

**Einsatz unterschiedlicher Prozeßführungsmodi zur Charakterisierung  
und Beurteilung des Stoffwechsels rekombinanter CHO-Zellen**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung der Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**  
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Chem. Holger Lübben  
geboren am 24.10.1967 in Aurich

1997

Referent: PD. Dr. Gerlinde Kretzmer  
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl  
Tag der Promotion: 18.11.1997

---

## **Abstract**

**Lübben, Holger**

### **Einsatz unterschiedlicher Prozeßführungsmodi zur Charakterisierung und Beurteilung des Stoffwechsels rekombinanter CHO-Zellen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Prozeßführungssysteme eingesetzt um Unterschiede und Besonderheiten im Stoffwechsel rekombinanter CHO-Zellen herauszuarbeiten.

Dazu wurde mittels Metabolic-Flux-Analysis eine Flußverteilung der Hauptabbau- und Syntheseschritte während der exponentiellen Wachstumsphase im Batch-Experiment als Grundzustand festgelegt. Die Berechnung der Flüsse erfolgte quantitativ und deren Richtigkeit wurde mittels NMR-Analyse validiert.

Zur Überprüfung des tatsächlichen Nährstoffbedarfs der beiden Primärsubstrate Glukose und Glutamin wurden kontinuierliche Chemostatexperimente mit sukzessiver Reduzierung der Einlaufkonzentration der Substrate unternommen. Dabei zeigte sich, daß insbesondere der Bedarf an Glukose drastisch gesenkt werden kann, wohingegen die Verfügbarkeit von Glutamin wichtiger scheint. Die Reduzierung bewirkte eine drastische Änderung im gesamten Aminosäurestoffwechsel. Die Glukosepulzugabe während einer chemostatischen Prozeßführung beeinflusste die Aufnahme der anaplerotischen Aminosäuren des Citratcyclus in negativer Weise, wohingegen umgekehrt ein Glutaminpuls wenig Änderungen im Stoffwechsel hervorrief. Die hier auftretenden Aspekte waren sehr aufschlußreich bei der Transferrierung des Wissens auf das Fed-Batch-System.

Der Fed-Batch-Modus wurde aufgrund des Raum-Zeit-Ausbeute Kriteriums als effizientes System für die Optimierung eines Produktionsprozesses gewählt. Dabei zeigte sich wie schon während der kontinuierlichen Experimente, daß die Etablierung einer Glukosezufütterung keine entscheidende Optimierung für den Prozeß bedeutet, und sich durch eine simultane Zufütterung von Glutamin noch negativer auf das Zellwachstum auswirkt.

Dahingegen induzierte die kontinuierliche Zufütterung eines Asparagin/Glutamin-Mix nach der vollständigen Glukoseverstoffwechslung eine bislang selten beobachtete Remobilisierung des Metaboliten Laktat, die dem klassischen Diauxieverhalten anderer Mikroorganismen entspricht. Durch on-line-Detektion der Komponente Glutamin über ein Fließinjektionssystem und der so ermöglichten kontrollierten Zufütterung, gelang es die Dauer der exponentiellen Phase deutlich auszudehnen, was sich durch Maximierung von Zellzahl und Produkt bemerkbar machte.

## Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1994 bis Oktober 1997 im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Fr. PD. Dr. Gerlinde Kretzmer angefertigt, der ich an dieser Stelle für die mir gebotenen Arbeitsbedingungen und der fachliche Betreuung danken möchte. Insbesondere vielen Dank für die Ermöglichung diverser Auslandsaufenthalte, die viel zur fachlichen Qualität dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Francesc Godia, Universität Autonoma de Barcelona (UAB), danke ich für die Austauschmöglichkeiten wissenschaftlicher und kultureller Art, sowie für wertvolle neue Erkenntnisse in der Zellkulturtechnik und der netten persönlichen Unterstützung während der gesamten Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Chem. Jörg Hagedorn und Herrn Dipl.-Chem. Marco Rieseberg für die Unterstützung und Ausführung der on-line Analytik, sowie der kameradschaftlichen Zusammenarbeit. Vielen Dank für die lustigen Runden während unserer nächtlichen Fermentationseinheiten im TCI und an anderen Orten.

Herrn MSc Carles Paredes und Herrn Dr. Jordi Cairo (UAB) danke ich für die Hilfestellungen und Einführung in die metabolische Flußanalyse, sowie für die intensive Diskussionsbereitschaft betreffend allen Fragen biochemischer Natur, sowie allen am UAB (Toni, Xavier, Pau, Albert, Nuria) für die freundliche Aufnahme in der „Secta“.

Herrn Dipl.-Chem. Marcus Hesse, Herrn Dipl.-Chem. Oliver Christel und Herrn Dipl.-Chem. Torsten Buch danke ich für die wertvollen Anregungen und der Diskussionsbereitschaft sowie der konstruktiven Zusammenarbeit während all der Jahre.

Herrn Dr. Ralf Weidemann danke ich für seine hilfreichen Ratschläge während der Neugruppierung des TZL. Dir Ralf, habe ich es zu verdanken, daß ich trotz herber Rückschläge die Lust am „Tierzählen“ nicht verloren habe.

Herrn Dipl.-Chem. Georg Renemann gebührt Dank für seine nette und selbstlose Unterstützung während der Fermentationszeit und allen beantworteten Fragen im Bereich des Sports. Vielleicht konnte auch ich Dir helfen, die hektische Zeit einer halbjährlichen Diplomarbeit etwas gelassener zu sehen.

---

In meiner Dissertationszeit fielen die Diplomarbeiten von Maren Hüners, Georg Renemann, Werner Ramm und Marco Rieseberg, sowie die Schwerpunktarbeiten von Georg Renemann, Jan Werner und Daniela Böhl. Alle Arbeiten haben zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Daher meinen Dank für die nette Unterstützung und viel Erfolg für Eure Zukunft.

Herrn PD Dr. Bernd Hitzmann und seinem Arbeitskreis für die ständige Bereitschaft CAFCA auch für meine Zellkulturanwendungen, insbesondere für Monitoring und Control weiterzuentwickeln. Besonderen Dank an Dich Bernd, so habe ich mir das interdisziplinäre Arbeiten immer vorgestellt.

Herrn PD Dr. Müller danke ich für die Diskussionsbereitschaft und das Einordnen meiner Ergebnisse in die biochemische Fachliteratur.

Herrn Dr. Edgar Hofer (OCI) und seinen Mitarbeitern danke ich für die Durchführung der NMR spektroskopischen Messungen.

Fr. Martina Weiß für die äußerst zuverlässige Durchführung der Aminosäuremessung und der Hilfestellungen bei Software Problemen aller Art. Danke für Deine Geduld bei meinen Posterproblemen, Martina.

Herrn Wilhelm Behnsen und seinen Mitarbeitern der Mechanik Werkstatt für die Realisierung und Durchführung diverser außergewöhnlicher Arbeiten bezüglich des Fermentations- und FIA-Zubehör und besonders Herrn Burkhard Probst für seine Hilfe bei elektronischen Problemen aller Art.

Allen weiteren Mitarbeitern der Biotechnologiegruppe danke ich für die schöne Zeit am TCI. Durch den Eindruck einer „großen Familie“ haben alle viel zur mentalen Stärke beigetragen und gezeigt, daß man nie mit seinen Problemen alleine ist.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich für die finanzielle Unterstützung im Austauschprojekt „Acciones Integradas“ und der European Society of Animal Cell Technology (ESACT) für die Teilnahme am 14. und 15. ECACT Meeting.

Fr. Dipl.-Finw. Heike Schicker danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Korrekturarbeit und Formulierungshilfe.

Dir, Heike und meiner gesamten Familie gebührt der höchste Respekt von allen, habt Ihr doch am meisten Entbehrungen während der gesamten Zeit auf Euch nehmen müssen. Ohne Eure Anteilnahme und finanzielle Unterstützung (speziell aber Deinem moralischen Beistand, Heike), hätte ich diese Sache nie in dieser Konsequenz durchführen können.

Holger Lübben, Oktober 1997

## Inhalt

<b>1.EINFÜHRUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. THEORETISCHER TEIL .....</b>	<b>5</b>
2.1 DAS PRODUKT ANTITHROMBIN III.....	5
2.2 ZELLULÄRE TRANSPORTSYSTEME.....	6
2.2.1 MALAT-ASPARTAT-TRANSPORTSYSTEM.....	7
2.3 WEITERE TRANSPORTSYSTEME .....	10
2.3.1 AMINOSÄURE- UND PEPTIDTRANSPORT.....	11
2.4 METABOLIC-ENGINEERING.....	12
2.5 PRODUKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZELLZYKLUS.....	13
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
3.1 DIE CHO-ZELLINIE.....	16
3.2 MEDIUM.....	16
3.3 KULTIVIERUNGSSYSTEME .....	16
3.4 OFF-LINE-ANALYTIK.....	17
3.4.1 ORGANISCHE SÄUREN .....	18
3.5 ON-LINE-ANALYTIK .....	19
3.6 BERECHNUNG VON METABOLISCHEN FLÜSSEN DER CHO SS0/A2 ZELLINIE UNTER ANWENDUNG STÖCHIOMETRISCHER STOFFBILANZEN .....	22
3.7 NMR SPEKTROSKOPISCHE METHODEN .....	26
3.8 WACHSTUMSKINETIK .....	27
3.9 SPEZIFISCHE VERBRAUCHS- UND BILDUNGSRATEN.....	28
3.10 DER PROZEßMODUS DER KONTINUIERLICHEN KULTIVIERUNG OHNE ZELLRÜCKHALTUNG (CHEMOSTAT).....	29
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>32</b>
4.1 BERECHNUNG VON METABOLISCHEN FLÜSSEN EINER CHO-ZELLINIE UNTER ZU HILFENAHEME VON STOFFBILANZEN.....	32
4.1.1 METHODISCHES VORGEHEN .....	33
4.1.1.1 Bestimmung des für die Berechnung relevanten Wachstumsintervalls.....	33
4.1.1.2 Berechnung der Wachstumsrate, sowie der spezifischen Verbrauchs- bzw. Bildungsraten der extrazellulär gemessenen Komponenten. ....	36
4.1.1.2.1 Wachstumsrate.....	36
4.1.1.2.2 Berechnung der spezifischen Raten .....	36
4.2 MASSENBILANZEN .....	37
4.3 ERSTELLUNG DES REAKTIONSNETZWERKES.....	39
4.4 STOFFWECHSELLAGE UND INTERPRETATION .....	39
4.4.1 KATABOLER UND ANABOLER STOFFWECHSEL.....	40
4.4.2 LIPIDSYNTHESE .....	43
4.4.3 DNA SYNTHESE.....	43
4.4.4 RNA SYNTHESE.....	43

