welche in Institut für Experimentelle Hämatologie der MHH transfiziert wurden auf ihre Fähigkeit zur Sekretion untersucht. Die Zelllinie welche unter der Verwendung des Signalpeptides IL-2 erstellt wurde konnte für die Produktion von Activin A eingesetzt werden und ein Produktionsprozess im Bioreaktor etabliert werden.

Die Verwendung einer Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des Activin A erwies sich als nicht geeignet. Mittels einer Kombination aus IEX und HIC konnte eine Aufreinigung erreicht werden. Allerdings lies sich der Anteil des Activin A in den Proben nicht sicher bestimmen. Als Problem erwies sich die geringe Konzentration des Activin A im Zellkulturüberstand. Möglicherweise könnte eine alternative Transfektionsmethode zu einer höheren Produktion führen. Ebenfalls könnte der Einsatz eines anderen Selektionsmarkers erfolgreich sein.

Der Einsatz einer Zelllinie, welche eine höhere Produktivität zeigt, würde ebenfalls zu einer ausreichenden Menge an Activin A nach der Aufreinigung führen. Im nächsten Versuchsteil werden Experimente zur Optimierung einer Zelllinie durchgeführt. Diese sollen zu einer höheren Produktivität führen und könnten damit auch für die Activin A-produzierende Zelllinie eingesetzt werden.

### 3.3. IDENTIFIKATION VON HOCH-PRODUZIERENDEN ZELLEN

In diesem Versuch soll eine Methode zur Identifikation von hochproduzierenden Zellen etabliert werden. Ziel war es, eine Identifikationsmethode zu finden, welche nicht auf ein aufwendiges Markierungsverfahren angewiesen ist. Eine produktspezifische Färbung oder eine Oberflächenimmobilisierung sind mit großem Arbeitsaufwand verbunden sind und müssen zunächst für jede Zelllinie und das jeweilige Produkt optimiert werden. Hinzu kommt, dass für einige Produkte keine Bindungspartner bekannt sind oder keine spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen. Das Verfahren sollte keine Einzelzell-Klonierung beinhalten um ein zeitaufwendiges Heranziehen einer, für die Analyse ausreichend, großen Population zu vermeiden.

#### 3.3.1. SORTIERUNG AM FACS

Für die Sortierung werden die Zellen am FACS nach ihrem SSC (*side scatter*; Seitwärtsstreulicht) sortiert. Für HEK-293-Zellen (Sandhu 2008) und Sf-9-Zellen (Deparis 2003) würde ein Zusammenhang zwischen der Produktion von rekombinanten Proteinen und dem SSC nachgewiesen. Darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen dem Gesamtproteingehalt einer Zelle und dem SSC, was auf eine starke Proteinproduktion der Zellen hinweisen könnte (Shapiro 1983).

Sowohl die Oberflächenbeschaffenheit als auch die Granularität der Zellen beeinflussen den SSC. So führt eine unebene Oberfläche zu einem hohen SSC. Die Granularität wird durch intrazelluläre Membranen verursacht. Hierbei sind Zellorganellen von Bedeutung, welche eine große Membranoberfläche besitzen. Dazu zählen insbesondere das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat und die inneren Membranen der Mitochondrien. Auch Zellen, welche eine große Anzahl an Vesikeln aufweisen, erzeugen einen hohen SSC.

Die Versuche basieren auf der Annahme, dass Zellen, die am Zytometer einen hohen SSC zeigen, über eine große Anzahl an Mitochondrien beziehungsweise über ein großes Endoplasmatisches Retikulum und einen großen Golgi-Apparat verfügen. In den Mitochondrien laufen die oxidative Phosphorylierung und der Citratzyklus ab. Der raue Teil des Endoplasmatischen Retikulums ist an der posttranslationalen Proteinmodifikation beteiligt und der Golgi-Apparat an deren Sekretion. Es wird davon ausgegangen, dass Zellen, welche über mehr oder größere der entsprechenden Organellen verfügen eine größere Produktivität aufweisen.

Als Modell wurde die murine Hybridomzelllinie SC-71 verwendet. Die Zelllinie produziert einen monoklonalen IgG<sub>1</sub>-Antikörper gegen murines Myosin.

Alle Sortierungen werden mittels FACS durchgeführt (5.3.3.1). Von der Ausgangszelllinie werden diejenigen Zellen separiert, welche den höchsten SSC zeigen. Diese werden verwendet, um eine Subzelllinie heranzuziehen von der wiederum eine Subzelllinie erstellt wird. Abbildung 29 zeigt eine schematische Darstellung der Versuche.

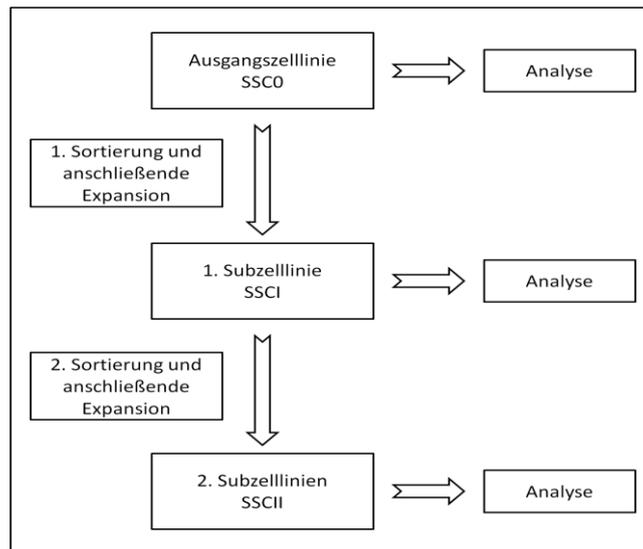


ABBILDUNG 29 - SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SORTIERUNGSVERSUCHE

Die Zellen wurden dazu aus einer 48 Stunden laufenden Kultivierung entnommen. Am FACS wurde zunächst eine Messung mit circa  $5 \times 10^5$  Zellen durchgeführt um die Sortierungseinstellungen festzulegen. Die Zielzellen wurden durch mehrere *gates* in unterschiedlichen Histogrammen selektiert. Dabei sollten Zellaggregate, Zellfragmente und nicht-viable Zellen von der Sortierung ausgeschlossen werden. Zunächst wurden aus den erfassten Ereignissen (*events*) Aggregate diskriminiert. Dazu wurden die *Peakhöhen* gegen die *Peakflächen* der Fluoreszenzsignale am Messcomputer gegeneinander aufgetragen. *Events*, welche abweichende, nicht korrelierende Eigenschaften zeigen, werden aus der Sortierung ausgeschlossen (Abbildung 30).

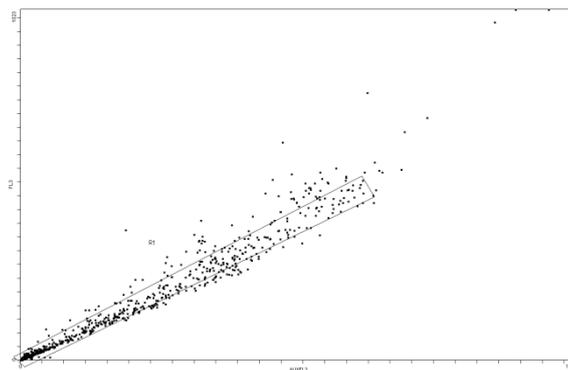
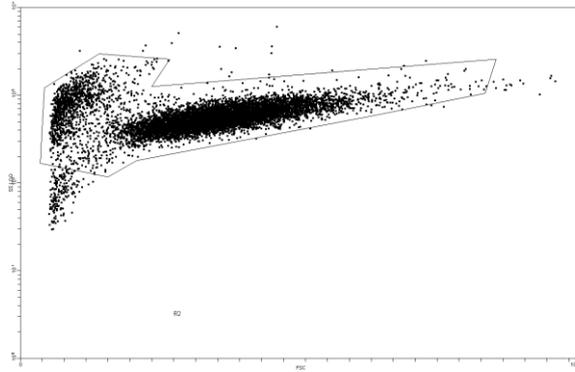


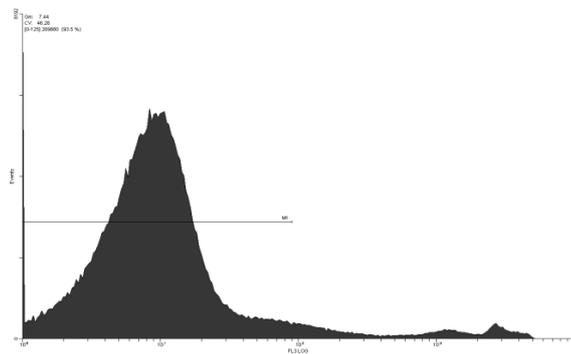
ABBILDUNG 30 - SORTIERUNG NACH SSC, HISTOGRAMM 1: *GATE* ZUR DISKRIMINIERUNG VON ZELLAGGREGATEN, X-ACHSE: *PEAK-FLÄCHEN* DER ROTEN FLUORESZENZ; Y-ACHSE: *PEAK-HÖHEN* DER ROTEN FLUORESZENZ

Darauf folgend wurde in einem Histogramm der FSC gegen den SSC aufgetragen, um einen Ausschluss von Zellfragmente zu ermöglichen (Abbildung 31). Die SC-71-Zelllinie zeigt die, für Produktionszellen typische Verteilung von nekrotischen und viablen Zellen (Sitton 2008).



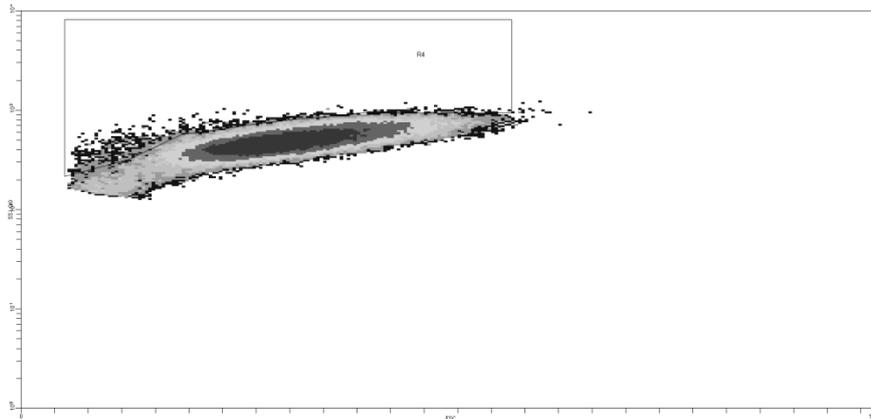
**ABBILDUNG 31 - SORTIERUNG NACH SSC, HISTOGRAMM 2: GATE ZUR DISKRIMINIERUNG VON ZELLFRAGMENTEN, X-ACHSE: FSC; Y-ACHSE: SSC**

Durch eine Färbung mit Propidium-Iodid konnten nicht-viable Zellen diskriminiert werden (Abbildung 32). Dieser Farbstoff dringt in nekrotische Zellen ein, was zu einer messbaren Fluoreszenz im roten Bereich (680 nm) führt. Die Viabilität stimmte mit der zuvor mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten Viabilität überein (5.3.1.5).



**ABBILDUNG 32 - SORTIERUNG NACH SSC, HISTOGRAMM 3: GATE ZUR DISKRIMINIERUNG VON NICHT-VIABLEN ZELLEN, X-ACHSE: FLUORESCENZ PROPIDIUM IODID; Y-ACHSE: ZELLZAHL**

In einem vierten Histogramm, in welchem weder Aggregate noch Zellfragmente und nur viable Zellen angezeigt werden, wurde ein *gate* über 3 % der Zellen mit dem höchsten SSC gelegt. Diese Zellen zeigten vereinzelt einen hohen SSC und ließen sich deutlich von der Hauptpopulation unterscheiden. (Abbildung 33). Diese Zellen wurden von der Ausgangspopulation getrennt und in 24-well-plates sortiert. Dabei wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium abgelegt.



**ABBILDUNG 33 - SORTIERUNG NACH SSC, HISTOGRAMM 4: GATE ZUR SORTIERUNG (3 %), X-ACHSE: FSC; Y-ACHSE: SSC**

Nach der Sortierung wurden die Zellen über 10 bis 12 Passagen expandiert. Anschließend wurden die Zellen zur Erfassung ihrer Wachstums-, Produktions- und Metabolismuseigenschaften unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde für die Anlegung von Zellbanken verwendet (5.3.1.4). Die Zelllinien werden im Folgendem, entsprechend der durchgeführten Sortierungen, SSC0 (keine Sortierung durchgeführt), SSC1 und SSCII benannt.

### 3.3.2. KULTIVIERUNG VON SC-71-ZELLEN

Im Folgenden wurde der Effekt der Sortierungen nach dem SSC untersucht. Dazu wurden die Zellen vor und nach den Sortierungen unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

Die Kultivierungen der Zellen erfolgten in 50 ml-Schüttelkolben in einem Volumen von 20 ml (5.3.1.2). Dem verwendeten Medium (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) wurde 10 % Vol. Serum (FKS, Fötales Kälberserum) zugegeben. Um Standardbedingungen zu gewährleisten, wurde für alle Kultivierungen FKS derselben Charge verwendet. Die Kultivierungen wurden mit  $0,45 \times 10^6$  Zellen/ml angeimpft. Um vollständige Wachstumskurven zu erhalten und ihren Verlauf bis zur Absterbephase zu verfolgen, wurden die Zellen über 120 Stunden kultiviert. Bei Erreichen einer Viabilität von unter 20 % wurden die Kultivierungen beendet.

Eine Probenentnahme aus der laufenden Kultivierung erfolgte zweimal täglich. Direkt nach der Probenentnahme wurden die Zellzahl und die Viabilität mittels Neubauer-Zählkammer (5.3.1.5) ermittelt. Die Bestimmung der Konzentration des produzierten Antikörpers in den Proben erfolgte mittels eines ELISA (5.3.2.4). Um Aussagen über den Stoffwechsel der Zellen vor und nach den Sortierungsschritten treffen zu können, wurden aus den Überständen die Konzentrationen verschiedener Aminosäuren, sowie die Glucose- und Lactatkonzentration bestimmt (5.3.2.3, 5.3.2.6).

### 3.3.3. VERGLEICH DER SORTIERTEN ZELLINIEN

Die vergleichenden Kultivierungen erlauben einen Einblick in das veränderte Wachstums- und Produktionsverhalten sowie die Stoffwechselaktivität der sortierten und unsortierten Zelllinien.

Da die Probenentnahme der zu vergleichenden Kultivierungen nicht immer zum gleichen Zeitpunkt erfolgte, wurden die Datensätze normiert um das Wachstum der Zelllinien exakt miteinander vergleichen zu können. Dazu wurde mit Hilfe des Programms Excel 2007 für die unterschiedlichen Verläufe polynomische Trendlinien des dritten bis sechsten Grades angepasst. Auf Basis der Formeln dieser Trendlinien wurden alle Messzeitpunkte auf zwölf-Stunden-Intervalle normiert. Die ursprünglichen Daten und die verwendeten Polynome sind im Anhang zu finden (5.4.1).

Abbildung 34 zeigt das typische Wachstumsverhalten der SC-71-Zelllinie unter Standardbedingungen. Die Lebendzellzahl der unsortierten Zelllinie (SSC0) erreichte nach 48 Stunden ein Maximum von circa  $3 \times 10^6$  Zellen/ml bei einer Viabilität von 95 %. Es ist zu erkennen, dass die sortierten Zelllinien ihr Wachstumsmaximum im Vergleich zu den unsortierten Zellen später im Kultivierungsverlauf, nach 60 Stunden, erreichen. Hierbei wird ein Maximum der Lebendzellzahl von  $3,6 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht. Die Viabilität liegt bei unter 90 %. Die stationäre Phase ist typischerweise nur von einigen Stunden Dauer und ist direkt von der Absterbephase gefolgt. Die Lebend-Zellzahl sinkt innerhalb von 48 bis 72 Stunden auf die Animpf-Zelldichte und darunter, wobei die Viabilität unter 30 % fällt.

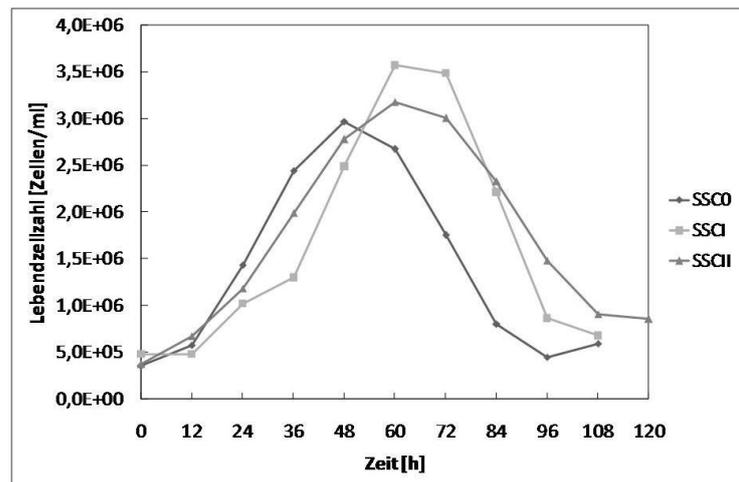


ABBILDUNG 34 - PROLIFERATIONSVERHALTEN IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Abbildung 35 zeigt den Verlauf der Zellviabilität während der Kultivierungsverläufe.