4.4.5	PROTEINBIOSYNTHESE.....	43
4.4.6	TRANSPORTSYSTEME.....	44
4.5	VALIDIERUNG MITTELS <sup>13</sup> C MARKIERTER GLUKOSE.....	45
4.5.1	SCHLUßFOLGERUNGEN.....	49
4.6	CHEMOSTATISCHE PROZEßFÜHRUNG .....	50
4.6.1	Kontinuierliche Prozeßführung mit Pulszugabe von Glutamin und Glukose.....	50
4.6.1.1	Bestimmung der Zellzahlen .....	51
4.6.1.2	Bestimmung der Glukoseverbrauchs-und Laktatproduktionsraten.....	52
4.6.1.3	Beeinflussung des Aminosäurestoffwechsels .....	53
4.6.2	KONTINUIERLICHE PROZEßFÜHRUNG ZUR BEURTEILUNG DER TATSÄCHLICH BENÖTIGTEN SUBSTRATMENGE .....	55
4.6.2.1	Glukosereduzierung .....	56
4.6.2.1.1	Verlauf der Biomasse bei Variation der Glukosezulaufkonzentration.....	56
4.6.2.1.2	Ausbeutekoeffizienten Biomasse/Glukose und Biomasse/Glutamin.....	58
4.6.2.1.2a	Ausbeutekoeffizient Biomasse/Glukose ( $\theta_{X/Glc}$ ) .....	58
4.6.2.1.2b	Ausbeutekoeffizient Biomasse/Glutamin.....	59
4.6.2.1.3	Glukoseverstoffwechselung und Laktatproduktion.....	61
4.6.2.1.4	Aminosäureverläufe.....	64
4.6.2.2	Glutaminreduzierung .....	67
4.6.2.2.1	Zellkonzentration und Ausbeutekoeffizienten Biomasse/Glutamin ( $\theta_{X/Gln}$ ), sowie Biomasse/Glukose( $\theta_{X/Glc}$ ).....	67
4.6.2.2.2	Glukose- und Laktatstoffwechsel.....	70
4.6.2.2.3	Aminosäureverstoffwechselung unter glutaminreduzierten Bedingungen.....	71
4.7	OPTIMIERUNG VON WACHSTUMS- UND PRODUKTIONSEIGENSCHAFTEN DURCH FED BATCH KULTIVIERUNGEN. ....	73
4.7.1	FERMENTATION MIT PULSWEISER GLUKOSEFÜTTERUNG (FGLUC).....	73
4.7.1.1	Wachstumskurve.....	74
4.7.1.2	Stoffwechsel.....	75
4.7.1.3	Produktivität.....	80
4.7.1.4	Zusammenfassung.....	81
4.7.2	FÜTTERUNG VON GLUKOSE UND GLUTAMIN (FGLN).....	81
4.7.2.1	Zellwachstum und Vitalität.....	82
4.7.2.2	Produktion.....	88
4.7.3	Induktion eines Diauxieverhalten durch spezielle Fütterungstechniken (FnGln) ...	89
4.7.3.1	Zellwachstum und Stoffwechsel .....	90
4.7.3.2	Makroskopische Äußerung der zellinternen Vorgänge.....	95
4.7.3.3	Produktion.....	96
4.7.3.4	Zusammenfassung.....	97
4.7.4	OPTIMIERUNG DURCH KONTINUIERLICHE ZUFÜTTERUNG VON GLUTAMIN/ASPARAGIN .	98
4.7.4.1	Glutaminkonzentrationsprofil .....	98
4.7.4.2	Primärstoffwechsel und Biomasse .....	99
4.7.4.3	Gesamt-Aminosäurestoffwechsel .....	101
4.7.4.4	Alaninstoffwechsel .....	103
4.7.4.5	Limitierung des Wachstum durch aromatische Aminosäuren .....	104
4.7.5	EINFLUß DER GLUKOSEINGANGSKONZENTRATION (FREDGLC).....	105
4.7.5.1	Wachstumskurve.....	106
4.7.5.2	Glukose und Laktatmetabolismus.....	107
4.7.5.3	Aminosäurestoffwechsel.....	112
4.7.5.4	Organische Säuren .....	115
4.7.5.5	Produktexprimierung .....	116
4.7.5.6	Zusammenfassung.....	117

---

4.7.6 ZUFÜTTERUNG WEITERER ESSENTIELLER AMINOSÄUREN ( <i>FAROMAS</i> ) .....	117
4.7.6.1 Zellwachstum .....	118
4.7.6.2 Primärstoffwechselverhalten .....	119
4.7.6.3 Aminosäurestoffwechsel .....	122
4.7.6.4 Konzentrationsverläufe der gefütterten essentiellen Aminosäuren .....	124
4.7.6.5 Produktion .....	125
4.7.6.6 Zusammenfassung .....	127
4.8 VERGLEICH DER PROZEßPARAMETER .....	128
4.8.1 ZUSAMMENFASSUNG .....	132
4.9 WACHSTUM UND STOFFWECHSEL WÄHREND DER KULTIVIERUNG MIT GLUTAMAT ALS GLUTAMINERSATZ .....	135
4.9.1 SCHLUßFOLGERUNGEN .....	138
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>139</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>144</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>152</b>
7.1 SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN .....	152
7.2 REAKTIONEN DES STÖCHIOMETRISCHEN NETZWERK .....	153
7.3 PHOTOGRAPHIEN .....	156



## 1. Einführung und Zielsetzung

Bereits seit Beginn der 60er Jahre sind Impfstoffe und Antikörper mit tierischen Zellen „in vitro“ herstellbar. Durch die Einführung der rekombinanten DNA-Technologie 1982 wurde die Produktion rekombinanter Proteine mit Zellkulturen ermöglicht. Seitdem entwickelte sich die Zellkulturtechnik mehr und mehr zur Schlüsseltechnologie vor allem für Produktion hochwertiger therapeutischer Pharmazeutika. Heutzutage werden diverse humane Proteine wie Faktor VIII, Faktor VII, AT-III, t-PA, monoklonale Antikörper, Erythropoetin, Interferon- $\gamma$ , Interferon-2 über die Massenkultivierung tierischer Zellen hergestellt<sup>[1][2]</sup>.

Obwohl mittlerweile eine Vielzahl kleinerer Proteine (Insulin, Wachstumsfaktoren) über die Expressionssysteme diverser Hefen und Bakterienkulturen herstellbar sind<sup>[3]</sup>, ist die Produktion des Großteil der komplexeren Proteine nur mittels der hoch spezialisierten Syntheseapparate (Golgi Apparat, ER) tierischer Zellen möglich. Die Enzyme dieser Kompartimente führen Syntheseschritte durch, die primär nicht die Aminosäuresequenz oder nur die Faltung des Proteins betreffen, sondern auf posttranslationale Modifikationen abzielen. Die Vielzahl der komplexeren Produkte sind sogenannte Glykoproteine, deren Gewicht z.T. bis zu 50 % auf die Kohlenhydratseitenketten zurückzuführen ist, über die die biologische Aktivität des Therapeutikums streng definiert ist. So bewirkt die N-Glykosylierung an bestimmten Asparagin-Stellen im Protein einerseits eine bessere Löslichkeit des nativen Proteins (vorwiegend im wässrigen Milieu), andererseits wird durch die Glykosylierung eine sterische Konformation erzeugt, die das aktive Zentrum je nach Anzahl der Seitenketten stimulieren oder inaktivieren kann. Bei Proteinen, deren Glykosylierung die biologischen Aktivität determiniert, ist in einem Zulassungsverfahren die Übereinstimmung der Glykosylierung mit dem humanen Protein das Kriterium für die Qualitätssicherung. Die Bemühung, die Produktheterogenität zu minimieren scheint von oberster Priorität. So weisen viele humane Glykoproteine biantenäre Strukturen auf, dahingegen werden bei der Produktion über Zellkulturen häufig komplexere tri-, und tetraantenäre Strukturelemente nachgewiesen, die je nach Kultivierungsbedingungen und Zelltyp variieren<sup>[4][5]</sup>.

In neuerer Zeit erweitert sich das Anwendungsspektrum tierischer Zellen durch effizientere Immortalisierungs- und Transformierungstechniken diverser primärer Zelllinien (Hepatozyten, Kardiomyozyten, Keratinozyten, Endothelzellen etc.) für klinische Zwecke (Kolokoltsowa et al., Bader et al., Al-Rubeai et al.)<sup>[5]</sup>. Neben der bislang vorwiegenden Kultivierung zur

Produktion rekombinanter Proteine werden unterschiedliche Zelltypen wegen ihrer vielfältigen Biotransformationsmöglichkeiten für „in vitro“ toxikologische Untersuchungen neuer Medikamente oder deren Transformationsmetabolite (insbesondere Hepatozyten) verwendet. Weiterhin sind primäre Zellkulturtestsysteme für die Erforschung der Ersatzmöglichkeiten humaner durch „bioartifizierender“ Organe sehr nützlich (Pörtner et al., Hinton et al.)<sup>[5]</sup>. So werden bei Erkrankungen in der Hematopoese (Meißner et al., Möbest et al.)<sup>[5]</sup> dem Patienten Knochenmarkstammzellen entnommen, und „in vitro“ vermehrt, um sie dem Patienten dann in größerer Menge zurückzugeben, wo sie „in vivo“ ihre Aufgabe als differenzierende Zelle wieder wahr nehmen. Studien bezüglich der Differenzierungskontrolle von Stammzellen werden zurzeit simuliert. Auch auf dem Gebiet der Hauttransplantation, der Organverpflanzung (Leber, Niere, Pankreas) werden adäquate Zelltypen für „in vitro“ Studien benötigt<sup>[5]</sup>. Letztendlich sollen auch Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Gentherapie, sowie die Vakzinproduktion genannt werden (Faure et al., Boesen et al., Kessler et al.)<sup>[5]</sup>. Auch dort zeigen sich die definierten Bedingungen der Produktion über Zellkulturen von Vorteil.

Andererseits entwickelt sich die Produktion rekombinanter Proteine mittels *transgener* Tiere zur konkurrenzfähigen Alternative im Hinblick auf die Zellkultur. Mittlerweile werden mehr als 50 Proteine wie z.B. Antithrombin,  $\alpha_1$ -antiTrypsin, Lactoferrin oder Protein C, über die Milch transgener Mäuse, Ziegen und Schafe hergestellt (Houdebine et al., Meade et al., Werner et al.)<sup>[5]</sup>. Alle Produktionsbeispiele befinden sich momentan in der Zulassung für den kommerziellen Vertrieb. Im Bereich der Produktivität und der Ökonomie scheint der Vorteil dieser Technologie offensichtlich. (Produkttitel im Bereich g/L, Herstellungspreis pro Gramm 500-700 DM)<sup>[5]</sup>. Lediglich die geforderte Human-Identität einiger Proteine weist deutliche Mängel auf (unterglykosyliert, Spaltprodukte in der Milch). Des Weiteren kann die Produktion einiger Proteine nicht mit der Tierphysiologie in Einklang gebracht werden (human Erythropoietin). Aber auch die Aufreinigung der Produkte (heterogenes Ausgangsmaterial) und das Risiko viraler Kontaminationen oder pathogener Prionen (Scrapies, Bovine Spongiform Encephalitis, BSE) stellen weitere noch zu lösende Probleme dar.

Die Produktion humaner Biopharmazeutika über tierische Zellkulturen wird durch die einfache Handhabung im Produktionsverfahren erleichtert. Wird das Produkt bei *E.coli*-Zellen noch als „Inclusion Bodies“ gespeichert und erst durch Aufschluß der Zelle gewonnen, so sekretieren animalische Zellen das Produkt nativ und das Protein kann abgeerntet werden, ohne die Zelle zu zerstören. Aus diesem Grund zielen viele der großtechnischen

Produktionsanlagen auf kontinuierliche Systeme im Perfusionsverfahren ab, da hier das Produkt ständig abgeerntet werden kann, die Zellen jedoch im Reaktor verbleiben und dort bei ständiger Versorgung durch Nährstoffe potentiell in der Lage sind dauerhaft zu produzieren. Kontinuierliche Systeme garantieren ein Produkt gleichbleibender Qualität, da sich durch die Art der Prozeßführung kaum Gradienten in der Nährstoffzusammensetzung, und der aus deren Metabolisierung resultierenden Metabolitakkumulation ergeben. Der Einfluß diverser Metabolite auf die Glykosilierung der Produkte wurde berichtet<sup>[5]</sup>. Im Vergleich mit Prokaryonten sind tierische Zellkulturen durch die niedrige Biomasse wenig produktiv, des weiteren ist eine Kontaminationsanfälligkeit über Mikroorganismen durch die geringe Wachstumsgeschwindigkeit gegeben. Das Risiko einer Infektion wirkt sich durch die enorm hohen Mediumskosten und dem höheren apparativen sowie zeitlichen Aufwand nachteilig auf den Produktionsprozeß aus. Dennoch wird dies durch die qualitativ hohe Wertschöpfung der Produkte kompensiert.