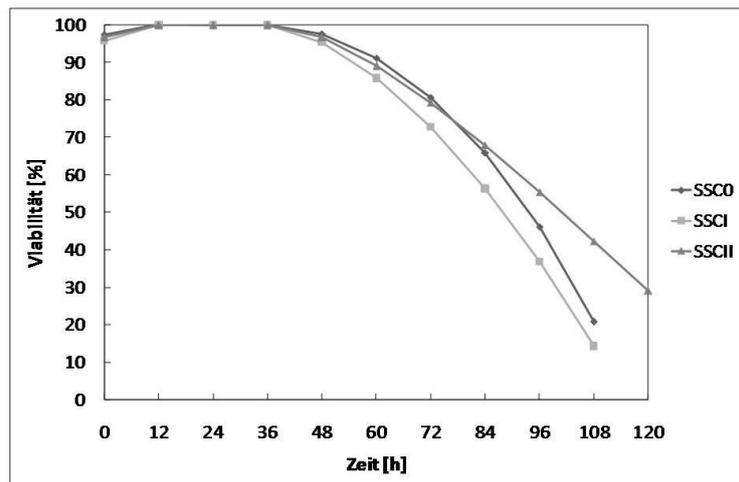


ABBILDUNG 35 - VIABILITÄT IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Es ist zu erkennen, dass die Viabilität bei allen Zelllinien nach 48 Stunden abnimmt. Wie für Produktionszellen typisch, ist die Viabilität bis zum Erreichen der maximalen Zelldichte bei nahezu 100 %. Die Zelllinie SSCII zeigt hier eine deutlich verzögerte Abnahme der Viabilität. Nach 120 Stunden lag der Anteil an viablen Zellen bei über 20 %. Im Vergleich dazu wurde dieser Wert bei den anderen Zelllinien bereits nach 108 Stunden erreicht.

Eine Stagnation des Wachstums wird üblicherweise durch eine Substratlimitierung verursacht. Abbildung 36 zeigt die Glucosekonzentration im Überstand während der Kultivierungsverläufe.

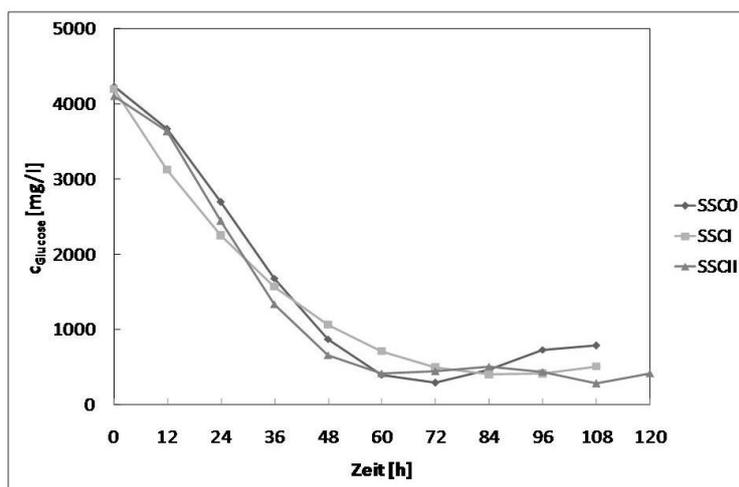


ABBILDUNG 36 - GLUCOSEKONZENTRATION IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Bei Erreichen der maximalen Zelldichte der Zelllinie SSC0, nach 48 Stunden, war die anfängliche Konzentration von 4150 mg/l auf 870 mg/l gesunken. Die Kultivierungsverläufe der sortierten Zelllinien, welche ein Maximum der Lebend-Zellzahl bei 60 Stunden aufweisen, zeigen eine Reduktion Glucosekonzentration auf 700 mg/l.

Der Glucoseverbrauch aus dem Medium war bei den sortierten Zelllinien in den ersten 36 Stunden der Kultivierung geringfügig höher. Bei der Zelllinie SSC0 ist eine Glucosekonzentration von 1900 mg/l erreicht. Zelllinie SSCI zeigte eine Konzentration von 1500 mg/l und SSCII 1300 mg/l.

Abbildung 37 zeigt den Glutaminverbrauch der verschiedenen Zelllinien über den Kultivierungsverlauf.

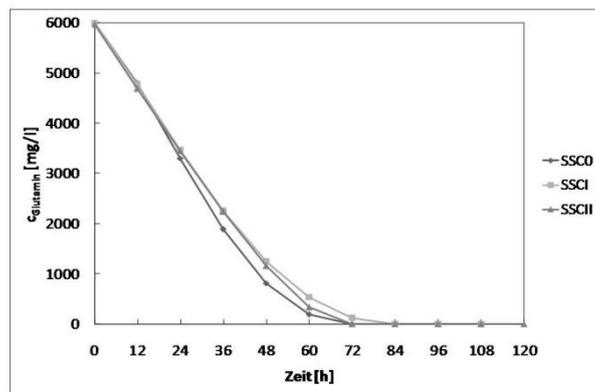


ABBILDUNG 37 - GLUTAMINKONZENTRATION IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Es ist zu erkennen, dass die Zellen der sortierten Zelllinien Glutamin geringfügig langsamer verbrauchen. Kontinuierliche Zelllinien haben einen erhöhten Bedarf an Glutamin (Aledo 2004). Theoretische Berechnungen ergeben, dass die ATP-Produktion über diese Stoffwechselwege circa 40 % des Energiebedarfs der Zellen abdecken (Petch 1994).

Abbildung 38 zeigt die Lactatkonzentrationen während der Kultivierungsverläufe.

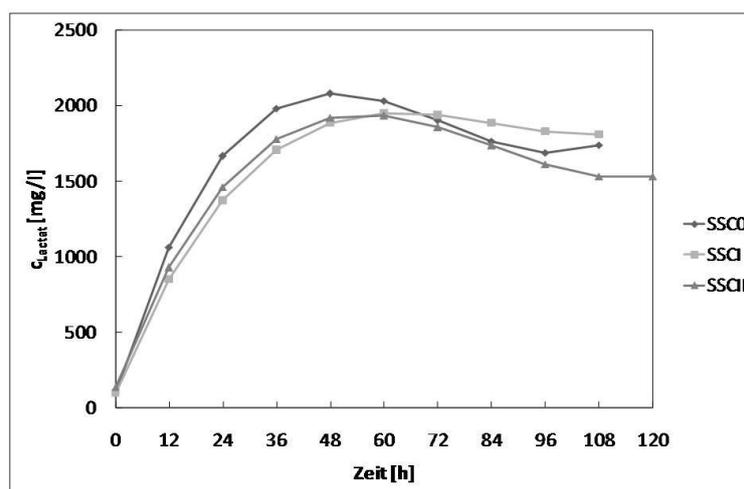


ABBILDUNG 38 - LACTATKONZENTRATION IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Es wird deutlich, dass die sortierten Zelllinien eine langsamere Lactat-Bildung zeigen. Die Verläufe der Konzentrationen näherten sich nach circa 60 Stunden Kultivierungsdauer einander an. Die Zelllinien SSCI und SSCII erreichen hier die maximale Zelldichte und gehen dann in die Absterbephase über. Bei der Zelllinie SSC0 ist die maximale Lactatkonzentration bereits nach 48 Stunden erreicht. Zeitgleich gehen die Zellen in die Absterbephase über (siehe Abbildung 34). Ein Zusammenhang zwischen maximaler Lactatkonzentration und Übergang in die Absterbephase wird hier deutlich.

Nach Erreichen der maximalen Lactatkonzentration ist eine leichte Abnahme dieser zu beobachten. Da Glucose als eine der Hauptenergiequellen verbraucht ist, wird Lactat zur Pyruvat-Bildung und somit als Energiequelle verwendet (Cruz 2000; Tsao 2005).

#### Weitere Metabolite

Zur Überprüfung der Metabolismusaktivität wurden im Institut für Biochemie und Biotechnik der Universität Bielefeld Metabolomanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Kultivierungen der unterschiedlichen Zelllinien zweimal wiederholt und nach 24 beziehungsweise 96 Stunden für die Entnahme von jeweils  $3 \times 10^7$  viablen Zellen gestoppt. Aus diesen Proben wurden die Metabolite extrahiert und mittels einer Kombination aus *hydrophobic interaction liquid chromatography* (HILIC) und Massenspektrometrie (MS) analysiert (5.3.2.7).

Aus der Metabolomanalyse wurden für jede der Zelllinien die Konzentrationen von 46 verschiedenen Metaboliten erfasst. Die erste Analyse wurde nach 24 Stunden und die zweite nach 96 Stunden Kultivierungsdauer durchgeführt. Dies ermöglichte einen Überblick über die Stoffkonzentrationen zu Beginn und zum Ende der Kultivierungen. Die vollständigen Datensätze sind im Anhang zu finden (5.5.1). Hier soll auf die Metabolite des Energiestoffwechsels, der Glycolyse und des Citratzyklus, sowie die Nukleotide eingegangen werden.

Abbildung 39 zeigt die Komponenten der Glycolyse, die im Rahmen der Metabolomanalyse erfasst worden sind. Für jede Komponente ist die Konzentration des jeweiligen Metabolits zu den Zeitpunkten der Probeentnahme der Kultivierungen der drei Zelllinien dargestellt.

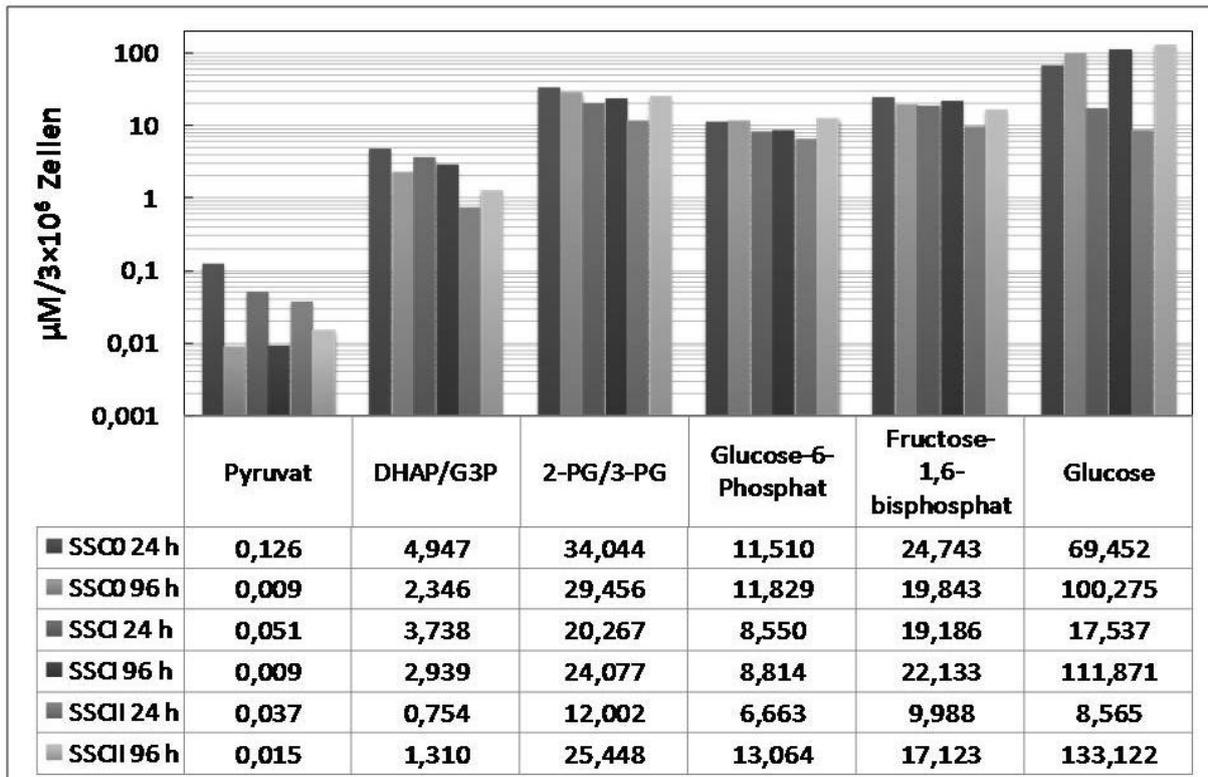


ABBILDUNG 39 - KONZENTRATIONEN DER KOMPONENTEN DER GLYCOLYSE ZU ZWEI ZEITPUNKTEN IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Es ist zu erkennen, dass mit wiederholter Sortierung die Konzentrationen der Komponenten der Glycolyse zu Beginn der Kultivierung geringer sind, als die der Ausgangszelllinie. Die Grafik zeigt ebenfalls, dass die Konzentrationen der Metabolite nach 96 Stunden Kultivierungsdauer bei den sortierten Zelllinien höher sind als bei den unsortierten Zellen. Die Konzentrationen der Metabolite G3P, 3-PG (Glycerinsäure-3-phosphat), Glucose-6-Phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat, welche in der Zelllinie SSC0 im Laufe der Kultivierung verringert werden, steigen im Gegensatz bei den Zelllinien SSCI und SSCII an. Diese Beobachtung kann mit dem schnelleren Glucoseverbrauch der sortierten Zelllinien in Verbindung gebracht werden (vergleiche Abbildung 36). Eine schnellere Aufnahme könnte zu einer Anreicherung der Glycolyse-Metabolite führen.

Bei einem Vergleich der Pyruvatkonzentrationen zeigt sich, dass mit wiederholten Sortierungsschritten die Zellen weniger Pyruvat verbrauchen. Diese kann mit der Beobachtung in Verbindung gebracht werden, dass die sortierten Zellen in der ersten Hälfte der Kultivierung weniger Lactat produzieren als die unsortierten (Abbildung 38). Die schnelle Aufnahme von Glucose, welche von einer geringeren Lactat-Bildung begleitet ist, lässt den Schluss zu, dass das Pyruvat in den sortierten Zellen eher dem Citratzyklus zugeführt wird bevor es in Lactat umgewandelt wird.

Abbildung 40 zeigt die Komponenten des Citratzyklus, die im Rahmen der Metabolomanalyse erfasst wurden.

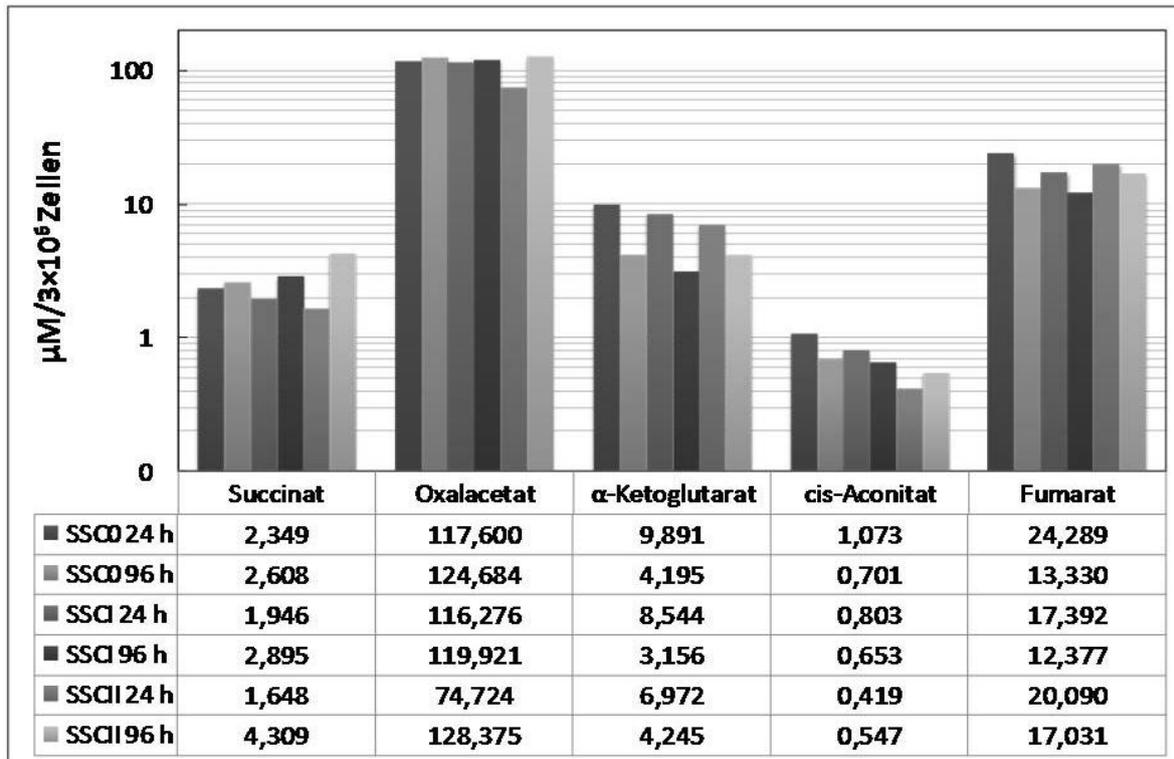


ABBILDUNG 40 - KONZENTRATIONEN DER KOMPONENTEN DES CITRATZYKLUS ZU ZWEI ZEITPUNKTEN IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Zu erkennen ist, dass die Ziellinien, mit fortlaufenden Sortierungsschritten, zu Beginn der Kultivierungen geringere Konzentrationen der jeweiligen Stoffe aufwiesen. Nach 96 Stunden Kultivierungsdauer ist die Konzentration der Stoffe in den sortierten Zelllinien höher als die in den unsortierten. Dieser Effekt ist mit fortlaufenden Sortierungsschritten zunehmend. Möglich ist, dass in der Zelllinie SSC0 der Crabtree-Effekt früh eintritt und sich die Bestandteile des Citratzyklus akkumulieren, da dieser gehemmt wird. In den sortierten Zellen könnte dieser Effekt erst später stattgefunden haben, was dafür sprechen könnte, dass der Crabtree-Effekt später im Kultivierungsverlauf einsetzte.