Ist die Homogenität der Produktglykosilierung nicht entscheidend, kommen heutzutage andere Prozeßmodi wie Batch- oder Fed-Batch-Kultivierung zum Einsatz. Diese Systeme erzielen in kürzerer Zeit und unter ökonomischen Gesichtspunkten ähnlich gewünschte Produktmengen. Die Ausnutzung der Medien stellt grundsätzlich ein Problem dar, sind doch die Nährstoffanforderungen einer jeden Zelle durchaus verschieden<sup>[6][7]</sup>. Der kommerzielle Vertrieb dieser Medien zielt auf ein breites Anwendungsgebiet ab, so daß es diverser Optimierungsschritte bedarf, um für eine spezielle Zelllinie optimale Bedingungen hinsichtlich der Biomasse- und Produktmaximierung zu erreichen.

Die Erforschung und das Verständnis des Metabolismus der Zelle ist der Schlüssel für die erfolgreiche Realisierung einer ökonomischen Prozeßführung. Transformierte Zelllinien „in vitro“ zeigen einen deregulierten Stoffwechsel im Vergleich zu Zellen „in vivo“. Insbesondere die Glykolyse scheint überdimensional, die Verschwendung der wertvollen Substrate unnötig. Gerade aus diesem Grund bedarf es der Kenntnis, welche Anforderungen die Zelle an das Medium stellt.

Welche Menge und welche Komponenten werden tatsächlich für Wachstum oder Erhaltung der Zellfunktionen benötigt und wie kann man diesen Prozeß entsprechend leiten, so daß eine Minimierung der Verschwendung der Substrate erreicht wird ?

Im folgenden soll eine Charakterisierung des Stoffwechsels einer rekombinanten CHO Suspensionszelllinie vorgenommen werden. Dabei muß insbesondere der Einfluß unterschiedlicher Prozeßführungen (Batch, Fed-Batch und Chemostat mit und ohne

Nährstoffpuls) auf den Stoffwechsel getestet werden. Des Weiteren soll in Zusammenarbeit mit dem Hersteller die Mediumbeschaffung variiert werden, d.h. der Einfluß der Substratkonzentration und Substratzusammensetzung untersucht werden. Dabei ist die Charakterisierung der Hauptstoffwechselwege nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ durchzuführen. Ermöglicht wird dies durch die Etablierung neuer Analyse- und Modellierungsmethoden („Metabolic-Flux-Analysis“). Es werden Vergleiche durchgeführt und Unterschiede zur einschlägigen Literatur herausgearbeitet.

Anhand der Beurteilung des Metabolismus unter verschiedenen Bedingungen soll das für die Produktion des Antithrombin-III am besten geeignete Verfahren ermittelt werden. Damit der Prozeß kontrolliert verlaufen kann, d.h. Substrat- und Metabolitkonzentrationen im Rahmen der tollerierbaren Grenzen konstant gehalten werden können, sind die dafür notwendigen und den Ansprüchen genügenden Analyseverfahren zu entwickeln. Deren Anwendbarkeit ist am Prozeß zu validieren.

Anschließend werden Schritte implementiert, die auf eine verfahrenstechnische Optimierung der Zellkonzentration, des Produkttiters und der Substratausnutzung hinzielen.

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1 Das Produkt Antithrombin III

Das einkettige Glykoprotein Antithrombin III (ATIII) gehört zu den wichtigen Plasmaproteinen des Menschen. Es hemmt alle aktiven Serin-Proteasen der Blutgerinnungskaskade (die Faktoren XIIa, XIa, IXa, Xa und Thrombin). Das Thrombin ist für die Gerinnung des Blutes verantwortlich, indem es Fibrinogen zu vernetztem Fibrin umsetzt, welches zusammen mit den Thrombozyten eine abdichtende Wirkung der Wunde erzielt.

Bei der Inaktivierung des Thrombins bildet Antithrombin einen durch elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehaltenen Komplex, dessen Bildungsgeschwindigkeit durch den Cofaktor Heparin um den Faktor 100-1000 erhöht wird. Die Aminosäuresequenz des AT-III besteht aus 432 Aminosäuren. An den in der Tertiärstruktur außen liegenden Aminosäuren Asparagin (Asn) 96, Asn 135, Asn 155 und Asn 192 ist es über die primäre Aminogruppe N-glykosidisch mit vier ( $\alpha$ -ATIII-Form) bzw. drei ( $\beta$ -ATIII-Form) Kohlenhydratseiten-Ketten verbunden, die 9-15 % des Molekulargewichtes ausmachen<sup>[8][9]</sup>.

Die  $\beta$ -Form weist aufgrund verminderter elektrostatischer Abstoßung eine höhere Affinität zu Heparin auf<sup>[9]</sup>. Aufgrund der teilweise aufgehobenen Schutzwirkung durch die fehlerhafte Glykosilierung ist die biologische Halbwertszeit erniedrigt.

Für die verwendete CHO-Zelllinie wurde eine größere Heterogenität bei der Glykosilierung gefunden (Zettlmeissl et al.)<sup>[10][42]</sup>. Demnach ist es nicht unüblich, daß tri- und tetraantenäre Kohlenhydratstrukturen beobachtet werden, obwohl es im humanen AT-III nur eine biantenäre Struktur gibt<sup>[9]</sup>. Es wird klar, warum die Produktion rekombinanter Glykoproteine durch tierische Zellen ein Problem darstellt. Die Zelle ist zwar aufgrund des genetischen Codes in der Lage das Protein in der richtigen Aminosäuresequenz zu synthetisieren, sie muß die posttranslationalen Veränderungen jedoch in eigener Regie vornehmen, wobei es zu Fehlern kommen kann. Diese Prozessierung durchläuft mehrere Stationen und Transportmechanismen im endoplasmatischen Retikulum, sowie im Golgi Apparat<sup>[11][12]</sup>.

Bisher konnte keine Einschränkung der biologischen Aktivität aufgrund der Heterogenität im Glykosilierungsmuster festgestellt werden. Eine Kenntnis der Glykosilierung ist für die therapeutische Zulassung jedoch unbedingt erforderlich, da eine Verabreichung eines in der Glykostruktur nicht definierten Produktes nachweislich zu Immunreaktionen führen kann.

Eine für die Produktstabilität entscheidende Komponente scheint die N-Acetylneuraminsäure, kurz Sialylsäure, zu sein, denn dieser endständige Bestandteil der Kohlenhydratseitenkette des ATIII ist besonders anfällig gegenüber Angriffen von Proteasen, hier Sialydasen. Damit wird die biologische Halbwertszeit herabgesetzt. Seit neuem weiß man, daß bestimmte Leberenzyme bestimmte Proteine ohne endständige Sialylsäure erkennen und sofort abbauen.

## **2.2 Zelluläre Transportsysteme**

Der Verbleib der Hauptstoffwechselfsubstrate ist durch die biochemische Reaktionsabfolge einer wachsenden Zelle festgelegt. Die Reaktionen der Glykolyse, des Citratcyklus, der DNA-, RNA- und Fettsäuresynthese sind bestens bekannt. Dennoch sind die Verknüpfungen dieser Stoffwechselwege untereinander ungemein komplex, und erst die Organisation in der Zelle ermöglicht eine optimale Ausnutzung der Substrate. Aufgrund der unterschiedlichen Kompartimentierung in der Zelle und der lokalen Trennung voneinander abhängiger Enzymsysteme, sind Transportsysteme notwendig, die die Grundsubstanzen zum Ort der Umsetzung bringen.

Nur sehr kleinen unpolaren Molekülen (wie O<sub>2</sub>, oder CO<sub>2</sub>) ist die Diffusion durch die Phospholipidmembran tierischer Zellen möglich. Bei polaren Molekülen ist ein selektiver Transport durch integrale Membranproteine erforderlich. Man unterscheidet zwischen aktivem und passivem Transport (erleichterte Diffusion). Die Aufnahme der Glukose aus dem Blutplasma gehört dem letzteren Mechanismus an. Unter aktivem Transport versteht man den an Energie gekoppelten Transport entgegen dem Konzentrationsgradienten.

Es muß weiterhin zwischen Carrier- und Kanalproteinen unterschieden werden. Kanalproteine besitzen einen meist wassergefüllten Hohlraum und wirken wie eine spezifische Membranpore. Der Transport einiger Ionen erfolgt nach diesem Mechanismus. Carrier-Proteine bestehen aus zwei Untereinheiten, die die Membran mehrere Male durchspannen und sich in ihrer Funktionsweise mit einem Enzym vergleichen lassen.

Formal unterscheidet man auch zwischen Uniport, Symport (Cotransport) und Antiport (Austauschtransport). Wie die Bezeichnung bereits verrät, ist beim Symport der simultane Transport mit einem weiteren Molekül in die gleiche Richtung gekoppelt. Dagegen ist der Antiport nur im Austausch mit einer anderen Spezies möglich.

Größere Moleküle und Proteine werden durch Endo- bzw. Exozytose aufgenommen bzw. ausgeschleust. Hierbei werden diese Substanzen nach Bindung an Membranrezeptoren von der Membran umgeben und als Membran umgebende Vesikel in die Zelle aufgenommen<sup>[11][12][13]</sup>.

### 2.2.1 Malat-Aspartat-Transportsystem

Durch die Reduktion diverser Substrate fallen reduzierte Coenzyme an, die bei den spezifischen Reaktionen als Elektronenakzeptoren fungiert haben. Dabei sammeln die Coenzyme  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  die Reduktionsäquivalente und bringen sie in eine einheitliche chemische Form. Ein Reduktionsäquivalent besteht aus einem entstandenem Elektronenpaar und zwei Wasserstoffatome, welches zum einen in Form eines Hydrid-Ions  $:\text{H}^-$  in den Pyridinring eingebaut wird, das andere Wasserstoff Atom verbleibt als  $\text{H}^+$  im Medium.

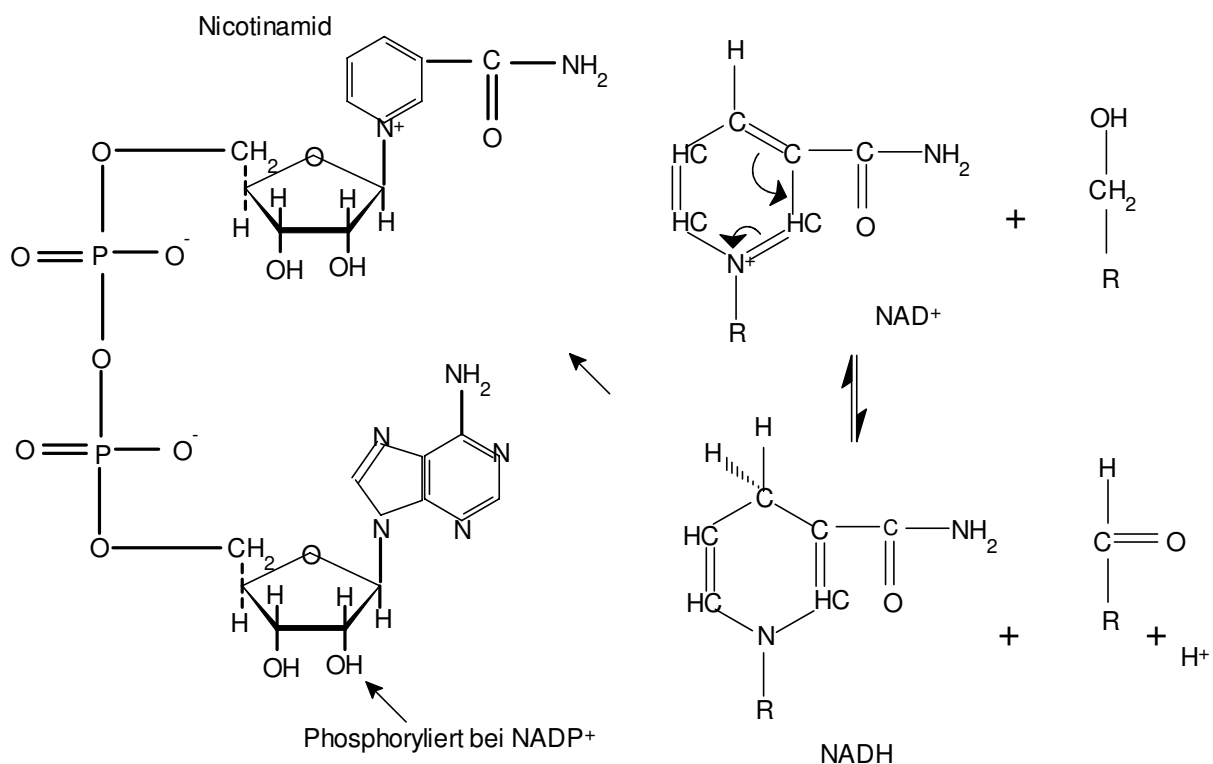
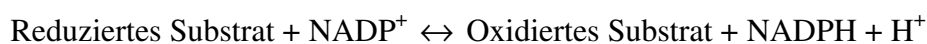
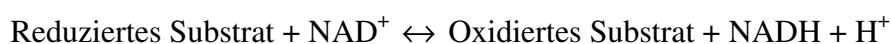


Abbildung 2.a: Struktur des Nicotinamadeninucleotid ( $\text{NADH}$ ), Die Übertragung der Reaktionsäquivalente erfolgt auf den Pyridinring. Pyridinnucleotide sind generell sterisch ungünstige und sehr geladene Moleküle.

Grundsätzlich liegen folgende Systeme zu Grunde:



Durch die NAD(P)<sup>+</sup>-Transhydrogenase ist auch die Interkonversion beider Coenzyme möglich

$$\text{NADP}^+ + \text{NADH} \leftrightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^+$$

Durch die Wirkung des Enzym wird ein hohes Verhältnis von NADPH/NADH aufrecht erhalten, wodurch zum einen die reduktive Biosynthese, aber auch katabole Prozesse begünstigt werden<sup>[14]</sup>.

Die NAD<sup>+</sup>-abhängigen Dehydrogenasen des Cytosols können nur mit den Pyridinnucleotiden des Cytosols reagieren (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, Laktatdehydrogenase), während dessen die Dehydrogenasen der Mitochondrien (Isocitratdehydrogenase, Pyruvatdehydrogenase) nur mit dem NAD<sup>+</sup> innerhalb der Mitochondrien reagieren. Einige wenige, wie z.B. die Malatdehydrogenase, sind sowohl in den Mitochondrien als auch im Cytosol lokalisiert oder wie die mitochondriale Glutamatdehydrogenase sowohl NAD<sup>+</sup> als auch NADP<sup>+</sup> abhängig.

Die Regeneration der Coenzyme, die insgesamt nur in katalytischen Mengen vorliegen, erfolgt durch Abgabe der Reduktionsäquivalente an die NADH-Dehydrogenase, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Der weitere Verbleib ist durch die Elektronentransportkette der Atmungskette vorbestimmt, wo letztendlich durch Reaktion mit molekularem Sauerstoff Wasser entsteht, gekoppelt mit der Produktion von ATP, der oxidativen Phosphorylierung.

Die NAD<sup>+</sup>- und die NADP<sup>+</sup>-Poole im Cytosol bzw. in den Mitochondrien sind durch die innere Mitochondrienmembran voneinander begrenzt, die für die Coenzyme undurchlässig ist. Da die Glykolyse transformierter Zelle einen enorm hohen Durchsatz aufweist, ist die Verfügbarkeit dieser Reduktionsakzeptoren begrenzt und die Regeneration für den Stoffwechsel geschwindigkeitslimitierend. Insbesondere ein NAD<sup>+</sup> Mangel ist zu vermuten, weil alle Dehydrogenasen der Glykolyse außer der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase NAD<sup>+</sup> abhängig sind.

Die Vermutung der Geschwindigkeitslimitierung wird durch die Tatsache gestützt, daß viele Zellen die reversible Reaktion der cytosolischen Laktatdehydrogenase nutzen, um auf schnellstem Wege das benötigte Coenzym zurück zu oxidieren (Pyruvat + NADH → Laktat + NAD<sup>+</sup>) Als Endprodukt entsteht aber Laktat, dessen toxische Wirkung die Zellfunktionen nach und nach inhibiert (u.a. Erhöhung des intrazellulären pH-Werts)<sup>[15][91][92]</sup>.

Unter glykolyse-regulierten Bedingungen erfolgt die Regeneration wie schon erwähnt durch die Atmungskette. Eine weitere Möglichkeit besteht mit Hilfe der bereits erwähnten



Transhydrogenasereaktion<sup>[14]</sup>. Dafür müßte allerdings genügend NADP<sup>+</sup> zur Verfügung stehen, dieses ist allerdings in schnell proliferierenden Zellen begrenzt.

Es ist deshalb notwendig, daß die Reduktionsäquivalente in die Mitochondrien gelangen. Aufgrund der Undurchlässigkeit der Mitochondrienmembran für Pyridinnucleotide geschieht dies durch ein spezifisches Transportsystem, dem Malat-Aspartat-Shuttle<sup>[16][17]</sup>, dessen zyklische Wirkungsweise in Abbildung 2.b dargestellt werden soll:

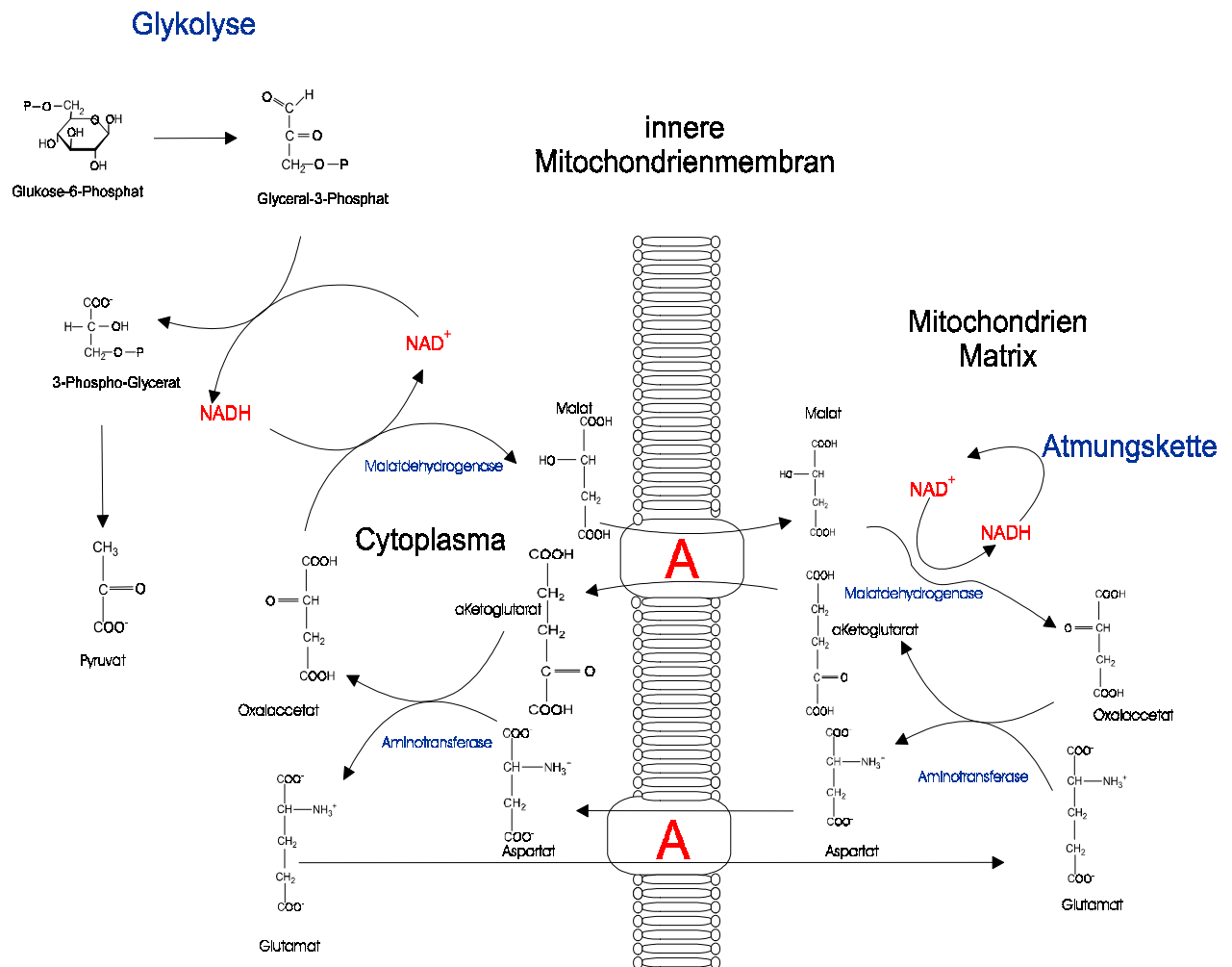


Abbildung 2.b: Der Malat-Aspartat-Zyklus ermöglicht den Transport hoher Mengen Reduktionsäquivalente in die Mitochondrien

Abbildung 2.b verdeutlicht den komplexen Zusammenhang des Pendel-Transportsystems. Die bei der Reduktion von Glyceralphosphat zu 3-Phosphoglycerat anfallenden Reduktionsäquivalente werden durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase auf NAD<sup>+</sup> übertragen. Um die Membran zu passieren werden die Reduktionsäquivalente durch die cytosolische Malatdehydrogenase auf Oxalacetat transferiert, wobei Malat entsteht.

Das Malat kann die Membran im Antiport mit  $\alpha$ -Ketoglutarat durchqueren.

In der Mitochondrienmatrix wird das Malat durch die mitochondriale Malatdehydrogenase wieder in einer  $\text{NAD}^+$ -abgängigen Reaktion zu Oxalacetat umgesetzt. Das mitochondriale  $\text{NAD}^+$  tritt nun mit den Enzymen der Atmungskette in Kontakt. Die Eigenschaft cytosolisches  $\text{NAD}^+$  zu regenerieren, fällt dem Wechselspiel der Malatdehydrogenase im jeweiligen Kompartiment zu.

Das gebildete Oxalacetat kann nicht mehr zurück ins Cytosol gelangen. Deswegen wird es durch eine Aminoäuretransferase in Aspartat umgewandelt. Dieses passiert die Membran im Austausch mit Glutamat über ein spezielles Aminosäuretransportsystem. Die Reaktion der Aminosäuretransferase bewirkt, daß mit Glutamat  $\alpha$ -Ketoglutarat zurückgebildet wird, welches für den Dicarboxylat-Transporter (d.h. Malat im Antiport zu  $\alpha$ -Ketoglutarat) benötigt wird. Die Reaktionen im Cytosol verlaufen entgegengesetzt, so daß hier wieder Oxalacetat entsteht, welches die Reduktionsäquivalente infolge Reduktion zum Malat bindet.