## Nukleotide

Bei der Betrachtung der Nukleotide fällt auf, dass hier im Laufe der Kultivierung in den sortierten Zelllinien größere Pools gebildet werden (Abbildung 41).

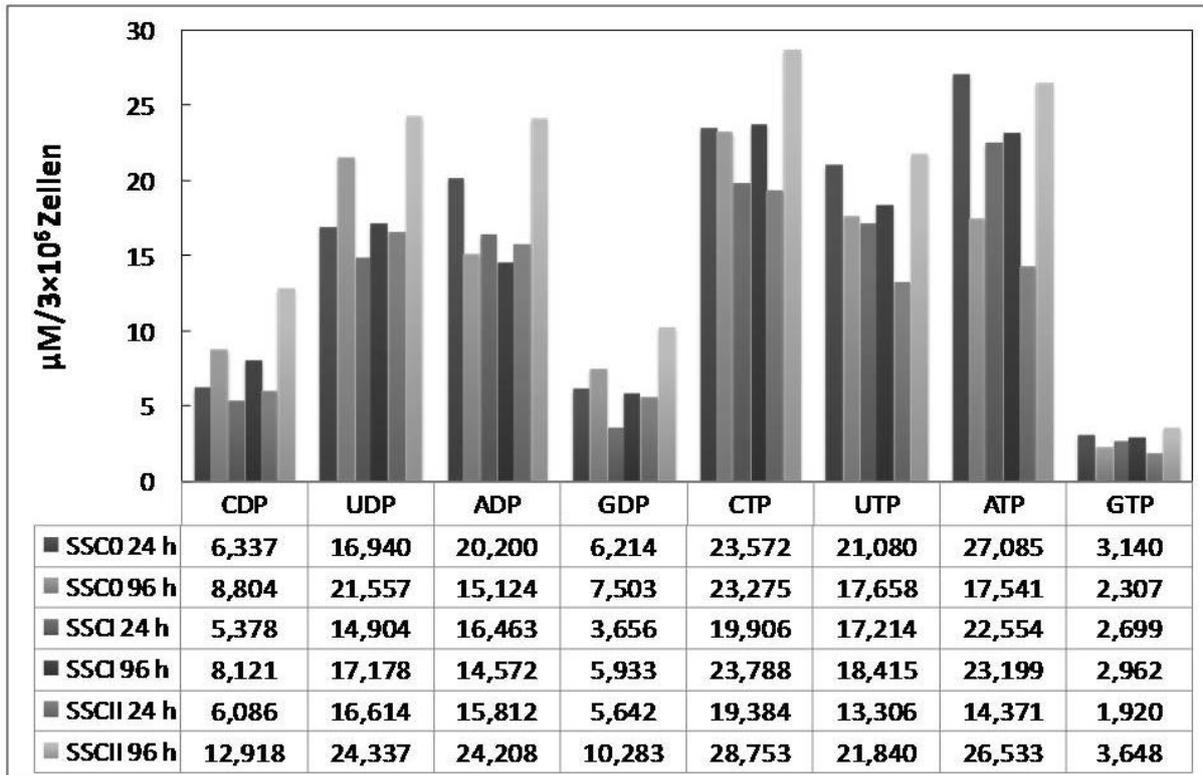


ABBILDUNG 41 - KONZENTRATIONEN DER NUKLEOTIDI- UND TRIPHOSPHATE ZU ZWEI ZEITPUNKTEN IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSCO, SSCI UND SSCII

Der ADP-Pool und der Pool der Nukleotidtriphosphate sanken bei unsortierten Zellen während der Kultivierung. Im Gegensatz dazu stieg dieser bei den sortierten Zellen im Laufe der Kultivierung an. Allerdings ist bei nahezu allen Nukleotiden zu beobachten, dass die Pools in den sortierten Zelllinien zunächst geringer sind als die in den unsortierten. Die Konzentration an Nukleotiden in der Zelle steht in Zusammenhang mit ihrer Produktivität (Barnabe 2000). Die sortierten Zellen zeigten nach circa 40 Stunden Kultivierungsdauer einen höheren Produkttiter, so dass dieser Zusammenhang bestätigt werden kann.

Die Verhältnisse von ATP zu ADP könnten ein Hinweis darauf sein, dass der Crabtree-Effekt in den sortierten Zellen erst später im Kultivierungsverlauf einsetzt. Wie in Abbildung 3 (Kapitel 2.1.3) gezeigt, hemmt eine hohe ATP-Konzentration im Zytosol die Atmungskette. Diese kann nur ATP produzieren, wenn in der Zelle ein Bedarf besteht. Dies wird durch das Verhältnis von ATP zu ADP im Zytosol gesteuert. Die ATP/ADP-Translokase in der Mitochondrienmembran ist ein Antiporter, welcher für jedes ADP aus dem Zytosol ein ATP aus den Mitochondrien heraus schleust (Karlson 1994). In den unsortierten Zellen liegt bereits nach 24 Stunden ein deutlicher ATP-Überschuss vor. Betrachtet man das Verhältnis von ATP zu ADP nach den ersten 24 Stunden Kultivierungsdauer in den verschiedenen Zelllinien, so stellt man fest, dass sich diese, mit fortlaufenden Sortierungsschritten, immer weiter annähern. In der Zelllinie SSCII ist das Verhältnis sogar umgekehrt. Es besteht ATP-

Bedarf. Erst nach 96 Stunden Kultivierungsdauer, ist hier, wie bei den anderen Zelllinien, das Verhältnis wieder in Richtung ATP verschoben.

Abbildung 42 zeigt die NADH-Konzentration (Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierter Zustand) der verschiedenen Zelllinien.

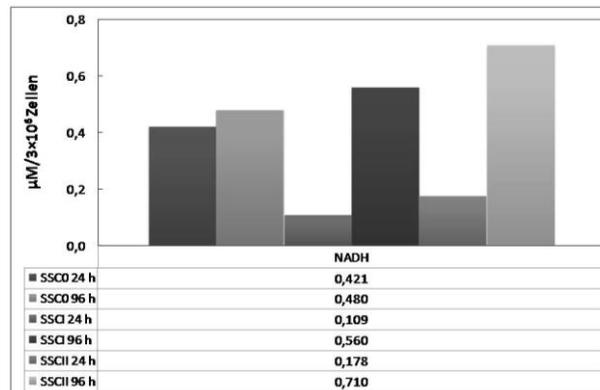


ABBILDUNG 42 - KONZENTRATIONEN VON NADH UND NAD<sup>+</sup> ZU ZWEI ZEITPUNKTEN IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Verursacht durch den Crabtree-Effekt sammelt sich NADH in den Mitochondrien an. Dies führt zu einer Hemmung des Citratzyklus. Die sortierten Zellen zeigten zu Beginn der Kultivierung eine geringe NADH-Konzentration. Dies lässt darauf schließen, dass zu diesem Zeitpunkt der Citratzyklus nicht gehemmt ist und die oxidative Phosphorylierung stattfindet.

Im späteren Kultivierungsverlauf zeigen die sortierten Zellen einen starken Anstieg der NADH-Konzentration. Das NADH wird im Citratzyklus gebildet und ist somit abhängig von der Kapazität der Mitochondrien. Bei den sortierten Zellen ist diese Kapazität größer, was für einen höheren Mitochondriengehalt sprechen könnte.

### Produktivität

Die Produktkonzentration der Standardkultivierungen sind Abbildung 43 zu entnehmen. Die Zelllinie SSCI ist nicht aufgeführt, da keine deutliche Änderung des Produkttiters gegenüber der Zelllinie SSC0 zu erkennen war.

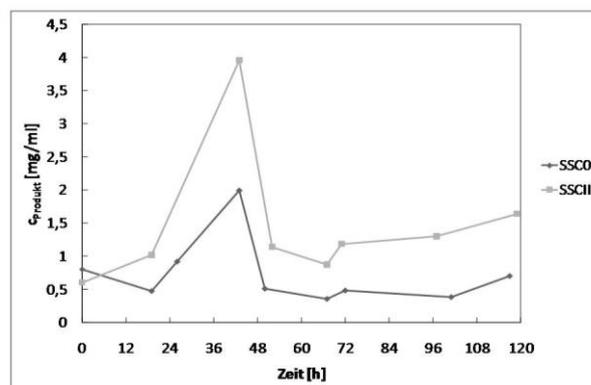


ABBILDUNG 43 - PRODUKTKONZENTRATION IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0 UND SSCII

Die Zelllinie SSCII zeigte einen deutlich höheren Produkttiter. Es fällt auf, dass keine Produktakkumulation während des Kultivierungsverlaufes stattgefunden hat. Die Konzentration erreichte vielmehr einen Höhepunkt, welcher ungefähr mit dem Maximum der Lebendzellzahl korreliert. Danach nahm die Konzentration deutlich ab und stieg nur geringfügig wieder an. Die Ursache für den starken Abfall der Konzentration könnten, aus lysierten Zellen freigesetzte, Proteasen gewesen sein. Die Viabilität der Zellen verringerte sich zum gleichen Zeitpunkt, wie auch die Produktkonzentration. Bei der Lyse der Zellen könnten verschiedene Proteasen aus unterschiedlichen Zellkompartimenten in den Überstand gelangt sein. Der leichte Anstieg der Produktkonzentration zum Ende der Kultivierungen könnte ebenfalls auf die Lyse der nicht-viablen Zellen zurückzuführen sein. Dabei könnte bisher nicht sezerniertes Produkt in das Medium gelangt sein. Dieser Effekt konnte aus zeitlichen Gründen nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Auf Basis der Produktkonzentration im Überstand und der Lebendzellzahl kann die spezifische Produktionsgeschwindigkeit berechnet werden (5.4.2).

Abbildung 44 stellt die spezifische Produktionsgeschwindigkeit für die Standardkultivierungen der verschiedenen Zelllinien dar. Trotz des geringen Produkttiters erreichen die unsortierten Zellen hier ein höheres Maximum.

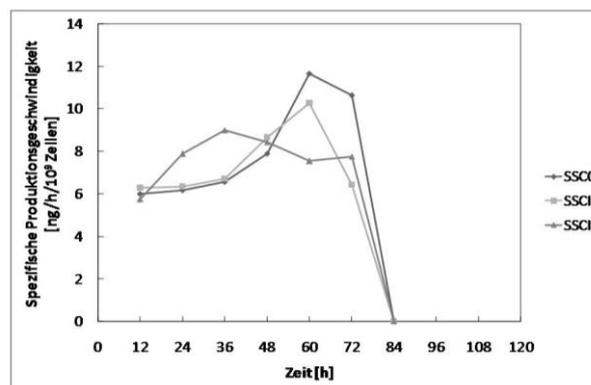


ABBILDUNG 44 - SPEZIFISCHE PRODUKTIONSGESCHWINDIGKEIT IM VERLAUF DER STANDARDKULTIVIERUNGEN DER ZELLINIEN SSC0, SSCI UND SSCII

Zu erkennen ist, wie sich das Maximum der spezifischen Produktivität mit fortlaufenden Sortierungsschritten nach links verschiebt und dabei abflacht. Der hohe Produkttiter, welcher in der sortierten Zelllinie SSCII zu sehen war, könnte demnach auf die spezifische Produktivität, welche früher im Kultivierungsverlauf erreicht wurde, zurück zu führen sein.

## Überprüfung SSC

Der SSC der sortierten Zelllinien wurde nach zwei Monaten Kultivierungsdauer, beziehungsweise 20 Passagen, miteinander verglichen. Es sollte überprüft werden, ob ein Effekt durch die Sortierungen auch langfristig sichtbar ist. Dazu wurde der SSC per Zytometer erfasst (Abbildung 45). Wie auch bei den Sortierungen wurden Aggregate, Zellfragmente und nicht-viable Zellen zuvor diskriminiert und von der Messung ausgeschlossen. (5.3.3.2).

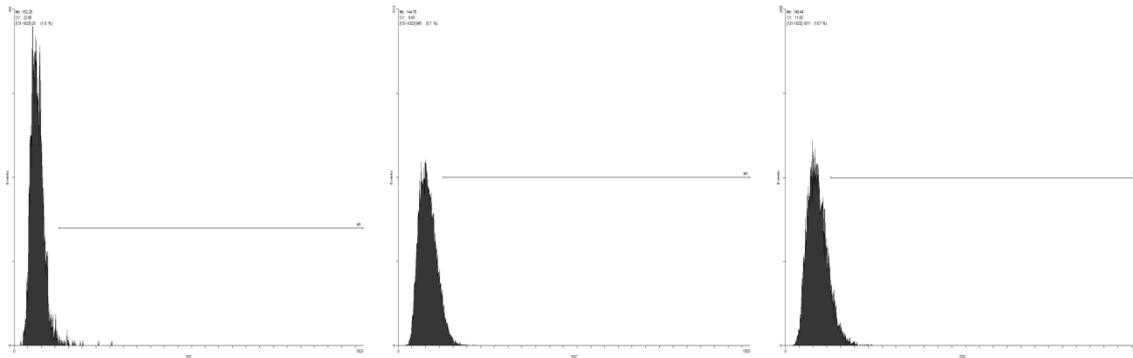


ABBILDUNG 45 - SSC DER ZELLINIEN SSC0, SSC1 UND SSCII NACH 20.PASSAGEN

Es ist zu erkennen, dass der Effekt der Sortierungen über eine Zunahme des SSC nachvollzogen werden kann. Gegenüber der ursprünglichen Zelllinie besitzt SSC1 einen um 4,7 % höheren SSC und SSCII einen um 9,7 % höheren SSC (Tabelle 2).

TABELLE 2 - ÜBERPRÜFUNG DES SSC DER SORTIERTEN ZELLINIEN NACH 20 PASSAGEN

Zelllinie	SSC
SSC0	-
SSC1	+ 4,7 %
SSCII	+9,7 %

### 3.3.4. ZUSAMMENFASSUNG

Die Sortierungen der Hybridomzellen nach dem höchsten SSC zeigen deutliche Effekte. Die sortierten Zellen zeigten eine stärkere Proliferation und einen höheren Produkttiter. Letzterer könnte auf eine erhöhte spezifische Produktivität zurückzuführen sein. Ebenso ist eine deutliche Veränderung der Stoffwechseleigenschaften zu beobachten. Die Metabolomanalyse ermöglicht zusammen mit der Erfassung der Metabolite im Überstand einen Einblick in den Metabolismus der Zellen und erlaubt es, die Veränderungen nachzuvollziehen. Diese sind der zu Kultivierungsbeginn geringere Glutaminverbrauch, ebenso das ATP/ADP-Verhältnis, die langsamere Lactatbildung und die Konzentrationen von NADH. Diese Veränderungen sprechen dafür, dass der Crabtree-Effekt bei den sortierten Zellen später einsetzt. Eine erhöhte Zahl an Mitochondrien könnte die Ursache dafür sein. Eine große Anzahl könnte mehr Kapazität für die oxidative Phosphorylierung bieten und somit zu Beginn der Kultivierung die Hemmung des Citratzyklus unterbinden. Eine sichere Aussage darüber kann jedoch nur getroffen werden, wenn die tatsächliche Mitochondrien-Menge in den jeweiligen Ziellinien bestimmt worden wäre.

Eine weitere Erkenntnis erlaubte die Erfassung der Produktkonzentration. Die Produkte werden nicht im Verlaufe des Kultivierungsprozesses im Überstand akkumuliert, sondern erreichen ein Maximum bereits in dem ersten Drittel der Kultivierung. In einem Produktionsprozess sollte zu diesem Zeitpunkt die Produktion gestoppt werden um einen maximalen Titer zu erhalten.

## 4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

---

Die Produktion von rekombinanten Proteinen ist ein bedeutender Bereich innerhalb der Biotechnologie. Bei ihrer Herstellung spielt die Produktion in Säugerzellen eine zunehmend große Rolle. Nur diese Zellen sind in der Lage, die häufig benötigten posttranskriptionalen Modifikationen durchzuführen, die für die Gewährleistung der biologischen Aktivität unerlässlich sind. Allerdings zeichnen sich diese Zellen durch hohe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Zudem ist die Produktivität der Zellen, verglichen mit anderen Expressionssystemen verhältnismäßig gering. Aus diesen Gründen ist nicht nur Optimierung der *up-* und *downstream*-Prozesse, sondern auch die Optimierung der Zelllinien selbst von entscheidender Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine CHO-Zelllinie für die Herstellung von rekombinanten Activin A generiert. Activin A spielt eine Rolle im Rahmen der Hämatopoese und der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen und stellt somit einen wichtig Gegenstand im Rahmen humanmedizinischer Forschung dar.

Die Kultivierung der neuen CHO-Zelllinie und eine Strategie für die Aufreinigung von Activin A werden in dieser Arbeit gezeigt. Um eine Sekretion des Proteins zu gewährleisten und somit die Aufreinigung aus dem Kultivierungsüberstand zu ermöglichen, wurden verschiedene Signalpeptide eingesetzt und miteinander verglichen. Das Signalpeptid des Zytokins IL-2 führt zu einer Sekretion des Activin A aus den transfizierten Zellen. Die neue generierte Zelllinie zeigt ein stabiles Wachstum, welches mit dem der untransfizierten Zelllinie vergleichbar ist. Der Produkttiter von Activin A liegt im unteren Nanogrammbereich pro Milliliter. Zur Produktion wurde eine Bioreaktorkultivierung im 2 l-Maßstab durchgeführt.

Eine Aufreinigung des Activin A über das angefügte His- und HA-*tag* konnte nicht realisiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die *tags* in der nativen Konformation des Proteins aufgrund sterischer Hinderungen nicht zugänglich sind. Diese Vermutung wird durch Versuche zur Aufreinigung mittels IMAC des denaturierten Proteins bestätigt.

Im Rahmen der Arbeit konnte eine Aufreinigungsstrategie über unspezifische Chromatographiemethoden etabliert werden. Unter Verwendung eines Anionen-Austauschers und Hydrophober Interaktionschromatographie konnte eine 2-Schritt-Aufreinigung erarbeitet werden. Allerdings ist aufgrund der geringen Konzentration des Activin A eine Visualisierung der Verunreinigungen nach der Aufreinigung nur begrenzt möglich. Die aufgereinigten Fraktionen zeigen im Western Blot Activin A. Allerdings können nach einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung keine Proteinbanden dargestellt werden.

Es konnte eine Methode zur Testung der biologischen Aktivität von Activin A etabliert werden. Dabei wurden Proliferationsstimulierende Eigenschaften des Activin A auf die murine Fibroblastenzelllinie NIH -3T3 zunutze gemacht. Der eingesetzte Activin A-Standard zeigt deutlich die erwartete Wirkung auf die Zellen. Bei der aufgereinigten Probe ist dieser Effekt allerdings gering. Dies ist auf die geringe verfügbare Konzentration zurückzuführen.

Während der Versuche wurde beobachtet, dass die Expression von Activin A nicht über einen großen Zeitraum stabil ist. Ein Nachweis war nach langer Kultivierungsdauer (circa 50 Generationen nach der

Transfektion) nur noch nach starker Aufkonzentrierung des Überstandes ( $\geq 100$ -fach) zu realisieren. Vermutlich kommt es zur Inaktivierung des GOI durch *gene silencing* Effekte. Um diese Effekte zu unterbinden, könnten verschiedene Strategien eingesetzt werden. Zunächst wäre ein Einsatz von UCOE-Sequenzen im Rahmen der Transfektion sinnvoll. Zur Erstellung dieser Flankierungssequenzen werden regulatorische Abschnitte aus den *house-keeping-genes* des Wirtes verwendet, welche gewährleisten, dass eine Methylierung des GOI ausbleibt (Zhang 2010). Ebenfalls könnte, unter Zuhilfenahme des eingefügten Selektionsgens DHFR, eine Amplifikation des GOI innerhalb der Zellpopulation erreicht werden. Durch den Zusatz von MTX, welches DHFR inhibiert, kann ein gerichteter Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt werden. Hierbei werden Zellen, in denen eine hohe Kopienzahl des GOI vorliegt selektiert. Weitere Selektionsmethoden für Zelllinien werden im theoretischen Teil dieser Arbeit vorgestellt. Diese greifen jedoch häufig auf zeitaufwendige Einzelzellklonierungen oder aufwendige Färbemethoden zurück.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird ein Selektionsverfahren von hoch-produzierenden Zellen vorgestellt, welches auf die Anwendung von aufwendigen Färbetechniken verzichtet. Für die Versuche wurde eine murine Hybridomzelllinie als Modell verwendet. Dabei wird angenommen, dass Zellen, die am Zytometer ein starkes Seitwärtsstreulicht zeigen, eine hohe Anzahl an Mitochondrien besitzen. Zellen mit diesen Eigenschaften wurden mittels FACS separiert um Subzelllinien aufzubauen. Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass mit wiederholten Sortierungsschritten der Produkttiter von 2 mg/ml auf 4 mg/ml erhöht werden konnte. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Lebendzellzahl in diesen Zelllinien um bis zu 20 %erhöht ist.

Des Weiteren wurden die metabolomischen Eigenschaften der Zellen untersucht. Der Gehalt der Metabolite der Glycolyse, des Citratzyklus sowie der Nukleotidgehalt der sortierten und unsortierten Zellen wurde dazu miteinander verglichen. Für die Erfassung der Konzentrationen dieser Stoffwechselkomponenten wurden die Metabolite aus den Zellen extrahiert und am Institut für Biochemie und Biotechnik der Universität Bielefeld mittels MS erfasst. Durch die veränderte Stoffwechselaktivität konnten Rückschlüsse auf den Gehalt der Mitochondrien in den Zellen gezogen werden. Kontinuierliche Zelllinien unterliegen in der Regel dem Crabtree-Effekt, welcher sich negativ auf die Produktivität und das Wachstum der Zellen auswirkt. Der Crabtree-Effekt und seine Auswirkungen auf die wichtigen Stoffwechselwege, wie die Glycolyse und den Citratzyklus werden im theoretischen Teil dieser Arbeit ausführlich beschrieben.

Die Ergebnisse legen nahe, dass in den sortierten Zelllinien eine höhere Menge an Mitochondrien enthalten ist. Dies lässt das spätere Einsetzen des Crabtree-Effektes schließen. Die sortierten Zellen produzieren mit einer geringeren Rate Lactat und der Glutaminverbrauch ist zu Beginn der Kultivierungen geringer. Zudem zeigen sie deutlich veränderte ADP/ATP Verhältnisse. Vermutlich erlaubt der höhere Mitochondriengehalt der Zellen eine Einschleusung von Pyruvat in den Citratzyklus, bevor die inhibierenden Effekte des Crabtree-Effektes wirken. Dies führt dazu, dass eine höhere maximale Zelldichte erreicht wurde und die Viabilität der Zellen im Kultivierungsverlauf, verglichen mit der der unsortierten Zellen, langsamer abnimmt.

Das Verfahren der hier erarbeiteten Sortierung trägt somit nachweislich zu einem optimierten Stoffwechsel bei. Eine Übertragung des Verfahrens auf die Activin A produzierende CHO-Zelllinie könnte in weiteren Versuchen zu einer höheren Ausbeute an Activin A führen.

## 5. ANHANG

---

### 5.1. LITERATURVERZEICHNIS

- Aledo (2004). "**Glutamine breakdown in rapidly dividing cells: waste or investment?**" *Bioessays* 26(7): 778-785.
- Appelblad, Jonsson, Jiang und Irgum (2008). "**Fast hydrophilic interaction liquid chromatographic separations on bonded zwitterionic stationary phase.**" *Journal of Separation Science* 31(9): 1529-1536.
- Bamberger, Scharer, Antsiferova, Tytsen, Pankow, Muller, Rulicke, Paus und Werner (2005). "**Activin controls skin morphogenesis and wound repair predominantly via stromal cells and in a concentration-dependent manner via keratinocytes.**" *Am J Pathol* 167(3): 733-747.
- Barnabe und Butler (2000). "**The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma.**" *Cytotechnology* 34(1-2): 47-57.
- Barnes, Bentley und Dickson (2000). "**Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system.**" *Cytotechnology* 32(2): 109-123.
- Barnes, Bentley und Dickson (2001). "**Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system.**" *Biotechnol Bioeng* 73(4): 261-270.
- Beck, Wagner-Rousset, Bussat, Lokteff, Klinguer-Hamour, Haeuw, Goetsch, Wurch, Van Dorsseleer und Corvaia (2008). "**Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins.**" *Curr Pharm Biotechnol* 9(6): 482-501.
- Berg (2007). **Biochemie.** Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Blochlinger und Diggelmann (1984). "**Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells.**" *Mol Cell Biol* 4(12): 2929-2931.
- Borrebaeck (1993). "**Does endogenous glycosylation prevent the use of mouse monoclonal antibodies as cancer therapeutics?**" *Immunol. Today* 14(10): 477-479.
- Borth, Strutzenberger, Kunert, Steinfeldner und Katinger (1999). "**Analysis of changes during subclone development and ageing of human antibody-producing heterohybridoma cells by northern blot and flow cytometry.**" *J Biotechnol* 67(1): 57-66.
- Brezinsky, Chiang, Szilvasi, Mohan, Shapiro, MacLean, Sisk und Thill (2003). "**A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity.**" *J Immunol Methods* 277(1-2): 141-155.
- Browne und Al-Rubeai (2007). "**Selection methods for high-producing mammalian cell lines.**" *Trends Biotechnol* 25(9): 425-432.
- Butler (2005). "**Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals.**" *Appl Microbiol Biotechnol* 68(3): 283-291.
- Caron, Nicolas, Gaillet, Ba, Pinard, Garnier, Massie und Gilbert (2009). "**Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins.**" *BMC Biotechnol* 9: 42.
- Chaga (2001). "**Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future.**" *J Biochem Biophys Methods* 49(1-3): 313-334.
- Chenuet, Martinet, Besuchet-Schmutz, Wicht, Jaccard, Bon, Derouazi, Hacker, Beckmann und Wurm (2008). "**Calcium phosphate transfection generates mammalian recombinant cell lines with higher specific productivity than polyfection.**" *Biotechnol Bioeng* 101(5): 937-945.
- Coller und Coller (1986). "**Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality.**" *Methods Enzymol* 121: 412-417.
- Cote, Garnier, Massie und Kamen (1998). "**Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells.**" *Biotechnol Bioeng* 59(5): 567-575.
- Cruz, Conradt, Dunker, Peixoto, Cunha, Thomaz, Burger, Dias, Clemente, Moreira, Rieke und Carrondo (2002). "**Process development of a recombinant antibody/interleukin-2 fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells.**" *J Biotechnol* 96(2): 169-183.
- Cruz, Freitas, Alves, Moreira und Carrondo (2000). "**Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells.**" *Enzyme Microb Technol* 27(1-2): 43-52.
- Davies und Jimenez (1980). "**A new selective agent for eukaryotic cloning vectors.**" *Am J Trop Med Hyg* 29(5 Suppl): 1089-1092.

- De Jesus und Wurm (2011). "**Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors.**" *Eur J Pharm Biopharm* 78(2): 184-188.
- de la Luz-Hernandez, Rojas-del Calvo, Rabasa-Legon, Lage-Castellanos, Castillo-Vitlloch, Diaz und Gaskell (2008). "**Metabolic and proteomic study of NS0 myeloma cell line following the adaptation to protein-free medium.**" *J Proteomics* 71(2): 133-147.
- Denizli, Alkan, Garipcan, Ozkara und Piskin (2003). "**Novel metal-chelate affinity adsorbent for purification of immunoglobulin-G from human plasma.**" *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 795(1): 93-103.
- Deparis, Jestin, Marc und Goergen (2003). "**Use of flow cytometry to monitor infection and recombinant human alpha-1,3/4 fucosyltransferase production in baculovirus infected Sf9 cell cultures.**" *Biotechnol Prog* 19(2): 624-630.
- Diaz-Ruiz, Rigoulet und Devin (2011). "**The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression.**" *Biochim Biophys Acta* 1807(6): 568-576.
- Dodge, Ji und Hu (1987). "**Loss of Viability in Hybridoma Cell-Culture - a Kinetic-Study.**" *Enzyme and Microbial Technology* 9(10): 607-611.
- Dong, Chen und Sun (2009). "**Refolding and purification of histidine-tagged protein by artificial chaperone-assisted metal affinity chromatography.**" *J Chromatogr A* 1216(27): 5207-5213.
- Fallaux, Bout, van der Velde, van den Wollenberg, Hehir, Keegan, Auger, Cramer, van Ormondt, van der Eb, Valerio und Hoeben (1998). "**New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses.**" *Hum Gene Ther* 9(13): 1909-1917.
- Fan, Fang, Zhang und Zhang (2007). "**Putative zinc finger protein binding sites are over-represented in the boundaries of methylation-resistant CpG islands in the human genome.**" *PLoS One* 2(11): e1184.
- Fann, Guarna, Kilburn und Piret (1999). "**Relationship between recombinant activated protein C secretion rates and mRNA levels in baby hamster kidney cells.**" *Biotechnol Bioeng* 63(4): 464-472.
- Fann, Guirgis, Chen, Lao und Piret (2000). "**Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells.**" *Biotechnol Bioeng* 69(2): 204-212.
- Fitzpatrick, Jenkins und Butler (1993). "**Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture.**" *Appl Biochem Biotechnol* 43(2): 93-116.
- Florin, Lipske, Becker und Kaufmann (2011). "**Supplementation of serum free media with HT is not sufficient to restore growth properties of DHFR-/- cells in fed-batch processes - Implications for designing novel CHO-based expression platforms.**" *J Biotechnol* 152(4): 189-193.
- Funaba, Murata, Fujimura, Murata, Abe, Takahashi und Torii (1996). "**Unique recognition of activin and inhibin by polyclonal antibodies to inhibin subunits.**" *J Biochem* 119(5): 953-960.
- Galvez, Lecina, Sola, Cairo und Godia (2011). "**Optimization of HEK-293S cell cultures for the production of adenoviral vectors in bioreactors using on-line OUR measurements.**" *J Biotechnol*.
- Gambhir, Korke, Lee, Fu, Europa und Hu (2003). "**Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states.**" *J Biosci Bioeng* 95(4): 317-327.
- Gasser, Simonsen, Schilling und Schimke (1982). "**Expression of abbreviated mouse dihydrofolate reductase genes in cultured hamster cells.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(21): 6522-6526.
- Girod, Nguyen, Calabrese, Puttini, Grandjean, Martinet, Regamey, Saugy, Beckmann, Bucher und Mermod (2007). "**Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells.**" *Nat Methods* 4(9): 747-753.
- Graham, Smiley, Russell und Nairn (1977). "**Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.**" *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Haake (2012). **Prozesse zur Produktion, Aufreinigung und Testung von rekombinanten humanen Zytokinen in chinese hamster ovary-Zellen.** Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, Hannover
- Haase, Argyros, Wong, Harbottle, Lipps, Ogris, Magnusson, Vizoso Pinto, Haas und Baiker (2010). "**pEPito: a significantly improved non-viral episomal expression vector for mammalian cells.**" *BMC Biotechnol* 10: 20.
- Hacker, De Jesus und Wurm (2009). "**25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here?**" *Biotechnol Adv* 27(6): 1023-1027.
- Hanania, Fieck, Stevens, Bodzin, Palsson und Koller (2005). "**Automated in situ measurement of cell-specific antibody secretion and laser-mediated purification for rapid cloning of highly-secreting producers.**" *Biotechnol Bioeng* 91(7): 872-876.
- Hanson und Gellman (1998). "**Mechanistic comparison of artificial-chaperone-assisted and unassisted refolding of urea-denatured carbonic anhydrase B.**" *Fold Des* 3(6): 457-468.