Letztendlich wird folgende Nettobilanz postuliert:  $\text{NADH} + \text{mNAD}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{mNADH}$ , d.h. kein zusätzlicher Metabolit wird verbraucht, bzw. gebildet, nur ein Nettotransport von  $\text{NADH}$  in die Mitochondrienmatrix ist bilanzierbar. Dies wird durch die kontroverse Funktionsweise der beiden daran beteiligten Enzyme in den jeweiligen Kompartimenten ermöglicht. Beide Enzyme werden durch  $\text{NAD}^+$  stimuliert, bzw. inhibiert.

### **2.3 Weitere Transportsysteme**

Es sind weitere Transportsysteme für den Austausch von Metaboliten zwischen den Mitochondrien und dem Cytosol bekannt. Der im Malat-Aspartat-Shuttle integrierte Malat-Transporter, befördert Malat im Austausch mit  $\alpha$ -Ketoglutarat in die Mitochondrien. Auch der Malat-Citrat-Transporter ist von besonderer Bedeutung, da Malat nur im Austausch mit Citrat ins Cytoplasma gelangt, wo die Enzymsysteme der Fettsäure oder Lipidsynthese lokalisiert sind<sup>[85]</sup>.

Auch der Dicarboxylat-Transporter kann durch Austausch mit Phosphat mitochondriales Malat ins Cytosol befördern. Alle diese Transportsysteme spielen eine wichtige Rolle, ohne deren Berücksichtigung die Erstellung eines metabolischen Netzwerkes nicht möglich ist (siehe Kapitel 4.1, Metabolische Flußanalyse)<sup>[18]</sup>.

### 2.3.1 Aminosäure- und Peptidtransport

Die Versorgung mit Aminosäuren ist essentiell für jede tierische Zelle:

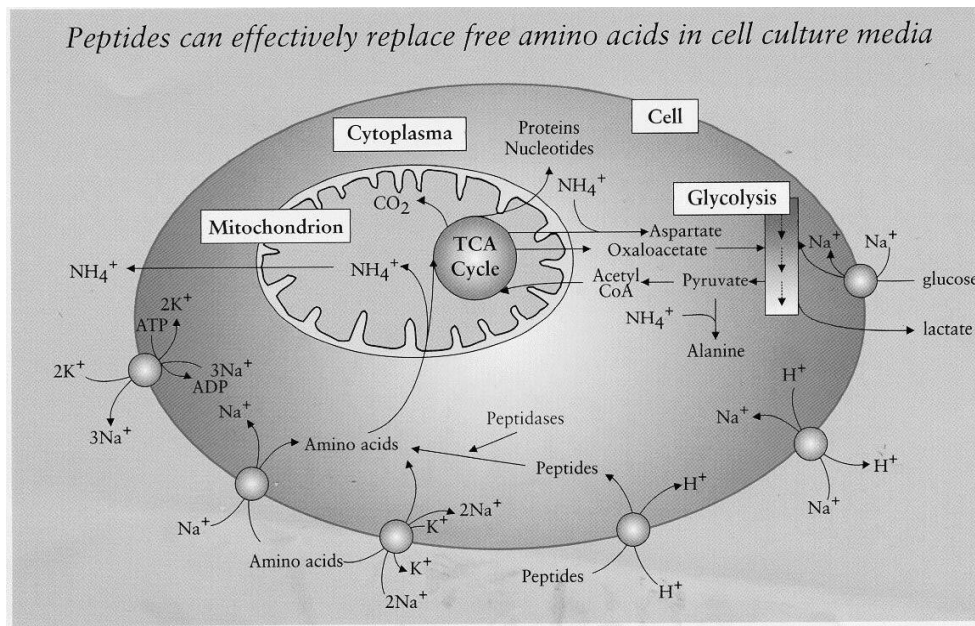


Abbildung: 2.c: Der Transport von Aminosäuren und Peptiden in die Zelle ist mit Energie (ATP) Aufwand verbunden (aus <sup>[19]</sup>).

Auch der Transport der Aminosäuren stellt einen aktiven Transport durch die Zellmembran dar und ist eng mit der Aufrechterhaltung des Ionengradienten von  $[\text{Na}^+]$  und  $[\text{K}^+]$  verbunden. Allgemein bekannt ist, daß die  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Cytoplasma sehr gering ist, wohingegen ein hoher  $\text{K}^+$ -Anteil postuliert wird. Im extrazellulären Raum findet man Gegenläufiges. Da der Transport von Aminosäuren nur im Symport mit  $\text{Na}^+$ -Ionen möglich ist, wird dieser natürliche Gradient gestört. Dabei werden für saure Aminosäuren (Asp, Glu) zwei  $\text{Na}^+$ -Ionen benötigt, für alle weiteren jeweils ein Symport  $\text{Na}^+$ -Ion. Die hohe Menge  $\text{Na}^+$ -Ionen, die durch den Aminosäure-Transport einfließen, werden durch den aktiven Transport der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  austauschenden ATPase wieder nach außen befördert. Dieses Enzym spaltet ATP zu ADP und nutzt diese Energie zum Ionentransport. Pro Molekül ATP werden drei  $\text{Na}^+$ -Ionen nach außen und zwei  $\text{K}^+$ -Ionen nach innen transferiert. Dieser sogenannte elektrogene Antiport trägt weiterhin zum Membranpotential bei. Bei dieser Betrachtung wird deutlich, daß die Aufnahme von Aminosäuren hierbei der energieaufwendige Prozeß ist. Deshalb versucht man neuerdings Aminosäuren durch Peptide zu ersetzen, da der Transport von Peptiden nur mit dem Symport von einem Proton verbunden ist. Die Peptide werden intrazellulär durch Peptidasen gespalten und stehen dem katabolen und anabolen Stoffwechsel dann zur Verfügung<sup>[19]</sup>.

## 2.4 Metabolic-Engineering

Unter dem Begriff „metabolic-engineering“<sup>[20]</sup> versteht man die geschickte Zusammenstellung eines Netzwerks der biochemischen Reaktionen, die zur Untersuchung des Stoffwechsels eines Organismus beitragen, um durch gezielte Eingriffe im Mediumdesign oder in der Prozeßführung den Metabolismus so zu beeinflussen, daß durch Umgestaltung der intrazellulären Flüsse effiziente Substratausnutzung, reduzierte Metabolitproduktion, sowie besseres Zellwachstum und Produktausbeute erreicht werden.

Zu diesem Zweck ist eine quantitative Beurteilung des Zellmetabolismus notwendig, d.h. wie hoch ist der Durchsatz durch die Stoffwechselwege und wie kann man den Durchsatz regulieren. Durch diese Quantifizierung der intrazellulären Flüsse kann der Nährstoffbedarf für den Katabolismus und Anabolismus berechnet werden und bei Bedarf das Medium neu formuliert werden. Es besteht die Möglichkeit, Stoffwechselwege zu identifizieren, die für eine Limitierung im Wachstum oder der Produktivität verantwortlich sind, oder solche sichtbar machen, die eigentlich überflüssig und Energie verbrauchend sind. Grundsätzlich ermöglicht dieses Wissen ein quantitatives Verständnis der Biochemie der Zelle, so daß Verknüpfungen und Regulationsmechanismen zwischen den Stoffwechselwegen erkannt werden<sup>[20][21][22][23]</sup>.

Die Mehrheit der Anwendungsbeispiele für „metabolic-engineering“ versuchte über eine Manipulation der enzymatischen Reaktionen der letzten Syntheseschritte des Produktes in den Organismus einzugreifen. Dennoch scheint die Verfügbarkeit von Kohlenstoff-Vorstufen, Cofaktoren oder Energiemetabolite in der ökonomischen Arbeitsweise des Organismus im Vordergrund zu stehen. Das Lokalisieren der kritischen, d.h. limitierenden Verzweigungspunkte im Gesamtkatabolismus und -anabolismus stellt eine schwierige Aufgabe dar. Sind diese dann gefunden, muß zwischen inhibierender, verstärkender oder abschwächender Enzymmanipulation entschieden werden.

Grundvoraussetzung allerdings ist die Bestimmung der quantitativen Flußverteilung in der Zelle. Zur Bestimmung dieser intrazellulären Flüsse wurden bislang mehrere Ansätze herangezogen, sie beruhen aber allesamt auf der direkten Messung intrazellulärer Metabolite. Dies geschieht durch Szintillationsmessung, oder „in vivo“ NMR (Nuklear Magnetische Resonanz) -Analyse der angereicherten End- bzw. Zwischenprodukte.<sup>[26][27][28]</sup>

Dennoch sind auch diesen Bestimmungsmethoden Grenzen gesetzt, zumal beispielsweise die Szintillationsmessung von  $^{14}\text{CO}_2$  zur Beurteilung der Aktivität des Citratcyklus eine Vereinfachung darstellt, da weitere  $\text{CO}_2$ -produzierende Reaktionen vernachlässigt werden.

Durch die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse kann nicht nur zwischen verschiedenen gelabelten Spezies, sondern auch zwischen einzelnen Positionen der Markierung unterschieden werden. Nachteilig wirkt sich auch hier aus, daß nur gelabelte Metabolite erfaßt werden können. Hinzu kommt die Tatsache, daß die Anreicherung derartiger Zelldichten, die eine ausreichende Signalstärke der zu messenden Intermediärprodukte erzeugen, nur in inhomogenen Hohlfaserreaktoren möglich ist. Unglücklicherweise entspricht das Zellwachstum dieser Systeme ( $\mu$  ist nahe null) nicht dem in homogenen Rührkesselreaktoren, die für den Produktionsmaßstab eingesetzt werden.

Die experimentellen Rahmenbedingungen für die NMR-Messung unterscheiden sich von den Proliferationssystemen, so daß diese Methode zur Bestimmung der intrazellulären Flüsse nicht aussagekräftig ist.

Zur Vermeidung ist entweder eine Durchführung unter ähnlichen Bedingungen erforderlich, oder man wendet die sogenannte „metabolic-flux-balancing“ Methode an <sup>[29]-[35]</sup>. Diese Methode beruht auf einer rein stöchiometrischen Massebilanzierung der Hauptstoffwechselwege und der Berechnung der experimentellen Verbrauchs-, bzw. Bildungsraten der externen Metabolite. Die Lösung des komplexen linearen Gleichungssystems ist mit einem hohen mathematischen Aufwand über die least-square-Prozedur möglich. Hinsichtlich weiterer Details wird auf die nähere Beschreibung dieser Methode im Kapitel „Material und Methoden“ verwiesen.

## **2.5 Produktivität in Abhängigkeit vom Zellzyklus**

Des öfteren wurde schon beobachtet<sup>[38]</sup>, daß die spezifische Produktion des gewünschten Produktes vom der momentanen Phase im Zellzyklus abhängig ist. Der Zellzyklus ist ein fundamentaler Prozeß mit analogen Mechanismen für alle Zelltypen, wobei eine phasenabhängige Reifung der Zellen postuliert wird.

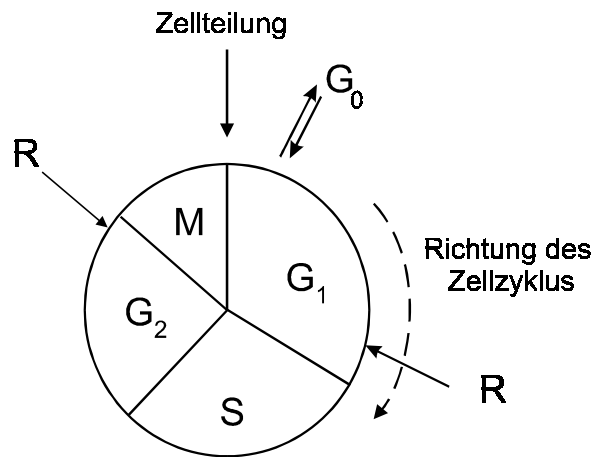


Abbildung 2.d: Der Zellzyklus: Ein in Phasen untergliederter Teilungsvorgang einer Zelle. R=Restriktionszeitpunkt, d.h. nach Überschreiten dieses Punktes läuft der Teilungsautomatismus unwiderruflich ab.