- Herling, König, Bulik und Holzhutter (2011). "Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells." FEBS J 278(14): 2436-2459.
- Hermonat und Muzyczka (1984). "Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells." Proc Natl Acad Sci U S A 81(20): 6466-6470.
- Ho, Kiparissides, Pistikopoulos und Mantalaris (2011). "Computational approach for understanding and improving GS-NSO antibody production under hyperosmotic conditions." J Biosci Bioeng.
- Hoch (2010). Entwicklung eines Expressionssystems für rekombinante Antikörper in mammalischen Zellen. Fakultät für Lebensmittelwissenschaften, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig
- Huang, Hu, Rustandi, Chang, Yusuf-Makagiansar und Ryll (2010). "Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment." Biotechnol Prog 26(5): 1400-1410.
- Irani, Beccaria und Wagner (2002). "Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells." J Biotechnol 93(3): 269-282.
- Iyer, Ostrove und Vacante (1999). "Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production." Cytotechnology 30(1-3): 169-172.
- James, Levine, Besser und Hemmati-Brivanlou (2005). "TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells." Development 132(6): 1273-1282.
- Jayapal, Wlaschin, Hu und Yap (2007). "Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting." Chemical Engineering Progress 103(10): 40-47.
- Jenuwein und Allis (2001). "Translating the histone code." Science 293(5532): 1074-1080.
- Jiang, Huang und Sharfstein (2006). "Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression." Biotechnol Prog 22(1): 313-318.
- Jones, Kroos, Anema, van Montfort, Vooys, van der Kraats, van der Helm, Smits, Schouten, Brouwer, Lagerwerf, van Berkel, Opstelten, Logtenberg und Bout (2003). "High-level expression of recombinant IgG in the human cell line per.c6." Biotechnol Prog 19(1): 163-168.
- Jun, Kim, Hong und Lee (2006). "Limitations to the development of humanized antibody producing Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification." Biotechnol Prog 22(3): 770-780.
- Jungbauer, Kaar und Schlegl (2004). "Folding and refolding of proteins in chromatographic beds." Curr Opin Biotechnol 15(5): 487-494.
- Karlson (1994). Biochemie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Kaufman und Schimke (1981). "Amplification and loss of dihydrofolate reductase genes in a Chinese hamster ovary cell line." Mol Cell Biol 1(12): 1069-1076.
- Kim, Kim und Lee (1998). "Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: stability in the absence of selective pressure." Biotechnol Bioeng 60(6): 679-688.
- Kim, Samaranyake und Pradhan (2009). "Epigenetic mechanisms in mammals." Cell Mol Life Sci 66(4): 596-612.
- Klon, Heroux, Ross, Pathak, Johnson, Piper und Borhani (2002). "Atomic structures of human dihydrofolate reductase complexed with NADPH and two lipophilic antifolates at 1.09 Å and 1.05 Å resolution." J Mol Biol 320(3): 677-693.
- Knappskog, Ravneberg, Gjerdrum, Trosse, Stern und Pryme (2007). "The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide." J Biotechnol 128(4): 705-715.
- Kou, Fan, Ye, Zhou, Liu, Zhao und Tan (2011). "Process analysis of reduced specific productivity of TNFR-Fc in Chinese hamster ovary cells at high cell density." Process Biochemistry 46(7): 1492-1499.
- Krämer (2008). Rekombinante Arzneimittel- medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Kuczewski, Schirmer, Lain und Zarbis-Papastoytis (2011). "A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line." Biotechnol J 6(1): 56-65.
- Kwaks, Barnett, Hemrika, Siersma, Sewalt, Satijn, Brons, van Blokland, Kwakman, Kruckeberg, Kelder und Otte (2003). "Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells." Nat Biotechnol 21(5): 553-558.
- Lakhiari und Muller (2004). "Insulin adsorption on coated silica based supports grafted with N-acetylglucosamine by liquid affinity chromatography." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 808(1): 35-41.

- Lanks und Li (1988). "End products of glucose and glutamine metabolism by cultured cell lines." *J Cell Physiol* 135(1): 151-155.
- Lao und Toth (1997). "Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture." *Biotechnol Prog* 13(5): 688-691.
- Link (2003). **Glucoselimitierung als Strategie zur Steigerung der Produktion von MUC1 und anderen rekombinanten Glycoproteinen mit CHO-Zellen.** Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich in der Helmholtz-Gemeinschaft, Universität Bonn, Bonn
- Liu, Jan, Chou, Chen und Ke (1999). "Is green fluorescent protein toxic to the living cells?" *Biochem Biophys Res Commun* 260(3): 712-717.
- Liu, O'Kane und Escher (1997). "Secretion of functional *Renilla reniformis* luciferase by mammalian cells." *Gene* 203(2): 141-148.
- Lucas, Giere, DeMarco, Shen, Chisholm und Crowley (1996). "High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector." *Nucleic Acids Res* 24(9): 1774-1779.
- Luttmann (2006). **Immunology The Experimenter Series.** Burlington, Academic Press.
- Mahmoud (2007). "Recombinant Protein Production: Strategic Technology ans a Vital Research Tool." *Journal of Cell and Molecular Biology* 1(1): 9-22.
- Manz, Assenmacher, Pfluger, Miltenyi und Radbruch (1995). "Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6): 1921-1925.
- Marder, Maciak, Fouts, Baker und Starling (1990). "Selective cloning of hybridoma cells for enhanced immunoglobulin production using flow cytometric cell sorting and automated laser nephelometry." *Cytometry* 11(4): 498-505.
- Matsuo, Leoni, Colquhoun und Kimura (2006). "Transforming growth factor-beta1 and activin A generate antiproliferative signaling in thyroid cancer cells." *J Endocrinol* 190(1): 141-150.
- Mulukutla, Khan, Lange und Hu (2010). "Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways." *Trends Biotechnol* 28(9): 476-484.
- Neermann und Wagner (1996). "Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells." *J Cell Physiol* 166(1): 152-169.
- Nelson, Reynolds, Waldron, Ward, Giannopoulos und Murray (2000). "Monoclonal antibodies." *Mol Pathol* 53(3): 111-117.
- Oestereicher (2004). **Identifizierung und Charakterisierung von neuen Proteinen, die mit den humanen Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF) und IGF-Bindungsproteinen interagieren.** Fachbereich Biologie, Universität Hamburg, Hamburg
- Ohga, Matsuse, Teramoto, Katayama, Nagase, Fukuchi und Ouchi (1996). "Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 228(2): 391-396.
- Okonkowski, Balasubramanian, Seamans, Fries, Zhang, Salmon, Robinson und Chartrain (2007). "Cholesterol delivery to NS0 cells: challenges and solutions in disposable linear low-density polyethylene-based bioreactors." *J Biosci Bioeng* 103(1): 50-59.
- Omasa, Higashiyama, Shioya und Suga (1992). "Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation." *Biotechnol Bioeng* 39(5): 556-564.
- Otte, Kwaks, van Blokland, Sewalt, Verhees, Klaren, Siersma, Korse, Teunissen, Botschuijver, van Mer und Man (2007). "Various expression-augmenting DNA elements benefit from STAR-Select, a novel high stringency selection system for protein expression." *Biotechnol Prog* 23(4): 801-807.
- Ozturk, Riley und Palsson (1992). "Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production." *Biotechnol Bioeng* 39(4): 418-431.
- Perez-Rodriguez, Sanchez-Jimenez, Marquez, Medina, Quesada und Nunez de Castro (1987). "Malate-citrate cycle during glycolysis and glutaminolysis in Ehrlich ascites tumor cells." *Biochimie* 69(5): 469-474.
- Petch und Butler (1994). "Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization." *J Cell Physiol* 161(1): 71-76.
- Pichler, Hesse, Wieser, Kunert, Galosy, Mott und Borth (2009). "A study on the temperature dependency and time course of the cold capture antibody secretion assay." *J Biotechnol* 141(1-2): 80-83.
- Powell und Weaver (1990). "Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population." *Biotechnology (N Y)* 8(4): 333-337.
- Reik und Dean (2001). "DNA methylation and mammalian epigenetics." *Electrophoresis* 22(14): 2838-2843.
- Reuveny, Velez, Macmillan und Miller (1986). "Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors." *J Immunol Methods* 86(1): 53-59.
- Rider (2006). "Heparin/heparan sulphate binding in the TGF-beta cytokine superfamily." *Biochem Soc Trans* 34(Pt 3): 458-460.

- Ringold, Dieckmann und Lee (1981). "**Co-expression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the Escherichia coli XGPRT gene in Chinese hamster ovary cells.**" *J Mol Appl Genet* 1(3): 165-175.
- Risbridger, Schmitt und Robertson (2001). "**Activins and inhibins in endocrine and other tumors.**" *Endocr Rev* 22(6): 836-858.
- Sandhu und Al-Rubeai (2008). "**Monitoring of the adenovirus production process by flow cytometry.**" *Biotechnol Prog* 24(1): 250-261.
- Schambach, Bohne, Chandra, Will, Margison, Williams und Baum (2006a). "**Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells.**" *Mol Ther* 13(2): 391-400.
- Schambach, Galla, Modlich, Will, Chandra, Reeves, Colbert, Williams, von Kalle und Baum (2006b). "**Lentiviral vectors pseudotyped with murine ecotropic envelope: increased biosafety and convenience in preclinical research.**" *Exp Hematol* 34(5): 588-592.
- Schirmer (2010). "**Primary Clarification of Very High-Density Cell Culture Harvests By Enhanced Cell Settling.**" *BioProcess International* 8(1): 32-39.
- Schmitz (2009). **Der Experimentator Zellkultur.** Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Sen, Hu und Srienc (1990). "**Flow cytometric study of hybridoma cell culture: correlation between cell surface fluorescence and IgG production rate.**" *Enzyme Microb Technol* 12(8): 571-576.
- Seth, Charaniya, Wlaschin und Hu (2007). "**In pursuit of a super producer-alternative paths to high producing recombinant mammalian cells.**" *Curr Opin Biotechnol* 18(6): 557-564.
- Shapiro, Feinstein, Kirsch und Christenson (1983). "**Multistation multiparameter flow cytometry: some influences of instrumental factors on system performance.**" *Cytometry* 4(1): 11-19.
- Shav-Tal und Zipori (2002). "**The role of activin a in regulation of hemopoiesis.**" *Stem Cells* 20(6): 493-500.
- Shi, Tian, Dong, Bai und Sun (2003). "**Chitosan-coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption.**" *Biochemical Engineering Journal* 16(3): 317-322.
- Sitton und Srienc (2008). "**Mammalian cell culture scale-up and fed-batch control using automated flow cytometry.**" *J Biotechnol* 135(2): 174-180.
- Song, Raphaelli, Jones, Aliabadi-Zadeh, Leung, Crowley, Hughes, Mahler, Gray, Huang und Chin (2011). "**Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening.**" *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86(7): 935-941.
- Spens und Haggstrom (2009). "**Proliferation of NS0 cells in protein-free medium: the role of cell-derived proteins, known growth factors and cellular receptors.**" *J Biotechnol* 141(3-4): 123-129.
- Stamler, Keutmann, Sidis, Kattamuri, Schneyer und Thompson (2008). "**The structure of FSTL3.activin A complex. Differential binding of N-terminal domains influences follistatin-type antagonist specificity.**" *J Biol Chem* 283(47): 32831-32838.
- Strutzenberger, Borth, Kunert, Steinfeldner und Katinger (1999). "**Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant CHO cells.**" *J Biotechnol* 69(2-3): 215-226.
- Taschwer, Hackl, Hernandez Bort, Leitner, Kumar, Puc, Grass, Papst, Kunert, Altmann und Borth (2012). "**Growth, productivity and protein glycosylation in a CHO EpoFc producer cell line adapted to glutamine-free growth.**" *J Biotechnol* 157(2): 295-303.
- Tchoudakova, Hensel, Murillo, Eng, Foley, Smith, Schoenen, Hildebrand, Kelter, Ilag, Vollmers, Brandlein, McIninch, Chon, Lee und Cacciuto (2009). "**High level expression of functional human IgMs in human PER.C6 cells.**" *MAbs* 1(2): 163-171.
- Thyagarajan und Calos (2005). "**Site-specific integration for high-level protein production in mammalian cells.**" *Methods Mol Biol* 308: 99-106.
- Tsai, Wang und Suen (2002). "**Purification of hepatocyte growth factor using polyvinylidene fluoride-based immobilized metal affinity membranes: equilibrium adsorption study.**" *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 766(1): 133-143.
- Tsao, Cardoso, Condon, Voloch, Lio, Lagos, Kearns und Liu (2005). "**Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism.**" *J Biotechnol* 118(3): 316-327.
- Tunon und Johansson (1984). "**Yet Another Improved Silver Staining Method for the Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels.**" *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 9(2): 171-179.
- Ueda, Gout und Morganti (2003). "**Current and prospective applications of metal ion-protein binding.**" *J Chromatogr A* 988(1): 1-23.
- Underwood und Bean (1988). "**Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas.**" *J Immunol Methods* 107(1): 119-128.
- Urlaub, Kas, Carothers und Chasin (1983). "**Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells.**" *Cell* 33(2): 405-412.

- van Blokland, Kwaks, Sewalt, Verhees, Klaren, Siersma, Korse, Teunissen, Botschuijver, van Mer, Man und Otte (2007). "**A novel, high stringency selection system allows screening of few clones for high protein expression.**" J Biotechnol 128(2): 237-245.
- Weaver, McGrath und Adams (1997). "**Gel microdrop technology for rapid isolation of rare and high producer cells.**" Nat Med 3(5): 583-585.
- Wu, Suen, Chen und Tzeng (2003). "**Analysis of protein adsorption on regenerated cellulose-based immobilized copper ion affinity membranes.**" J Chromatogr A 996(1-2): 53-70.
- Wurm (2004). "**Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.**" Nat Biotechnol 22(11): 1393-1398.
- Xiong, Liang, Xiong, Zou, Gao, Zhao und Zhang (2005). "**Expression of chimeric antibody in mammalian cells using dicistronic expression vector.**" Biotechnol Lett 27(21): 1713-1717.
- Yang, Mariati, Chusainow und Yap (2010). "**DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines.**" J Biotechnol 147(3-4): 180-185.
- Zhang, Frost, Blundell, Bales, Antoniou und Thrasher (2010). "**A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors.**" Mol Ther 18(9): 1640-1649.
- Zhang, Shen und Zhang (2004). "**Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy.**" Journal of Chemical Technology and Biotechnology 79(2): 171-181.
- Zhou, Liu, Sun, Huang und Yu (2010). "**Generation of stable cell lines by site-specific integration of transgenes into engineered Chinese hamster ovary strains using an FLP-FRT system.**" J Biotechnol 147(2): 122-129.

## 5.2. MATERIALIEN

### 5.2.1. GERÄTE

Biostat Bplus Steuereinheit	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Cleanbench MSC Advantage	Thermo Scientific, Waltham
Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Beckmann-Coulter, Florida
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences, Piscataway
Elektrophoresekammer	Biorad Laboratories GmbH, München
FACS Vantage SE	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Feinwaage MC 1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
FPLC BioLogic AVR7-3	Biorad Laboratories GmbH, München
Fraktionssammler Model 2128	Biorad Laboratories GmbH, München
Inkubationsschrank	Thermo Electron Corporation, Erlangen
Lichtmikroskop Olympus BH-2	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Magnetrührer RCTb	IKA Werke GmbH, Staufen
Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
O2-Sensor OXYFERM	Hamilton, Bonaduz
pH-Elektrode Checker	Hanna Instruments Ltd, Leighton
Philips Comfort plus	Philips, Hamburg
Reinstwasseranlage Arium 611	Sartorius, Göttingen
S-Membran Sartobind S75	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultraschallsonde	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Vortex-Mixer VM-300	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
YSI 2700 SELECT Analyzer	YSI Yellow Springs Instruments, Yellow Springs
Zentrifuge Multifuge 3s	Heraeus Holding GmbH, Hanau

### 5.2.2. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Einmalhandschuhe Semperguard	Semperit AG Holding, Wien
Einmalpipetten; 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Erlenmeyerkolben 125 und 250 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Falcon- <i>tubes</i> 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Kryoröhrchen 1,6 ml	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Pipettenspitzen Typ A, B, D	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Protino Ni-TED Säulen	Marcherey-Nagel, Düren
PVDF Membran	Biorad Laboratories GmbH, München
Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Spritzen 10 ml, 20 mL, 50 ml	Terumo Europe NV, Leuven
Spritzenvorsatzfilter Minisart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Vivaflow 50 Sartorius	Stedim Biotech, Göttingen
Vivaspin 2, 6 und 20 ml	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Zellkulturplatten	Nunc ThermoFischer, Langenselbold

### 5.2.3. CHEMIKALIEN

Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Fluka Chemie AG, Buchs
Ammoniumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Bismethylenacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure	Fluka Chemie AG, Buchs
Bromphenolblau	Sigma Aldrich GmbH, Seelze
Cobaltsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie Blue G-250	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA	Sigma Aldrich GmbH, Seelze
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs
Glucose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Glutaraldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs
Glycerin	Fluka Chemie AG, Buchs
Glycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze
HA-Peptid	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Seelze
HEPES	Fluka Chemie AG, Buchs
Imidazol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka Chemie AG, Buchs
Kupfersulfat	Merck KgaA, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe

Magnesiumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumazid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumborat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Natriumcarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, Buchs, CH
Natriumhydroxid	Fluka Chemie AG, Buchs
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Fluka Chemie AG, Buchs
Natronlauge	Honeywell Riedel-de Haën, Seelze
Nickelsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, Seelze
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Propidium-Iodid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, Seelze
Salzsäure	Fluka Chemie AG, Buchs
Saponin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, Seelze
SDS	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, Seelze
Silbernitrat	Honeywell Specialty Chemicals GmbH, Seelze
TEMED	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, Seelze
TRIS (Base)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, Seelze
TRIS-HCl	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, Seelze
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze

Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Natriumacetat	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Seelze
Ortho-Phthaldialdehyd	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Seelze
Trichloressigsäure	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Seelze
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
Tetrahydrofuran	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Seelze
Triton X	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Seelze
Trypsin	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Seelze

#### 5.2.4. ANTIKÖRPER, ZELLKULTURMEDIEN UND KITS

AP-Konjugat Substrat Kit	Biorad Laboratories GmbH, München
CellTiter Blue	Promega, Mannheim
DMEM	Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Mouse-Anti-his-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz
Murin IgG ELISA	Roche GmbH, Basel
Page Ruler 0661	Fermentas GmbH, Leon-Rot
Page Ruler 1841	Fermentas GmbH, Leon-Rot
proCHO5-Medium	Lonza, Basel
Ziege Anti murin IgG-Antikörper (AP-Konjugat)	Biorad Laboratories GmbH, München

#### 5.2.5. ZELLINIEN

CHO <sup>SFS</sup>	CCS, Hamburg
SC-71	DSMZ, Braunschweig
NIH 3T3	DSMZ, Braunschweig

## 5.3. METHODEN

### 5.3.1. ZELLKULTURTECHIKEN

#### 5.3.1.1. KULTIVIERUNG VON CHO-ZELLEN

Die CHO-Zellen werden in T-Flaschen statisch bis zu einem Volumen von 15 ml kultiviert. Verwendet werden T-25-Flaschen für ein Volumen von bis zu 5 ml und T-75-Flaschen für ein Volumen bis 15 ml. Größere Volumina werden in 50 ml-Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 20 ml oder in 100 ml-Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 50 ml kultiviert. Die Schüttelkolben werden bei 110 rpm geschüttelt. Alle Kultivierungen werden im Inkubationsschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und maximaler Luftfeuchtigkeit in proCHO5-Medium (1 % Vol. P/S) durchgeführt. Zellen mit dem Selektionsmarker DHFR<sup>+</sup> werden ohne Zusätze von Hypoxanthin und Thymidin kultiviert.

Nach maximal vier Tagen werden die Zellen passagiert oder expandiert. Das Trennen von Zellen und gebrauchtem Medium erfolgt über Zentrifugation (400 × g, 3 min). Das erhaltene Pellet wird anschließend in vorgewärmtem Medium bei einer Zelldichte von 4 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml resuspendiert. Bei einer Passagierung werden überschüssige Zellen verworfen. Bei einer Expansion der Zellen werden diese, unter Berücksichtigung der Animpfdichte, im gewünschten Volumen aufgenommen.

#### Kultivierung im Bioreaktor

Die Kultivierung erfolgte in einem 1,5 l-Stahlreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,1 l. Die Steuerung erfolgte über eine BIOSTAT B plus Steuereinheit. Die Vorkulturen wurden in 100 ml-Spinnerflaschen mit 50 ml Arbeitsvolumen kultiviert. Aus der Vorkultur wurde der Reaktor mit 4 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml in 1100 ml angeimpft. Die Regulation des pH-Wertes erfolgte über Zugabe von Säure (1 M HCl) und Base (1 M NaOH). Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C, pH 7,3 und einem Gelöst-Sauerstoff 10,5 %. Die Begasung erfolgte über einen Begasungsring mit einer maximalen Rate von 4 ml/min. Die Durchmischung erfolgte über einen 3-Blatt-Segmentrührer bei 200 rpm. Alle verwendeten Schläuche und Filter sind Zubehörteile der Steuereinheit.

TABELLE 3 - KULTIVIERUNGSPARAMETER DER CHO-BIOREAKTORKULTIVIERUNG

Kultivierungsparameter	
Temperatur	37 °C
pH	7,3
Rührergeschwindigkeit	200 rpm
Gelöst-Sauerstoff	10,5 %

#### **5.3.1.2. KULTIVIERUNG VON HYBRIDOMZELLINIE SC-71**

Die SC-71-Hybridomzellen werden in T-Flaschen statisch bis zu einem Volumen von 15 ml kultiviert. Verwendet werden T-25-Flaschen für ein Volumen von bis zu 5 ml und T-75-Flaschen für ein Volumen bis 15 ml. Größere Volumina werden in 50 ml-Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 20 ml kultiviert. Die Schüttelkolben werden bei 110 rpm geschüttelt. Alle Kultivierungen werden im Inkubationsschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und maximaler Luftfeuchtigkeit in DMEM (10 % Vol. FKS, 1 % Vol. P/S, 4 mM Glutamin) durchgeführt.

Nach maximal drei Tagen werden die Zellen passagiert oder expandiert. Das Trennen von Zellen und gebrauchtem Medium erfolgt über Zentrifugation (200 × g, 5 min). Das erhaltene Pellet wird anschließend in vorgewärmtem Medium bei einer Zelldichte von 4 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml resuspendiert. Bei einer Passagierung werden überschüssige Zellen verworfen. Bei einer Expandierung der Zellen werden diese, unter Berücksichtigung der Animpfdichte, im gewünschten Volumen aufgenommen.

#### **5.3.1.3. KULTIVIERUNG VON NIH-3T3-ZELLEN**

Die adhärent wachsende murine Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 wird in DMEM (10 % Vol. FKS, 1 % Vol. P/S) im Inkubationsschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung und maximaler Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Nach maximal 3 Tagen werden die Zellen passagiert. Dazu werden die Zellen nach dem Absaugen des Überstands mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/25 cm<sup>2</sup> vom Boden des Kultivierungsgefäßes gelöst. Nach circa 3 min wird die Reaktion durch Zugabe von einigen ml Serum-haltigen Medium gestoppt. Der Vorgang des Trypsinierens wird unter dem Mikroskop beobachtet um eine Beschädigung der Zellen zu verhindern. Es wird die Viabilität und die Zellzahl bestimmt und nach die Zellen in einer Dichte von 4 × 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

#### **5.3.1.4. KRYOKONSERVIERUNG UND REVITALISIERUNG**

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff. Die Zellen werden im jeweiligen Kulturmedium mit 10 % Vol. DMSO und mit einer Gesamtzellzahl von 1 × 10<sup>7</sup> Zellen/ml pro Kryogefäße (1,8 ml) eingefroren. Der Einfriervorgang erfolgt in einem mit Isopropanol gefüllten Behältnis bei -80 °C, um die Zellsuspension langsam abzukühlen. Nach 24 h wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Revitalisierung werden die Kryogefäße in einem 37 °C warmen Wasserbad angetaut. Hierbei wird der Schmelzvorgang nicht vollständig im Kryogefäß durchgeführt, sondern die Zellsuspension soweit erwärmt, dass noch gefrorenes Medium im Inneren der Zellsuspension vorhanden ist. Diese wird anschließend in 20 ml warmes Medium überführt. Zur Entfernung des DMSO-haltigen Mediums werden die Zellen von diesem mittels Zentrifugation (200 × g, 5 min) getrennt und in frischem Medium, unter Berücksichtigung der jeweiligen Animpfdichte, aufgenommen. Nach 24 h werden die Zellen erneut passagiert.

#### **5.3.1.5. VIABILITÄTS- UND ZELLZAHLBESTIMMUNG**

Die Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer am Mikroskop. Die entsprechende Zellsuspension wird 1:1 mit Trypanblau-Lösung (5 % Vol.) vermischt und für 30 s inkubiert. Der blaue Farbstoff kann in die nekrotische Zellen diffundieren, wodurch sie anschließend unter dem Mikroskop optisch unterscheidbar sind. Die toten und lebenden Zellen in den Großquadranten der Zellkammer werden separat ausgezählt und anschließend mit dem Faktor 5000 multipliziert um die Zellzahl/ml zu erhalten. Die Viabilität ergibt sich aus dem Quotient aus Lebend- und Gesamtzellzahl.

#### **5.3.1.6. VITALITÄTBESTIMMUNG**

Die Vitalität (die Stoffwechselaktivität) wird indirekt mittels des CellTiter-Blue Kits (Promega) bestimmt. Bei diesem Assay wird der Farbstoff Resazurin durch stoffwechselaktive Zellen in Resofurin umgewandelt. Dieses kann mittels Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden (Exitation 579 nm, Emission 584 nm).

### **5.3.2. ANALYTISCHE METHODEN**

#### **5.3.2.1. SDS-PAGE UND SILBERFÄRBUNG**

Bei einer SDS-PAGE werden Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Eigenladungen der Proteine werden dabei mit dem anionischen Detergenz SDS überlagert. Dies sorgt dafür, dass sich die Proteine abhängig von ihrer Masse in dem elektrischen Feld bewegen. Als Trennmedium wird bei der SDS-PAGE ein Gel auf Polyacrylamidbasis verwendet. Die Migrationsgeschwindigkeit der Teilchen hängt dabei von der angelegten Spannung und dem Polyacrylamid-Anteil des Gels ab.

Zur Probenvorbereitung wird die zu untersuchende Proteinlösung 1:1 mit Probenpuffer versetzt und anschließend erhitzt (95 °C, 5 min). Zur Anfertigung eines SDS-PAGE-Gels wird zunächst ein Trenngel hergestellt und zwischen die beiden Glasplatten einer Gießapparatur gegeben. Nach 30 minütiger Polymerisation wird das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und mit einem Kamm bestückt. Dieser sorgt für die Bildung von Probenaschen im Sammelgel. Nach 30 minütiger Polymerisation wird er Kamm entfernt und die Proben in die entstandenen Taschen pipettiert (20 µl). Das vorbereitete Gel wird in der Laufkammer befestigt und Laufpuffer eingefüllt. Die Proben sowie der Protein-Marker (3,5 µl) werden in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Zunächst wird eine Spannung von 80 V angelegt, bis sich die Proben an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel gesammelt haben (ca. 10 min). Anschließend wird die Spannung auf 180 V erhöht. Die Auftrennung benötigt circa 60 min. Zur Visualisierung der Proteinbanden wird anschließend eine Silberfärbung durchgeführt. Ein spezifischer Nachweis eines Proteins kann über einen Western Blot erfolgen.

TABELLE 4 - ZUSAMMENSETZUNG SDS-GELE

	Sammelgel	Trenngel (12 %)
Acrylamid (40 %)	750 µl	3 ml
TRIS (1,5 M, pH 8,8)	-	2,5 ml
TRIS (1,5 M, pH 6,8)	1,25 ml	-
SDS (1 % Vol.)	520 µl	1 ml
VE-Wasser	2,46 ml	1,78 ml
TEMED	10 µl	20 µl
APS (25 % Vol.)	10 µl	20 µl

Verwendete Puffer:

Probenpuffer 20 mM TRIS, 2 mM ETDA, 5 % Vol. SDS, 0,02 % Vol. Bromphenolblau in 90 ml VE-Wasser. Vor der Verwendung werden 10 % Vol. Mecaptoethanol und 10 % Vol Glycerin hinzugegeben.

Laufpuffer 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % Vol. SDS, pH 8,3

#### Silberfärbung

Bei der Silberfärbung werden die SDS-PAGE-Gele zunächst für 30 min in der Fixierlösung inkubiert. Die Fixierlösung fällt die im Gel enthaltenen Proteine aus, damit diese nicht weiter im Gel diffundieren. Nach zwei Waschschritten mit VE-Wasser wird das Gel für 180 s in *Farmers Reducer* inkubiert und anschließend zweimal 5 min mit VE-Wasser gewaschen. Es wird Silberlösung zugegeben und für 30 min inkubiert und anschließend zweimal 30 s mit VE-Wasser gewaschen. Aus der Silberlösung lagern sich Silber-Ionen an die Proteine an. Durch die Zugabe von Formaldehydlösung werden diese zu sichtbaren Silber reduziert. Die Reaktion wird durch Essigsäure gestoppt. Alle Inkubationsschritte finden auf einer Schüttelplattform statt.

Verwendete Lösungen

Fixierlösung 45 % Vol. Ethanol, 10 % Vol Essigsäure

*Farmers Reducer* 1 Gew. % Kalium-Hexacyanoferrat, 1 Gew. % Natriumthiosulfat

Silberlösung 1 Gew. % Silbernitrat

Natriumcarbonat 2,5 Gew. % Natriumcarbonat

Formaldehydlösung 0,3 % Vol. Formaldehyd, 2,5 Gew. % Natriumcarbonat

Essigsäure 5 % Vol. Essigsäure

### 5.3.2.2. WESTERN BLOT

Bei einem Western Blot werden, mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Anschließend erfolgt ein spezifischer Nachweis eines Proteins mittels immunologischer Färbemethoden unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers. Die Visualisierung erfolgt über einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Die enzymatische Reaktion der Peroxidase katalysiert die Bildung eines sichtbaren Farbstoffes.

Die PVDF-Membran wird mit 96 % Ethanol gewaschen und anschließend zusammen mit dem SDS-PAGE-Gel, den Filter- und den Filzpapieren in Transferpuffer inkubiert. Die Blotkammer wird mit Transferpuffer gefüllt. Der Proteintransfer wird bei  $2 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche für 60 min unter Eiskühlung durchgeführt. Nach dieser Immobilisierung erfolgt die Visualisierung nach folgendem Protokoll:

5 min in VE-Wasser waschen

1 h in Blockpuffer inkubieren

2 h mit der primären Antikörperlösung inkubieren

3 mal 5 min waschen mit Blockpuffer

1 h in der sekundären Antikörperlösung inkubieren

3 mal 5 min waschen mit TBST

2 mal 10 min waschen mit TBS

5 min waschen mit AP Puffer (aus AP Conjugate Substrate Kit von BioRad)

Die Färbereaktion wird ausgelöst durch Zugabe der Farbentwicklungslösung (25 ml AP Puffer und je 250  $\mu\text{l}$  Farbreagenz A und B (aus dem AP Conjugate Substrate Kit von BioRad). Die Reaktion benötigt, je nach Proteinmenge, 5-30 min. Die Färbung mit VE-Wasser gestoppt und die Membran an der Luft getrocknet.

Verwendete Lösungen

Transferpuffer            25 mM TRIS, 190 mM Glycin, 10 % Vol. Ethanol, pH 8,3

TBS-Puffer                25 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,4

TBST-Puffer             25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,5 % Vol. Tween 20, pH 7,4

Blockpuffer              25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,5 % Vol. Tween 20, 2 Gew. % BSA, pH 7,4

AP-Puffer                100 mM TRIS HCl, 100 mM NaCl, 5 mM Magnesiumchlorid ( $\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ), pH 9,5

Primäre Antikörperlösung    mouse-anti-his-Antikörper in Blockpuffer (1:1000)

Sekundäre Antikörperlösung    goat-anti-murin IgG-AP conjugate in TBST-Puffer (1:3000)

### 5.3.2.3. GLUCOSE- UND LACTATBESIMMUNG

Die Konzentrationen von Glucose und Lactat im Kulturüberstand wurden nach Entfernung der Zellen mittels Zentrifugation (3 min, bei 400 × g) mit dem YSI 2700 SELECT Analyzer ermittelt.

### 5.3.2.4. ELISA

Zur Durchführung des ELISA wird das Mouse-IgG-ELISA-Kit (Roche Applied Science) verwendet. Der Kultivierungsüberstand der Hybridomzell-Kultivierungen wird 1:100 mit Blockpuffer verdünnt. Die Konzentration jeder Probe wird in einer dreifach-Bestimmung gemessen. Die Durchführung erfolgt in einer 96-well-Platte.

50 µl capture antibody solution in jedes well

Inkubation (1 h, RT)

Abnehmen der Lösung durch Ausschütten und leichtes Klopfen der Platte auf ein Papiertuch

Waschen der wells mit jeweils 200 µl Waschlösung, 15 s

Abnehmen der Lösung durch Ausschütten und leichtes Klopfen der Platte auf ein Papiertuch

Der Waschschrift wird zweimal wiederholt

Zugabe von jeweils 200 µl Blockpuffer pro well

Inkubation (15 min, RT)

Abnehmen der Lösung durch Ausschütten und leichtes Klopfen der Platte auf ein Papiertuch

Waschen der wells mit jeweils 200 µl Waschlösung, 15 s

Abnehmen der Lösung durch Ausschütten und leichtes Klopfen der Platte auf ein Papiertuch

Der Waschschrift wird zweimal wiederholt

Zugabe von jeweils 50 µl Standard und Probe

Inkubation (1 h, RT)

Ausschütten und leichtes Klopfen der Platte auf ein Papiertuch

Waschen der wells mit jeweils 200 µl Waschlösung, 15 s

Abnehmen der Lösung durch Ausschütten und leichtes Klopfen der Platte auf ein Papiertuch

Der Waschschrift wird zweimal wiederholt

Zugabe von jeweils 50 µl Konjugatlösung

Inkubation (1 h, RT)

Abnehmen der Lösung durch Ausschütten und leichtes Klopfen der Platte auf ein Papiertuch

Waschen der wells mit jeweils 200 µl Waschlösung, 15 s

Abnehmen der Lösung durch Ausschüttel und leichtes Klopfen der Platte auf ein Papiertuch

Der Waschschrift wird zweimal wiederholt

Zugabe von 50 µl Substratlösung

Inkubation (1 h, RT)

Auswertung erfolgt am Microplate reader ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) mit der Software *Skant*.

Alle verwendeten Lösungen und Puffer stammen aus dem Kit „Mouse-IgG ELISA“ von Roche (Katalognummer: 11333151001).

#### **5.3.2.5. BRADFORD-ASSAY**

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung wird der Bradford-Assay verwendet. Der verwendete Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue hat ein Absorptionsmaximum von 470 nm. In saurer Lösung bildet er mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe wodurch sich sein Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Die Zunahme dieser Absorption ist ein Maß für die Proteinkonzentration der entsprechenden Lösung.

Der Assay in 96-well-Platten mit BSA als Referenzprotein im Konzentrationsbereich von 0 bis 2000 µg/ml durchgeführt. Es werden in dreifach-Bestimmung jeweils 10 µl der Test- bzw. Referenzlösungen vorgelegt und 300 µl Bradford-Reagenz zugegeben. Nach 10 min Inkubation werden die Platten 30 s geschüttelt und anschließend im Spektralphotometer ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ) mit der Software *Skant* gemessen.