Nach einer Zellteilung fällt die normale oder untransformierte Zelle oftmals in eine Ruhephase die sogenannte G<sub>0</sub>-(Gap)-Phase. Die G<sub>0</sub>-Phase ist ein Seitenweg des Zellzyklus, wo vitale Zellen bis zum Zeitpunkt, an dem ein Aktivator die Teilungsaktivität stimuliert, verharren. Diese Ruhephase kann eine beträchtliche Zeit, in manchen Fällen sogar Tage betragen. Im Gegensatz dazu treten transformierte (etablierte), bzw. unsterbliche Zelltypen, so wie sie in biotechnologischen Systemen eingesetzt werden, nicht in die G<sub>0</sub>-Phase ein, sondern gleich in die G<sub>1</sub>-(Gap)-Phase ein, wo sie sich auf die nächste Teilung vorbereiten. Beim Eintritt in die sogenannte S-(Synthese)-Phase beginnt die Zelle mit der Verdoppelung ihres Genoms und den dazugehörigen Histonen, bzw. anderer Zellkernproteine. Auch die Kompartimente wie Mitochondrien, endoplasmatische Retikulen oder Ribosomen werden in dieser Phase vervielfältigt. Nach dieser Synthesephase kommt es zu einer weiteren Ruhephase, der sogenannten G<sub>2</sub>-Phase, in der die für die direkt bevorstehende Mitose benötigten Proteine produziert werden. Nach der Mitose, dem eigentlichen Teilungsvorgang, schließt sich der Zyklus und die beiden Tochterzellen beginnen von neuem in der G<sub>1</sub>- oder G<sub>0</sub>-Phase.

Im Verlauf eines durchschnittlichen 24-stündigen Zellzyklus dauert die G<sub>1</sub>-Phase 10 Std., die S-Phase 9 Std., die G<sub>2</sub>-Phase 4 Std. und die Mitose 1 Stunde<sup>[38]</sup>. Der Zellzyklus ist ein komplex reguliertes System, in dem diverse Proteine, die speziell für die Regulierung zuständig sind, periodisch transkribiert werden, so wie zum Beispiel Proteine der Familie der Cyclin-abhängigen Kinase (engl. CdK), der Cycline oder Transskriptionsfaktoren wie MYB, E2F1 und JUN<sup>[37]</sup>.

Eine vom Zellzyklus phasenabhängige Produktivität konnte in verschiedenen Fällen beobachtet werden. Bei rekombinanten CHO-Zellen ist dies oftmals mit der Wahl des Expressionsvektors verbunden. Zellen mit SV-40 kontrollierten DHFR-Genen oder hCMV kontrollierten lacZ Genen produzierten das Produkt  $\beta$ -Galaktosidase (nicht sekretiert) ausschließlich in der S-Phase<sup>[37][38][39]</sup>. Andererseits weiß man, daß insbesondere der SV-40 Promotor eine gelockerte Replikation aufweist. Mit Hilfe des SV-40 Antigens umgeht das Virus die DNA-Doppelreplikation, die die Zelle nach einmaliger Replikation durch einen spezifischen Inhibitor blockiert, d.h. durch die Promotoreigenschaft ist es möglich das Fremdgen unabhängig von dem Wirtszellengenom vielfach zu replizieren<sup>[40]</sup>.

Dennoch scheint kein universelles Konzept für die Zellzyklus abhängige Produktexpression zu existieren. Vielmehr schlägt Al-Rubeai einen vom Zelltyp und Expressionsvektor, d.h. einem speziell vom eingesetzten Promotor abhängigen Vorgang vor<sup>[38]</sup>. Des weiteren scheinen auch Faktoren wie Genkopieanzahl des Produktes oder Posttranskriptionsregulierung (mRNA-Gehalt) den Vorgang zu beeinflussen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Die CHO-Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete rekombinante Suspensionszelllinie CHO-SSO/A2 (Dehydrofolatreduktase (DHFR) negativ)<sup>[41]</sup> ist ein durch die Behringwerke Marburg weiter entwickelter Langzeitsuspensions-Clon<sup>[42]</sup> der ursprünglichen CHO DUKBX1 Zelllinie (Chasin et al.), die durch Jamauchi et al.<sup>[43]</sup> und Zettlmeissl et al.<sup>[42][44]</sup> modifiziert wurde.

Nach Cotransfektion des Plasmid pSVATIII (human AT-III-cDNA), mit dem DHFR-Expressionsvektor pMTVAdhfr (pSV0Adhfr) wurde deren Produktivität mittels Methotrexat-Amplifizierung bis auf  $22 \mu\text{g} \cdot 10^6 \text{Zellen}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  gesteigert<sup>[42]</sup>. Die Zelllinie ist serumunabhängig. Für die Untersuchungen wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit Zellen gleicher Passage (360.-365. Umsetzung) eingesetzt.

### 3.2 Medium

Alle Kultivierungen wurden im serumfreien Medium Ultra CHO (Boehringer Ingelheim Partnership, Heidelberg) durchgeführt. Das Medium basiert auf einer Neuformulierung des Standardmediums DMEM/F12. Hinsichtlich der Proteinvariabilität sind keine Angaben bekannt, lediglich ein Gesamtproteingehalt von weniger als 300 mg/L ist postuliert<sup>[46]</sup>.

### 3.3 Kultivierungssysteme

Für Stammhaltung und Vorkultur wurden Monolayer (Costar, 50 ml), bzw. Spinnerflaschen (Techne, 250 und 500 ml Reaktionsvolumen) benutzt. Ein Scale-up-Verfahren für die Kultivierung im 5 Liter Bioreaktor wurde in der Reihenfolge Monolayer → 250 ml Spinner → 500 ml Spinner durchgeführt. Die Animpfdichte betrug jeweils  $10^5 \text{Ze/ml}$ .

Die Kultivierungen erfolgten im Bioreaktor unter Verwendung eines Biostat B Rührkesselreaktors (B.Braun, Melsungen), welcher eine Regelung des pH-Wertes, der  $\text{pO}_2$ -Konzentration, sowie Temperatur und Rührgeschwindigkeit gewährleistete. Die Sauerstoffversorgung wurde über eine Silikonschlauchbegasung ermöglicht<sup>[47]</sup>. Diese Technik vermeidet die Beschädigung der Zellen durch das Zerplatzen der Luftblasen an der Oberfläche<sup>[81]</sup>. Hinsichtlich des weiteren Equipment und der Vorbereitung zur Fermentation wird auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen<sup>[48][49][50]</sup>. Die



Sterilisation des Reaktionsgefäßes erfolgte extern im Autoklaven (Integra Bioscience) bei 121°C für ca. 2 Stunden.

Die On-line-Datenerfassung und Überwachung der Kultivierungsparameter übernahm das Programm BIO-TEMDAT 5.86 (TEM-Electronics).

Für die kontinuierliche Probenentnahme zwecks on-line Messung wurde das tubuläre Probeentnahmemodul ESIP (Fa. Eppendorf) eingesetzt. Bei niedrigem Volumenstrom < 0,5 ml/min arbeitete das Modul ohne Verblockung zuverlässig und luftblasenfrei. Während der Sterilisation war unbedingt erforderlich, das Probenahmemodul in Reinst-Wasser einzutauchen, um eine Blockierung zu vermeiden.

### 3.4 Off-line-Analytik

Zur Untersuchung und Charakterisierung des Zellstoffwechsel zeigte sich eine Analysenfrequenz von 12 Stunden für die folgenden off-line Parameter als angemessen:

**Zellzahl:** Die Zellzahlbestimmung erfolgte über die Trypanblau Methode durch Auszählung im Hemacytometer (Thoma, amtlich geeicht).

**Glukose und Laktat:** Die Konzentrationsbestimmung dieser primären Metabolite wurde mittels Yellow Springs Instrument (YSI 2700) durchgeführt<sup>[51]</sup>.

**Aminosäuren:** Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels „reversed phase“ HPLC über eine Gradientensteuerung nach vorheriger Vorsäulenderivatisierung mit OPA-MCE, bzw. FMOC.

**Ammoniak** wurde mittels UV Testkit (Nr.112345) der Firma Boehringer Mannheim photometrisch (Kontron Uvikon 930, Fa. Kontron) analysiert.

**Ortho-Phosphat** wurde mittels photometrischer Detektion von Molybdän Blau (712 nm) nach vorheriger Reduktion von Molybdätophosphat bestimmt (Testkit PMB, Merck).

Die **Gesamtzuckerkonzentration** wurden nach der pHBAH Methode reduzierender Zucker (photometrisch bei 410 nm) durchgeführt<sup>[52]</sup>.

**Produktnachweis:** Die Detektion und Konzentrationsbestimmung des human Antithrombin III (ATIII) erfolgte mittels eines nicht kompetitiven heterogenen Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) (Vorschrift: Behringwerke GmbH & Co, Marburg). Die photometrische Messung dieses speziellen Sandwich ELISA`s erfolgte über das Chromogen Orthophenylendiamin (OPD) bei 405 nm in einem Immunoreader (Fa. Nunc).

### 3.4.1 Organische Säuren

Die Bestimmung der organischen Säuren erfolgte über HPICE (High Performance Ion Chromatography Exclusion), bei der die organischen Säuren über das Donnan-Ausschlußprinzip getrennt und aufgrund ihrer UV Adsorption detektiert werden. Die Trennung erfolgte mittels sulfonierten Kationenaustauscher auf Basis eines Polystyrol/Divinylbenzolharzes. Optimale Trennbedingungen wurden erreicht durch: Eluent 15 mM Schwefelsäure, Flußgeschwindigkeit 0,5 ml/min, Temperatur 40°C, UV Detektion bei 205 nm. Die Auswertung erfolgte sowohl über die Peakfläche als auch über die Peakhöhe mittels des Chromatographie-Programms APEX.

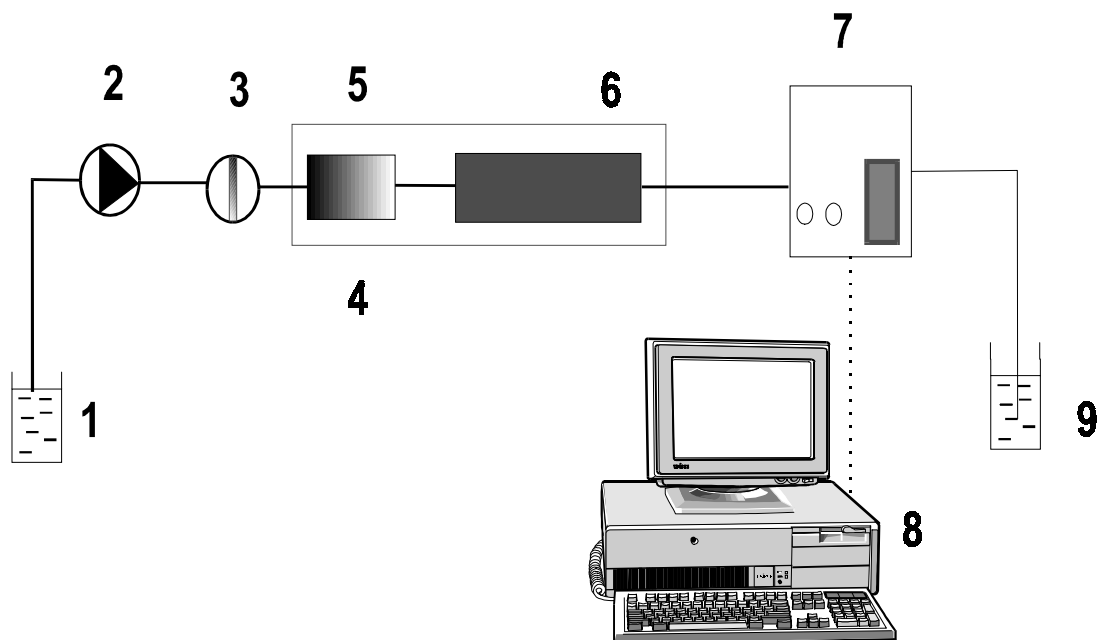


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau der HPICE Anlage

1. Eluent-Voratsgefäß (0.15m H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
2. Hochdruckpumpe mit Pulsationsdämpfer (Pharmacia Biosystems 2248 HPLC und Pulsationsdämpfer)
3. Sechswegeventil VICI AG Valco (Switzerland)
4. Wasserbad
5. Vorsäule Shodex Ionpak KC 810 P
6. Trennsäule Shodex Ionpak KC 811
7. UV-VIS-Detektor Soma S-3702
8. CSI-Box ERC Autochrom und PC
9. Abfallbehälter
10. Integrator Spektra Physics SP 4290 (nicht im Bild)