Verwendete Lösungen

Bradford-Reagenz	0,01 Gew. % Coomassie Blue G-250, 5 % Vol. Ethanol, 10 % Vol. Phosphorsäure in VE-Wasser
------------------	--

#### **5.3.2.6. HPLC-AMINOSÄUREN-ANALYTIK**

Die Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin und Glutamat im Kulturüberstand wurden mittels RP-HPLC (C18 Säule, 5 µm, 3,9x150 mm, Waters Resolve) nach Vorsäulen-Derivatisierung mit Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) ermittelt. Probenvorbehandlung: Zur Fällung der unerwünschten Proteine werden 20 µl zellfreier Kulturüberstand in 80 µl eiskaltes Methanol geträufelt. Durch die Lagerung bei -20 °C für 24 h wurde die Fällung vervollständig. Die gefällten Proteine wurden zentrifugiert (1000 × g, 3 min) und der Überstand mit Boratpuffer entsprechend verdünnt.

Verwendete Puffer und Lösungen

OPA-Reagenz	270 mg Ortho-Phthaldialdehyd wurden in 5 ml Ethanol aufgelöst. 200 µl Mercaptoethanol wurden zugefügt und mit 0,4 M Boratpuffer (12,36 g Borsäure/500 ml) pH 9,5 auf 50 ml aufgefüllt.
-------------	--

Eluent A 13,6 g Natriumacetat-Trihydrat und 12 g Natriumdihydrogenphosphat (wasserfrei) wurden in 2 l VE-Wasser gelöst. 5 ml 10 M NaOH werden zugegeben und mit der NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wurde filtriert. 42 ml Tetrahydrofuran und 42 ml Methanol werden zugegeben

Eluent B 54 % Methanol und 46 % VE-Wasser (% Vol.)

Laufbedingungen: Flussrate 1 ml/min; 30 °C

Detektion: Fluoreszenzdetektor RF-10AxL (Shimadzu, Duisburg) bei Ex 330 / Em 420 nm

TABELLE 5 - HPLC LÖSEMittelGRADIENTEN

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
50	0	100
55	0	100
60	100	0
67	100	0

#### 5.3.2.7. HILIC-MS

Für die Analyse der intrazellulären Metabolite wurde eine HILIC (*hydrophilic interaction chromatography*)-MS Methode genutzt (Appelblad 2008). Die chromatographische Auftrennung der Probe erfolgte auf einer HPLC-Anlage mit dualem Pumpsystem (*ProStar 210 Solvent Delivery Module*; Varian, Darmstadt) und integriertem Autosampler (*ProStar 410 Autosampler*; Varian, Darmstadt). Die verwendete MonoChrom Diol Säule (150x2.1 mm, 3 µm Partikelgröße; Varian, Darmstadt) wurde auf 40 °C temperiert. Laufmittel A (5 mM Ammoniumacetat, 0,1 % Vol. Ameisensäure, pH 3,5) und B (Acetonitril mit 0,1 % Vol. Ameisensäure) wurden als Gradient mit 0,25 mL/min gefahren.

Die Detektion der Metabolite erfolgte mit einem *Triple-Quad*-Massenspektrometer (Varian 1200L, Varian, Darmstadt) mit *Electrospray*-Ionisierung (ESI). Die 56 verschiedenen Metaboliten wurden im *single ion monitoring* (SIM) Modus vermessen.

### 5.3.3. ZYTOMETRISCHE METHODEN

#### 5.3.3.1. SORTIERUNG NACH SSC

Die Sortierungen werden mit einem FACS Vantage SE durchgeführt. Das Gerät ist mit einem MacroSORT Plus Element und einer 70 µm-Düse ausgestattet. Es werden die Programme *CellQuest* und *CloneCyt Plus* verwendet. Direkt vor dem Sortieren wird eine Justierung der Düse nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Dazu werden Fluoreszenz-gekoppelte (PI und FITC) und ungekoppelte

*beads* verwendet. Die Justierung des Abrisspunktes erfolgt über die *AccuDrop*-Methode. Die verwendeten Parameter sind Tabelle 6 zu entnehmen.

**TABELLE 6 - PARAMETER DER SSC-SORTIERUNG**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Piezoelement	~27 kHz
Modus	Counter
Druck Mantelflüssigkeit	11 psi
Druck Probe	0,6 psi
Amplitude ( <i>Drop Drive</i> )	~60
Sortierte Tropfen pro Signal	1

Zum Einstellen der Histogramme und der *gates*, welche im Rahmen der Sortierung verwendet werden, wird eine Probe von  $5 \times 10^5$  Zellen in PBS verwendet. Diesen werden 5  $\mu$ l PI (50 mg/ml) zugegeben. Für die Einstellungen werden Zellen der Probe verwendet, die für die Sortierung eingesetzt werden. Aggregate werden über *pulse processing* diskriminiert. Zelldebris wird über ein Histogramm FSC/SSC diskriminiert. Nicht-viable Zellen werden über die PI-Färbung ausgeschlossen. Die SSC-Selektion erfolgt über ein FSC/SSC-Histogramm. Die verwendeten Histogramme sind in (3.3.1) aufgeführt.

Vor der Sortierung wird der Probenschlauch des Gerätes mit sterilem PBS gespült (5 min). Für die Sortierung werden  $1 \times 10^7$  Zellen, die auf zwei Probenröhrchen in jeweils 3 ml aufgeteilt werden, verwendet. Die Zellen werden zuvor in sterilem PBS gewaschen und wieder in sterilem PBS aufgenommen. Es werden jeweils 30  $\mu$ l PI (50 mg/ml) zugegeben. Die selektierten Zellen werden in 500  $\mu$ l vorgewärmtem DMEM in 24-*well*-Platten abgelegt. Es werden zweimal jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen selektiert und sortiert.

### **5.3.3.2. SSC-MESSUNG**

Die Bestimmung des SSC der Hybridomzellen erfolgt am Zytometer Epics-XL-MCL unter Verwendung der Software SYSTEM 2. Die Zellen werden vor der Messung in PBS gewaschen und wieder in PBS aufgenommen. Für jede Messung werden  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Diesen werden 5  $\mu$ l PI (50 mg/ml) zugegeben. Zelldebris wird über ein Histogramm FSC/SSC diskriminiert. Nicht-viable Zellen werden über die PI-Färbung ausgeschlossen. Die SSC-Messung erfolgt über ein SSC Histogramm. Die Auswertung erfolgt mittels der WinMDI-Software.

## 5.3.4. PRÄPARATIVE METHODEN

### 5.3.4.1. METALLCHELAT-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

#### IMAC-IDA

Bei der IMAC-IDA wird Iminodiessigsäure auf der festen Phase der Säule verwendet. An diese wird ein Ion eines Übergangsmetalle gebunden. Es stellt mehrere seiner Koordinationsbindungen für Interaktionen mit der basischen Aminosäure Histidin zur Verfügung. So kann es für die Aufreinigung His-*getagter* Proteine genutzt werden. Die Elution erfolgt durch die Zugabe von Imidazol, welches ein Bestandteil von Histidin ist und somit die gebundenen Proteine verdrängt.

Für die IMAC werden IDA-75 Membranadsorber verwendet. Für die Aufreinigung wurde das automatische FPLC-System BioLogic DuoFlow von BioRad eingesetzt. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2 µm) und entgast. Der verwendete 10 ml-Probenschlauch wird auf Eis gekühlt und der Fraktionsammler auf 4 °C temperiert. Vor dem Versuch werden alle Schläuche mit 20 % Vol. Ethanol für 15 min gespült.

Die Be- und Entladung der Membran mit Kupfer-Ionen erfolgt an der FPLC-Anlage. Die Membran wird zunächst mit 10 ml Equilibrierungspuffer, dann mit 10 ml Kupfersulfat-Lösung und abschließend mit 10 ml Bindungspuffer gespült. Zum Entladen der Membran wird sie dreifach mit zunächst 10 ml 1 M Schwefelsäure und dann mit 10 ml Equilibrierungspuffer gespült. Alle Be- und Entladungsschritte werden bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Zu Lagerung des Membranadsorbers wird Equilibrierungspuffer (0,02 Gew.-% Natriumazid) verwendet.

Die aufkonzentrierten Proben werden 1:9 in Bindungspuffer verdünnt und der pH-Wert eingestellt. Die Equilibrierung erfolgt mit 20 ml Equilibrierungspuffer (1 ml/min).

TABELLE 7 - IMAC-IDA, FLUSSRATEN

Puffer	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Bindungspuffer	20	1
Probe	10	0,5
Bindungspuffer	10	1
Elutionspuffer (100 mM Imidazol)	10	1
Elutionspuffer (200 mM Imidazol)	10	1

Bei der Verwendung von weiteren Bindungspuffern oder Metallsalz-Lösungen wird nach demselben Protokoll vorgegangen.

#### Verwendete Puffer

Bindungspuffer A                      50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 7,6

Bindungspuffer B                      50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,5

Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
Equilibrierungspuffer	100 mM Natriumacetat, 500 mM NaCl, pH 4,5
Kupfersulfat-Lösung	0,1 M Kupfersulfat in Equilibrierungspuffer
Nickelsulfat-Lösung	0,1 M Nickelsulfat in Equilibrierungspuffer

#### IMAC-TED

Die IMAC-TED bietet eine Alternative zur IMAC-IDA durch die Verwendung von Tris(carboxymethyl)ethlendiamin als Ligandenpartner. Bei den verwendeten Protino Ni-TED-Schwerkraftsäulen ist Nickel als Metallion eingesetzt.

Die Säulen werden für jede Fraktion auf ein 15 ml-Falcon-*tubes* gesteckt und die Lösung per Hand hinzu pipettiert. Für die Beladung wurde 250 µl der aufkonzentrierten Probe mit 750 µl LEW-Puffer verdünnt. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2 µm) und entgast. Die Versuche werden auf Eis gekühlt durchgeführt.

Für eine Regeneration wird die Säule mit 15 ml LEW-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit VE-Wasser (15 ml) und 4 ml Ethanol (20 % Vol.). Die Lagerung erfolgt in Ethanol (20 % Vol.) bei 4 °C.

TABELLE 8 - IMAC-TED, VOLUMINA

Puffer	Volumen [ml]
Bindungspuffer	2
Probe	1
Bindungspuffer	2 × 2
Elutionspuffer	3 × 2

#### Verwendete Puffer

LEW-Puffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,0
Elutionspuffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 250 mM Imidazol, pH 8,0

#### 5.3.4.2. HA-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Für diesen Aufreinigungsschritt wird die *Anti-HA Affinity Matrix* der Firm Roche Applied Science eingesetzt. Die Durchführung folgt der Anweisungen des Herstellers. Die Matrix enthält einen Antikörper, welcher gegen das HA-Peptid spezifisch ist. Die Elution erfolgt durch die Verwendung des Peptides.

Die Säule wird an einem Stativ befestigt und die Fraktionen in 15 ml Falcon-*tubes* aufgefangen. Die Abdeckung der Säule wird durch eine Spritzennadel ersetzt (Größe 23 G (Gauge)). Die Tropfgeschwindigkeit wird somit auf 0,4 ml/min eingestellt. Aufgrund der geringen Menge an Zielprotein wird die Probe mehrmals aufgetragen. Der Durchlauf der Auftragung wird dazu direkt wieder auf die Säule gegeben. Vor der Zugabe des Elutionspuffers wird die Säule verschlossen und der Elutionspuffer für 15 min bei 37 °C auf der Säule inkubiert. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt. Nach der Elution wird die Säule regeneriert und equilibriert. Die Säule wird in 2 ml Lagerungspuffer bei 4 °C gelagert.

TABELLE 9 - ANTI-HA-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE, FLUSSRATEN

Puffer	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Equilibrierungspuffer	10	0,4
Probe	3 × 2	0,4
Waschpuffer	20	0,4
Elutionspuffer	3 × 1	-
Regenerationspuffer	20	0,4
Equilibrierungspuffer	20	0,4

#### Verwendete Puffer

Equilibrierungspuffer 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 7,5

Waschpuffer 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,05 %Vol. Tween 20, pH 7,5

Lagerungspuffer 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,09 Gew. % Natriumazid, pH 7,5

Regenerationspuffer 200 mM Glycin, pH 2,0

Elutionspuffer 20 mM TRIS, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,5 mg/ml HA-Peptid, pH 7,5

### 5.3.4.3. HEPARIN-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Heparine sind veresterte Glycosaminglykane, die aus der wechselnden Abfolge von Glucosamin und einer Uronsäure bestehen. Diese zeigen Affinität zu verschiedenen Zytokinen und können somit in der festen Phase für eine Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

Es wird eine 1 ml Heparin HP HiTrap-Säule von GE Healthcare verwendet. Für die Aufreinigung wurde das automatische FPLC-System BioLogic DuoFlow von BioRad verwendet. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2 µm) und entgast. Der verwendete 10 ml-Probenschlauch wird auf Eis gekühlt und der Fraktionssammler auf 4 °C temperiert. Vor dem Versuch werden alle Schläuche mit 20 % Vol. Ethanol für 15 min gespült.

Die aufkonzentrierten Proben werden 1:9 in Bindungspuffer verdünnt und der pH-Wert eingestellt.

Die Reageration erfolgt mit 20 % Vol. Ethanol (20 ml, 2 ml/min). Die Lagerung erfolgt bei 4 °C in 20 % Vol. Ethanol.

TABELLE 10 - HEPARIN-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE, FLUSSRATEN

Puffer	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Bindungspuffer	10	1
Probe	10	0,1
Bindungspuffer	10	1
Elutionspuffer (bis 2 M NaCl)	10 (linearer Gradient)	1

Verwendete Puffer

Bindungspuffer      10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0

Elutionspuffer      10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 M NaCl, pH 7,0

### 5.3.4.4. HYDROPHOBE-INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE

Bei der HIC wird die Hydrathülle der Proteine durch eine hohe Salzkonzentration entfernt. Somit sind hydrophobe Bereiche auf der Proteinoberfläche für die feste Phase zugänglich und können gebunden werden. Eine Elution wird durch eine Reduzierung der Salzkonzentration ausgelöst.

Für die Versuche wird der Sartobind Phenyl nano-Membranadsorber (3 ml) eingesetzt. Für die Aufreinigung wurde das automatische FPLC-System BioLogic DuoFlow von BioRad verwendet. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2 µm) und entgast. Der verwendete 10 ml-Probenschlauch wird auf Eis gekühlt und der Fraktionssammler auf 4 °C temperiert. Vor dem Versuch werden alle Schläuche mit 20 % Vol. Ethanol für 15 min gespült.

TABELLE 11 - HYDROPHOBE INTERAKTIONSCHROMATOGRAPHIE, FLUSSRATEN

Puffer	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Bindungspuffer	30	1
Probe	6	0,5
Bindungspuffer	30	1
Elutionspuffer (3 M NaCl)	30	1
Elutionspuffer (2 M NaCl)	30	1
Elutionspuffer (1 M NaCl)	30	1
Elutionspuffer (0,5 M NaCl)	30	1
Elutionspuffer (0,2 M NaCl)	30	1
Elutionspuffer (0,1 M NaCl)	30	1
Elutionspuffer (0 M NaCl)	30	1

Nach der Verwendung erfolgt eine Regeneration der Membran mit Regenerationslösung (30 ml, 1 ml/min). Die Lagerung erfolgt in 20 % Vol. Ethanol bei 4 °C.

Verwendete Lösungen

Bindungspuffer	4 M NaCl, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0
Elutionspuffer	0-3 M NaCl, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0
Regenerationslösung	30 % Vol. Isopropanol

#### 5.3.4.5. IONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE

Bei der Ionenaustauschchromatographie werden Proteine über ionische Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufgetrennt. Die Ladung der Proteine wird dabei durch den pH-Wert des Probenpuffers und des jeweiligen isoelektrischen Punktes des Proteins bestimmt. Die Elution erfolgt durch Verdrängung der gebundenen Proteine mittels einer hohen Salzkonzentration oder durch eine pH-Wert-Änderung.

Für die Aufreinigung wurde das automatische FPLC-System BioLogic DuoFlow von BioRad verwendet. Alle für die Durchführung verwendeten Puffer und Lösungen wurden gekühlt eingesetzt und zuvor filtriert (0,2 µm) und entgast. Der verwendete 10 ml-Probenschlauch wird auf Eis gekühlt und der Fraktionssammler auf 4 °C temperiert. Vor dem Versuch werden alle Schläuche mit 20 % Vol. Ethanol für 15 min gespült.

Es werden die *Sartobind Ion Exchange MA 75 Units* eingesetzt. Die Versuche wurden unter gleichen Bedingungen mit den Membranen Q (quaternäre Ammoniumverbindung) und S (Sulfonsäure) bei

den pH-Werten 5,6, 6,6 und 7,6 durchgeführt. Je nach verwendetem pH-Wert wird ein unterschiedliches Puffersystem verwendet.

TABELLE 12 - IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE, FLUSSRATEN

Puffer	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Bindungspuffer	20	1
Probe	10	0,5
Bindungspuffer	20	1
Elutionspuffer	15	1
Elutionspuffer (0,05 M NaCl)	15	1
Elutionspuffer (0,1 M NaCl)	15	1
Elutionspuffer (0,5 M NaCl)	15	1
Elutionspuffer (1 M NaCl)	15	1
Elutionspuffer (2 M NaCl)	15	1

Verwendete Lösungen

Bindungspuffer	10 mM HEPES, pH 7,6
	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,6
	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 5,6
Elutionspuffer	10 mM HEPES, 2 M NaCl, pH 7,6

#### 5.3.4.6. TCA-FÄLLUNG

Zu der zu fällenden Proteinlösung wird 10 % Vol. TCA (100 %) gegeben. Es folgt eine Inkubation für 30 min auf Eis. Das gefällte Protein wird abzentrifugiert (17.000 × g, 20 min). Das erhaltene Pellet wird in 20 µl SDS-PAGE- Probenpuffer resuspendiert.

#### 5.3.4.7. ULTRAFILTRATION

Für die Ultrafiltration werden die Proben (10-20 ml) in Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (3.000 Da) gegeben. Es folgt eine Zentrifugation (3 h, 4000 × g, 4 °C). Der Durchlauf wird verworfen.

#### 5.3.4.8. CROSS-FLOW-FILTRATION

Für die Cross-Flow-Filtration werden Vivaflow 50-Einheiten (3.000 Da) verwendet. Aus dem verwendeten Zellkulturüberstand wird zunächst mittels Zentrifugation (1.000 × g, 15 min) und anschließender Filtration (0,2 µm) Zelldebris entfernt. Für die Cross-Flow-Filtration werden 200-500 ml eingesetzt. Alle Filtrationen werden auf Eis gekühlt durchgeführt. Die Reinigung der Filtrationseinheiten erfolgt nach Angaben des Herstellers.

#### 5.3.4.9. ZELLAUFSCHLUSS

Die Zellsuspension wird mittels Zentrifugation (400 × g, 3 min) vom Medium getrennt. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation im gewünschten Puffer resuspendiert. Zu diesem wird zuvor 0,1 %Vol. Triton X zugegeben. Die Sonifizierung wird unter Eiskühlung für zehnmal 30 s mit je 30 s Pause mit den folgenden Einstellungen durchgeführt: *Cycle*: 0,5, Amplitude: 100 %. Das Lysat wird für 15 min bei 4000 × g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und filtriert (0,2µm). Das Pellet wird verworfen.

### 5.3.5. ONLINE-TOOLS

#### 5.3.5.1. BESTIMMUNG DES PI

Für die Bestimmung des *pi* wird das Online-tool *Compute pi/MW* verwendet. [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/) (am 02.02.2011) unter der Verwendung der Aminosäuresequenz GLECDGKVNICCKKQFFVSFKDIGWNDWIIAPSGYHANYCEGECPSHIAGTSGSSLSFHS TVINHRYMRGHSPFANLKSCCVPTKLRPMSMLYYDDGQNIKKDIQNMIVEECGCSYPYDVPDYAHHHHHH.

## 5.4. DATENAUSWERTUNG

### 5.4.1. SC-71-KULTIVIERUNGEN

Die Daten der Kultivierungen der Zelllinien SSC0, SSCI und SSCII werden mit Hilfe des Programms EXCEL 2007 auf Zeitabschnitte von 12 h normiert. Dazu werden Polynome des dritten bis sechsten Grades verwendet, welche das Programm als polynomische Trendlinie vorgibt. Sich aus der Normierung ergebene Datenpunkte werden auf Null gesetzt.

SSC0

TABELLE 13 - DATENSÄTZE DER KULTIVIERUNG DER ZELLINIE SSC0

Zeit [h]	Lebend-Zellzahl [zellen/ml]	Vitalität [%]	Glucose [g/l]	Lactat [g/l]	Glutamin [mg/l]	Glutamat [mg/l]	Produkt- konzentration [ng/ml]
0	345000	100	4135	133	6009	104	924
19	1150000	99	3564	1372	3865	153	472
26	1350000	98	2384	1688	3138	217	918
43	3160000	99	837	2248	1277	144	1993
50	2812500	99	568	2044	559	66	510
67	2000000	86	568	1980	39	107	357
72	1925000	89	531	1798	23	101	482
101	480000	24	520	1738	17	174	386
117	65000	3	549	1892			703

Verwendete Polynome

Zellzahl:

$$y = -0,000140597828470534x^6 + 0,0421070892074908x^5 - 4,10348175887339x^4 + 120,708645645063x^3 + 969,730833157896x^2 - 4067,5205427408x + 353763,761757486$$

Viabilität:

$$y = -0,0000563899896591294x^3 - 0,00315341024167015x^2 + 0,288574793574881x + 97,3943847142659$$

Glucose:

$$y = -0,00022020571515846x^4 + 0,0501450898823723x^3 - 2,96903691826889x^2 - 18,8296698368753x + 4238,55629742228$$

Lactat:

$$y = 0,00669426724370755x^3 - 1,47831092358055x^2 + 96,7443907653183x + 103,029494486045$$

Glutamin:

$$y = -0,000279346288903246x^4 + 0,058025862640372x^3 - 2,87661734013199x^2 - 72,729513427327x + 5995,6629047472$$

Glutamat:

$$y = -0,0000260211199649153x^4 + 0,00637129271432925x^3 - 0,487956659334225x^2 + 11,8365009224391x + 99,9267237705319$$

Spezifische Produktionsgeschwindigkeit:

$$y = -1,7537358667664E - 08x^4 + 0,0000030904730568054x^3 - 0,000191621648679197x^2 + 0,00504457481393672x - 0,0414266097942857$$

SSCI

TABELLE 14 - DATENSÄTZE DER KULTIVIERUNG DER ZELLINIE SSCI

Zeit [h]	Lebend-Zellzahl [zellen/ml]	Vitalität [%]	Glucose [g/l]	Lactat [g/l]	Glutamin [mg/l]	Glutamat [mg/l]	Produktkonzentration [ng/ml]
0	480000	99	4063	125	6043	69	926
17	962500	99	3042	1066	3850	99	486
25	1515000	100	2167	1376	3710	136	952
42	2795000	99	1202	1852	1762	115	2074
50	3967500	99	784	1944	1031	91	524
69	2360000	83	541	1938	129	90	360
78	1590000	62	536	1908	60	118	486
95	615000	31	485	1808	18	140	397
113	140000	7	515	1840	18	151	729

Verwendete Polynome

Zellzahl:

$$y = -0,000485587133544962x^6 + 0,159378675521111x^5 - 18,9973445686992x^4 \\ + 983,38778486615x^3 - 21000,4285656362x^2 + 185429,591225743x \\ + 477113,272293434$$

Viabilität:

$$y = 0,0000162045160870001x^3 - 0,0149843618564305x^2 + 0,673497513599415x \\ + 95,9272462604755$$

Glucose:

$$y = -0,00164582482432322x^3 + 0,776315842790659x^2 - 98,8178479214092x \\ + 4199,15638926536$$

Lactat:

$$y = 0,00363692984940272x^3 - 0,924132000946807x^2 + 73,2522724890775x \\ + 98,058904357224$$

Glutamin:

$$y = -0,000107994265750138x^4 + 0,0249079093848096x^3 - 1,08914342823306x^2 \\ - 91,9083823416547x + 5993,18915799692$$

Glutamat:

$$y = -1,86557042136353E - 07x^5 + 0,000041583956013554x^4 - 0,00238654511791134x^3 \\ - 0,0157959978900176x^2 + 3,41698163205948x + 67,2145066838576$$

Spezifische Produktionsgeschwindigkeit:

$$y = -5,66335172563909E - 09x^4 + 0,000000747102145872x^3 \\ - 0,0000303244567692804x^2 + 0,000458207373858543x \\ + 0,00397586923695353$$

TABELLE 15 - DATENSÄTZE DER KULTIVIERUNG DER ZELLINIE SSCII

Zeit [h]	Lebend-Zellzahl [zellen/ml]	Vitalität [%]	Glucose [g/l]	Lactat [g/l]	Glutamin [mg/l]	Glutamat [mg/l]	Produkt- konzentration [ng/ml]
0	372500	100	4116	162	6000	25	493
19	912500	100	2935	1162	3690	142	1016
27	1330000	100	2213	1590	3539	199	1731
43	2675000	99	864	1934	1622	183	3960
52	2710000	99	490	2010	517	103	1141
67	3245000	90	463	1886	96	36	869
71	3080000	80	432	1752	41	54	1184
97	1390000	50	418	1662	20	89	1298
119	850000	30	382	1516	20	140	1638
143	290000	7	391	1544	16	185	

Verwendete Polynome

Zellzahl:

$$y = -0,0000581834058839548x^6 + 0,0222484569299439x^5 - 2,93834494843577x^4 + 149,163440657663x^3 - 2226,22187626734x^2 + 35026,7124584317x + 370843,788424969$$

Viabilität:

$$y = 0,0000469185588533264x^3 - 0,0157162909337282x^2 + 0,645762978808101x + 96,8046026131117$$

Glucose:

$$y = 4,47173979958209E - 06x^5 - 0,00146112576622392x^4 + 0,166532183980222x^3 - 7,13148488093216x^2 + 24,5159180673881x + 4109,29511151533$$

Lactat:

$$y = 0,00413649036080298x^3 - 1,04981373845888x^2 + 78,047791935274x + 136,610482362548$$

Glutamin:

$$y = -1,89329203806881E - 06x^5 + 0,000411977180368594x^4 - 0,0226911665879304x^3 + 0,565599981617368x^2 - 110,561846779231x + 5967,25646377596$$

Glutamat:

$$y = -6,1305075726191E - 07x^5 + 0,000166075595965512x^4 - 0,0138419688773643x^3 + 0,292032411577858x^2 + 5,31276388357899x + 23,6918324145355$$

Spezifische Produktionsgeschwindigkeit:

$$y = 3,30616664500983E - 09x^4 - 4,61593379186493E - 07x^3 + 0,000017794708912458x^2 - 0,000082618764873643x + 0,00490129295427313$$

#### 5.4.2. BERECHNUNG DER SPEZIFISCHEN PRODUKTIVITÄT

Die Bestimmung erfolgte nach der Erfassung der Produktkonzentrationen nach (Brezinsky 2003) unter Verwendung der Formel:

$$SR = \frac{\text{Gesamtprotein} \left[ \frac{mg}{ml} \right]}{\int \frac{\text{Lebend - Zellzahl} \left[ \frac{Zellen}{ml} \right]}{\text{Zeit [h]}}}$$

### 5.5. MESSDATEN

#### 5.5.1. METABOLOMANALYSE

TABELLE 16 - DATENSATZ DER METABOLOMANALYSE

Metabolit	SSC0 [24 h]	SSCI [24 h]	SSCII [24 h]	SSC0 [96 h]	SSCI [96 h]	SSCII [96 h]
	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]	[µM]
<b>Urea</b>	3,79	1,50	2,85	1,52	2,13	2,51
<b>Pyruvat</b>	0,13	0,05	0,06	0,01	0,01	0,02
<b>Malonat</b>	6,63	6,83	7,40	6,83	7,03	7,04
<b>Uracil</b>	4,70	3,92	3,63	9,59	3,64	4,57
<b>Fumarat</b>	24,29	17,39	30,13	13,33	12,38	17,03
<b>Succinat</b>	2,35	1,95	2,47	2,61	2,90	4,31

<b>Oxalacetat</b>	117,60	116,28	112,09	124,68	119,92	128,37
<b>Malat</b>	61,72	43,15	102,68	18,49	11,00	51,42
<b>alpha-Ketoglutarat</b>	9,89	8,54	10,46	4,20	3,16	4,25
<b>PEP</b>	0,18	0,43	0,35	0,39	0,40	0,36
<b>DHAP/G3P</b>	4,95	3,74	1,13	2,35	2,94	1,31
<b>cis-Aconitat</b>	1,07	0,80	0,63	0,70	0,65	0,55
<b>Citrulline</b>	5,52	4,66	4,38	5,88	5,28	5,31
<b>Glucose</b>	69,20	17,48	14,03	100,28	111,87	133,12
<b>2-PG/3-PG</b>	34,04	20,27	18,00	29,46	24,08	25,45
<b>Erythrose-4-Phosphat</b>	7,16	5,33	6,07	1,11	0,82	1,06
<b>Pentosephosphate</b>	4,36	5,82	4,80	3,33	2,97	3,09
<b>Glucose-6-Phosphat</b>	11,51	8,55	10,00	11,83	8,81	13,06
<b>Adenosin</b>	31,49	65,32	38,12	61,95	54,73	32,79
<b>6-Phosphofluconat</b>	10,95	20,84	10,21	19,76	16,15	10,25
<b>Glutathion (red.)</b>	21,14	25,65	30,52	20,73	18,95	16,34
<b>IMP</b>	3,21	3,54	6,87	4,15	2,76	4,63
<b>CMP</b>	4,66	4,93	9,37	7,05	6,43	9,29
<b>UMP</b>	9,76	15,99	14,81	12,89	11,47	10,11
<b>cAMP</b>	40,69	40,78	36,31	38,75	43,37	39,64
<b>Fructose-1,6-bisphosphat</b>	24,74	19,19	14,98	19,84	22,13	17,12
<b>AMP</b>	22,70	24,41	49,54	30,16	20,55	31,88
<b>GMP</b>	3,37	6,14	11,15	7,15	5,48	9,28
<b>PRPP</b>	42,31	49,32	43,46	51,59	48,82	56,51
<b>CDP</b>	6,34	5,38	9,13	8,80	8,12	12,92
<b>UDP</b>	16,94	14,90	24,92	21,56	17,18	24,34

<b>ADP</b>	20,20	16,46	23,72	15,12	14,57	24,21
<b>GDP</b>	6,21	3,66	8,46	7,50	5,93	10,28
<b>CTP</b>	23,57	19,91	29,08	23,28	23,79	28,75
<b>UTP</b>	21,08	17,21	19,96	17,66	18,41	21,84
<b>ATP</b>	27,08	22,55	21,56	17,54	23,20	26,53
<b>GTP</b>	3,14	2,70	2,88	2,31	2,96	3,65
<b>UDP-Glucose</b>	2,07	2,14	4,02	3,99	4,68	7,95
<b>GDP-Mannose</b>	1,00	1,02	79,32	1,12	0,81	1,26
<b>UDP-GlcNAc</b>	82,81	95,96	158,28	99,51	83,98	147,60
<b>Gluthation (ox.)</b>	30,61	28,79	38,52	55,86	38,73	65,35
<b>NAD+</b>	1,15	1,50	2,31	1,57	1,22	1,53
<b>NADH</b>	0,42	0,11	0,27	0,48	0,56	0,71
<b>CoA</b>	0,14	0,12	0,10	0,11	0,11	0,12
<b>FAD</b>	0,20	0,41	0,59	0,29	-	0,33
<b>Acetyl-CoA</b>	5,57	7,74	9,58	5,74	3,41	6,17
<b>Succinyl-CoA</b>	0,16	0,27	0,32	0,39	0,42	0,59

## DANKSAGUNGEN

---

Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit im Institut für Technische Chemie. Sowie für die Betreuung dieser Arbeit und die freundliche Unterstützung.

PD Dr. Ursula Rinas danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo danke ich für die kurzzeitige Übernahme der Position des Drittprüfers.

Den sorgfältigen Korrekturlesern Kathrin, Claas und Mike danke ich für ihre Mühen, die angewendete Zeit und die Kritik.

Dem gesamten Arbeitskreis und allen Mitarbeitern des Institutes für Technische Chemie danke ich für die schöne Zeit, die freundliche Unterstützung und die coolen Partys. Eine derart angenehme Arbeitsatmosphäre wird nur schwer wieder zu finden sein.

Dem Kaffeeclub danke ich für die vielen kreativen Ideen in Bezug auf die wirklich wichtigen Ziele.

Andreas danke ich für seine Geduld und Gelassenheit, die seit über 20 Jahren ein Pol der Ruhe für mich sind.

Meiner Mutter und meinen Geschwistern danke ich für ihre Liebe und ihre Unterstützung.

Kathrin danke ich für ihre liebevolle Unterstützung, ihre vielen Ideen und dafür, dass sie immer für mich da ist, wenn ich sie brauche.

## LEBENS LAUF

---

Daniel Landgrebe

Geboren am 5. Oktober 1980 in Sottrum

### AKADEMISCHE LAUFBAHN

#### **ab 1/2012: Universität Potsdam**

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biochemie und Biologie, Arbeitsgruppe Antikörper-Technologien

#### **9/2008 - 9/2011: Leibniz Universität Hannover**

Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) im Institut für Technische Chemie, Arbeitsgruppe Biotechnologie

Thema: Identifikation von hochproduzierenden Säugetierzellen und die Aufreinigung ihrer Produkte

#### **4/2003 - 7/2008: Leibniz Universität Hannover**

Studiengang Biologie, Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfächer: Biochemie und Immunologie

Diplomabschluss, Thema: Untersuchungen zum Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie und der Durchflusszytometrie in der Zellkultur

#### **10/2001 - 4/2003: Leibniz Universität Hannover**

Studiengang Chemie

### SCHULLAUFBAHN

#### **8/1991 - 8/2000: Integrierte Gesamtschule Hannover-Linden**

Abschluss Abitur

#### **8/1997 – 8/1991: Grundschule Albert Schweitzer Hannover**