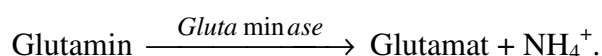
### 3.5 On-Line-Analytik

Die Regelung der Konzentration einiger Metabolite, insbesondere Glutamin, erforderte einen höheren Meßtechnikaufwand. Dies ermöglichte die On-line Detektion der Analyten über die Fließinjektionsanalyse (FIA). Das Prinzip dieser Meßtechnik ist hinlänglich bekannt<sup>[53]-[58]</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 4-Kanal Prozeßgerät der Firma Anasyscon (Hannover) eingesetzt. Mittels dieses mobilen Analysegerätes war die Detektion mehrerer Analyten gleichzeitig durchführbar. So konnten über zwei amperometrische Kanäle Glukose und Laktat gemessen werden, des weiteren über die restlichen Kanäle auch Glutamin und Ammonium. Die amperometrische Messung von Glukose und Laktat erfolgte nach Jürgens et al.<sup>[57][59]</sup>. Eine Methodenentwicklung mußte allerdings für das Substrat Glutamin sowie für das Abbauprodukt Ammonium vorgenommen werden.

Es wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung von L-Glutamin beschrieben<sup>[61]-[64]</sup>. Dabei erstreckt sich das Detektionsprinzip über weite Gebiete, ist aber durch die Wahl des eingesetzten Enzymes vorbestimmt. So ist bei Einsatz der Glutaminase eine Messung indirekt nur über das Abbauprodukt Ammonium möglich. Dies kann sowohl durch potentiometrische als auch durch kolorimetrische Detektion erfolgen.

Bei der Nachweismöglichkeit über Thermistoren wird die Wärmetönung dieser Umsetzung ausgenutzt. Die Wärmeerzeugung beruht auf der Basis der Glutamatdehydrogenase-Reaktion, eine der Glutaminasereaktion nach geschalteten Reaktion. Nachteilig wirkt sich hier der extrem hohe Preis der Glutamatdehydrogenase aus. Weiterhin ist auch die Anwendung der Glutamatoxidase möglich, die über die aperometrische Detektion verläuft<sup>[62]</sup>. In allen Fällen wirkt sich die Anwesenheit von vorhandenem Glutamat störend aus und muß selektiv entfernt werden, was die Vorbereitung zusätzlich erschwert.

In dieser Arbeit wurde von der kolorimetrischen Detektion des Ammoniums Gebrauch gemacht, welches die Glutaminasereaktion freisetzt. Dabei wird das Probesegment nach Ausgasung des im Medium bereits aparenten Ammoniums durch einen Citratpufferstrom (pH 5 optimale Enzymaktivität) durch die Reaktionskartusche (Fa. Mobitec) geführt. Die Glutaminaseaktivität (Sigma, E.C. 3.5.1.2.) in der Kartusche betrug anfänglich 25 Units, konnte nachher aber auf 10 Units reduziert werden. Folgende Reaktion ist selektiv für L-Glutamin:



Das Probesegment wird nun in 0,5 molare Natronlauge injiziert, um das freigesetzte Ammonium auszugasen. Probe/NaOH-Strom und Indikatorstrom (Bromkresol-Violett) durchfließen im

Gleichstrom eine dafür speziell angefertigte Dialysezelle (Oberfläche 300 cm<sup>2</sup>; TCI Werkstatt) und sind durch eine Flachmembran (Typ PP2EHF, Akzo Nobel) getrennt. Der induzierte Stoffdurchgang ist für Ammoniak selektiv<sup>[66]</sup>. Das diffundierte Ammoniak bewirkt eine Farbänderung des Indikators Bromkresol<sup>[65]</sup>, welches photometrisch bei 580 nm verfolgt werden kann. Nähere Einzelheiten des Systems sind beschrieben bei Rieseberg und Hagedorn<sup>[67][68]</sup>.

Unter Anwendung dieses Prinzips konnte eine Regelung des Prozesses hinsichtlich des Basisparameters Glutamin vorgenommen werden. Die Meßdatenerfassung und Regelung erfolgte über CAFCA (Anasyscon, Hannover). Der von CAFCA implementierte Regelungsalgorithmus entspricht einem digitalisierten PID-Regler<sup>[69]</sup>.

Die idealisierte Gleichung eines PID-Reglers lautet nach DIN 19226 :

$$u(t) = K \left[ e(t) + \frac{1}{T_I} \int_0^t e(\tau) d\tau + T_D \frac{de(t)}{dt} \right] \quad \text{Gl. (3.5.1)}$$

K = Verstärkungsfaktor, T<sub>I</sub> = Integrierzeit (Nachstellzeit), T<sub>D</sub> = Differenzierzeit (Vorhaltzeit)

u(t) = Reglerausgabe, e(t) = Differenz von Regelabweichung (Sollwert - Istwert)

Für kleine Abtastzeiten T<sub>0</sub> ergibt sich durch Diskretisieren und durch kontinuierliche Integration mittels Rechteckintegration :

$$u(k) = K \left[ e(k) + \frac{T_0}{T_I} \sum_{i=0}^{k-1} e(i) + \frac{T_D}{T_0} (e(k) - (e(k-1))) \right] \quad \text{Gl. (3.5.2)}$$

Zur Ableitung des rekursiven Algorithmus subtrahiert man vom Stellungsalgorithmus:

$$u(k-1) = K \left[ e(k-1) + \frac{T_0}{T_I} \sum_{i=0}^{k-2} e(i) + \frac{T_D}{T_0} (e(k-1) - (e(k-2))) \right] \quad \text{Gl. (3.5.3)}$$

d.h. die momentane Änderung der Stellgröße ergibt sich wie folgt:

$$\Delta u(k) = u(k) - u(k-1) = q_0 e(k) + q_1 e(k-1) + q_2 e(k-2) \quad \text{Gl. (3.5.4)}$$

mit q = Parameter des digitalen PID-Reglers:

$$q_0 = K \left( 1 + \frac{T_D}{T_0} \right) \quad \text{Gl. (3.5.5)}$$

$$q_1 = -K \left( 1 + 2 \frac{T_D}{T_0} - \frac{T_0}{T_I} \right) \quad \text{Gl. (3.5.6)}$$

$$q_2 = K \frac{T_D}{T_0} \quad \text{Gl. (3.5.7)}$$

Folgendes Schema erörtert die Zusammenhänge des Steuerungsalgorithmus:

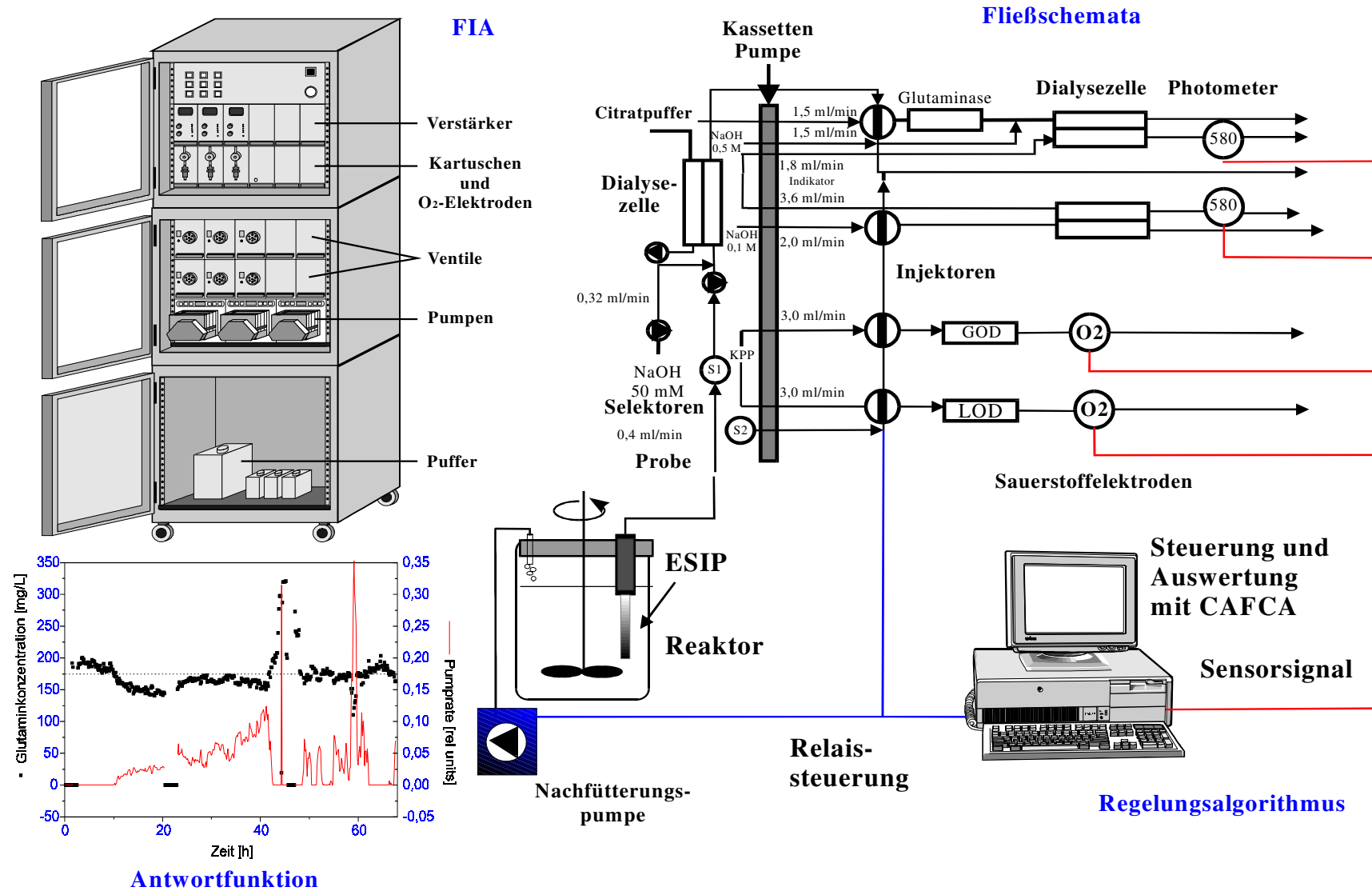


Abbildung 3.2: Substratregulierung während einer Fed-Batch-Kultivierung. Die On-line-Messung erfolgt mittels FIA. Meßdatenerfassung und Regelung übernimmt CAFCA.

Infolge der Rahmenbedingungen mußten folgende Einstellungen berücksichtigt werden: 5 Liter Reaktorvolumen, 5 min. Meßzykluszeit, 0,1 molare Glutaminzufütterungskonzentrat.

Die experimentelle Optimierung der Werte ergab  $q_0 = 0,00404$  für den Verstärkungsanteil,  $q_1 = -0,0022$  für die Nachstellzeit und  $q_2 = -0,00176$  für die Vorhaltezeit. Der PID-Regler berechnete im Falle einer temporären Abweichung vom Stellwert eine Nachfütterungsrate, deren numerischer Wert vom Programm in eine analoge Spannungsausgabe umgerechnet wurde und bei Bedarf die Nachfütterungspumpe (Heraeus Pericolor CD70) aktivierte.

Das dadurch entstandene Konzentrationsprofil des Substrates (Abb.2.3 links unten) zeigte eine Übersteuerung von ca. 25 mg/L, wurde aber im Rahmen der Meßungenauigkeit toleriert. Grundsätzliche Probleme der on-line Messung ergaben sich durch zunehmende Schwierigkeiten bei der Langzeitstabilität des Systems (Verstopfungen der Schläuche, Aktivitätsverlust des Enzyms etc.) Die on-line Messung der Ammoniumkonzentration erfolgte über ein analoges Prinzip, jedoch ohne Glutaminasekartusche. Infolge der höheren Ammoniumkonzentration wurde zur Reduzierung des Gastransportes durch die Membran eine Dialysezelle mit geringerer Oberfläche konstruiert (50 cm<sup>2</sup>).

### 3.6 Berechnung von metabolischen Flüssen der CHO SS0/A2 Zelllinie unter Anwendung stöchiometrischer Stoffbilanzen

Für die Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen der vorliegenden Zelle wird eine metabolische Flußanalyse durchgeführt (engl. metabolic flux analysis)

#### Mathematische Basis:

Das Prinzip der Berechnung intrazellulärer Flüsse beruht auf Untersuchungen und Ansätze von Stephanopoulos und Wang<sup>[22][23][29][33][34][70]</sup>.

Angenommen, die folgenden zwei Reaktionen gehören zum Stoffwechsel einer Zelle:



Dann ergibt sich bei der Bilanzierung der einzelnen Komponente :

$$\begin{aligned}
 (-1)f_1 + (0)f_2 &= q_a \\
 (-1)f_1 + (-1)f_2 &= q_b \\
 (+1)f_1 + (-1)f_2 &= q_c \\
 (0)f_1 + (+1)f_2 &= q_d
 \end{aligned}
 \tag{3.6.2}$$

wobei  $q_i$  die extrazellulär gemessene Verbrauchs- bzw. Bildungsrate der Komponente  $i$  bedeutet und  $f$  den Fluß dieser Reaktion darstellt. (Ziffern bedeuten die stöchiometrischen Koeffizienten). Umformung in die Matrixform ergibt:

$$\begin{pmatrix} -1 & 0 \\ -1 & -1 \\ 1 & -1 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} f_1 \\ f_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} q_a \\ q_b \\ q_c \\ q_d \end{pmatrix}
 \tag{3.6.3}$$

Dabei ergeben sich mehr Reaktionsgleichungen (4) als Unbekannte (2 f Flüsse). Dieses System nennt man „überbestimmtes lineares Gleichungssystem“. Nach Gauß ist eine angenäherte Lösung derart zu bestimmen, daß der Gesamtfehler in allen Gleichungen minimal wird. Als Maß der Fehler dient die euklidische Norm, d.h.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{i=c^{em}+c^i} \left( \sum_{j=1}^{j=r} s_{ij} \cdot f_j - q_i \right)^2 = \min
 \tag{3.6.4}$$

wobei  $i$  sich auf jeder der Komponenten  $C^{em} + C^i$  bezieht, deren  $q_i$  Wert bekannt ist und Index  $j$  alle  $r$ -Reaktionsgleichungen des Netzwerks aufsummiert.

Für das obige Beispiel bedeutet das:

$$\chi^2 = (-f_1 - q_a)^2 + (-f_1 - f_2 - q_b)^2 + (f_1 - f_2 - q_c)^2 + (f_2 - q_d)^2 = \min
 \tag{3.6.5}$$

Aus der Analysis ist bekannt, daß die 1. Ableitung (der Gradient) an dieser Stelle verschwinden muß, d.h.:

$$\frac{\partial \chi^2}{\partial f_1} = -2(-f_1 - q_a) - 2(-f_1 - f_2 - q_b) + 2(f_1 - f_2 - q_c) = 0
 \tag{3.6.6}$$

und:

$$\frac{\partial \chi^2}{\partial f_2} = -2(-f_1 - f_2 - q_b) - 2(f_1 - f_2 - q_c) + 2(f_2 - q_d) = 0
 \tag{3.6.7}$$

und als Lösung des Systems: 
$$f_1 = \frac{q_c - q_a - q_b}{3} \tag{3.6.8}$$

$$f_2 = \frac{q_d - q_b - q_c}{3} \quad \text{Gl. (3.6.9)}$$

Allgemein gilt für  $f_i$  Flüssen:

$$\frac{\partial \chi^2}{\partial f_i} = \frac{\partial}{\partial f_i} \sum_{i=0}^N (f_1 \cdot s_i + \dots + f_n \cdot s_i^n - q_i)^2 = 0 \quad \text{Gl. (3.6.10)}$$

$$= \sum_{i=0}^N 2(f_1 \cdot s_i + \dots + f_n \cdot s_i^n - q_i) \cdot s_i^{f_i} = 0 \quad \text{Gl. (3.6.11)}$$

$f_i = 1, 2, 3 \dots n =$  Anzahl der zu berechnenden Flüsse,  $N =$  Anzahl der Komponenten

Es ergeben sich also  $n$  lineare Gleichungen für  $n$  unbekannte Flüsse ( $f_i$ )

wobei  $s_i$  der jeweilige stöchiometrische Koeffizient der Komponente  $i = N$  in Reaktion  $f_i$  bedeutet. Dieser ist natürlich null, wenn die Komponente in der Reaktion nicht beteiligt ist, positiv wenn er produziert wird, negativ wenn er verbraucht wird.

Dieses System nennt sich System der Gaußschen Normalgleichungen:

$$G \cdot \vec{a} = \vec{b} \quad \text{Gl. (3.6.12)}$$

$G = S^T \cdot S$  wobei  $S^T =$  die transponierte Matrix von  $S$  bedeutet

Grundsätzlich gilt für die Berechnung der intrazellulären Flüsse:

$$S \cdot \vec{f} = \vec{q} \quad \text{Gl. (3.6.13)}$$

$S =$  Matrix der stöchiometrischen Koeffizienten der relevanten Reaktionen im Energie- und Biosynthesestoffwechsel

$f =$  Vektor der intrazellulären Flüsse (die eigentlich gesuchte Größe)

$q =$  Vektor der produzierten bzw. verbrauchten Menge einer Komponente

Die Matrix  $S$  besteht aus  $R$  Reihen (Anzahl der Reaktionen) und  $C$  Spalten (Anzahl der Komponenten). Dabei kann eine Unterteilung der Komponenten als interner (*in*) Zellbestandteil sowie externer Metabolit vorgenommen werden, wobei letztgenannte Gruppe wieder in "direkt durch Messung zugänglich" (*em*) und "nicht meßbar" (*eu*) differenziert wird.

$$C = C^{ex} + C^{in} = C^{eu} + C^{em} + C^{in} \quad \text{Gl. (3.6.14)}$$



S setzt sich also aus drei unterschiedlichen Matrizen zusammen:

$$S = S^{em}, S^{eu}, S^i \quad \text{Gl. (2.6.15)}$$

wobei S die Matrix der stöchiometrische Koeffizienten ist.

Vektor q ergibt sich als Produkt der Einzelvektoren der jeweils produzierten bzw. verbrauchten Komponenten, die extern meßbar ist ( $q^{em}$ ), die nicht meßbar ist ( $q^{eu}$ ) und den internen Komponenten, die nicht meßbar sind ( $q^i$ ), aber aufgrund des vorausgesetzten pseudo-stationären Zustandes (PSS) als konstant angenommen werden.

Mit der Lösung dieses Systems über die Gaußschen Normalgleichungen ergibt sich :

$$G \cdot \bar{f} = S^T \cdot S \cdot \bar{f} = S^T \cdot \bar{q} = \bar{b} \quad \text{Gl. (3.6.16)}$$

$$(S^{em} \cdot S^i)^T \cdot (S^{em} \cdot S^i) \cdot \bar{f} = (q^{em} \cdot q^i) \cdot (S^{em} \cdot S^i)^T \quad \text{Gl. (3.6.17)}$$

(Index T= transponierte Matrix).

Des weiteren muß berücksichtigt werden, daß weniger als R (Gesamtanzahl der Reaktionen) linear unabhängige Gleichungen vorhanden sind. Bei 3 Reaktionen  $R_1, R_2, R_3$ , wobei  $R_3 = \alpha \cdot R_1 + \beta \cdot R_2$  ergibt sich:

$$\begin{bmatrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{bmatrix} \cdot \begin{pmatrix} R_1 & R_2 & R_3 \end{pmatrix} \cdot f = \begin{pmatrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{pmatrix} \cdot q \quad \text{Gl. (3.6.18)}$$

(vergl. Gl. 3.6.1 ff.). Und als Lösung:

$$\begin{pmatrix} R_1^2 & R_1 \cdot R_2 & \alpha R_1^2 + \beta R_2 R_1 \\ R_2 \cdot R_1 & R_2^2 & \alpha R_1 R_2 + \beta R_2^2 \\ \alpha R_1^2 + \beta R_2^2 & \alpha R_1 R_2 + \beta R_2^2 & \alpha^2 R_1^2 + \beta^2 R_2^2 + 2\alpha\beta R_1 \cdot R_2 \end{pmatrix} \cdot f = \begin{pmatrix} R_1 \cdot q \\ R_2 \cdot q \\ \alpha R_1 \cdot q + \beta \cdot R_2 \cdot q \end{pmatrix} \quad \text{Gl. (3.6.19)}$$

Um dieses Gleichungssystem zu lösen, muß eine weitere Bedingung eingeführt werden, welche vorsieht, daß der Flußvektor f minimal wird. Aus biologischer Sicht bedeutet dies, daß die Summe aller Flüsse zusammen ein Minimum ergeben, welches für die Zelle den minimalen Aufwand bedeutet.

Es gilt daher weiterhin :

$$|f|^2 = \sum_{j=1}^{J=N} f_j^2 + \sum_{d=N+1}^{d=R} f_d^2 = \min \quad \text{Gl. (3.6.20)}$$

wobei  $f_j^2$  die Anzahl der linear unabhängigen und  $f_d^2$  die Anzahl der linear abhängigen Flüsse bedeutet. Die numerische Lösung beider Kriterien

$$\frac{\partial \chi^2}{\partial f_k} \text{ und } \frac{\partial |f|^2}{\partial f_k} = \text{Minimum} \quad \text{Gl. (3.6.21)}$$

wurde über die SVD Prozedur durchgeführt (singular value decomposition) und ist ausführlich bei Press et al. beschrieben<sup>[71]</sup>.

Aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen der Verbrauchsraten, und dementsprechend der Flüsse, ist eine Normierung der Reaktionen vorzunehmen. Diese verhindert, daß die Lösung der least-square-Prozedur nicht nur den quantitativ höherwertigen Flüssen genügt, was eine Verfälschung der kleineren Flüsse wie z.B. DNA- oder RNA-Synthese bewirken würde.

Die hier verwendeten Wichtungsfaktoren sind:

$w_i = 100/q_i^i$ , wenn  $q_i$  ist ungleich null, oder  $w_i = 10^4$ , wenn  $q_i$  gleich null<sup>[36]</sup>. Dies bedeutet, daß kleine Abweichungen von der PSS-Annahme bestraft werden.

Durch mit Einbeziehung der Wichtungsfaktoren erweitert sich der Lösungsansatz der Matrix zu:

$$W \cdot S^T \cdot \vec{f} = W \cdot \vec{q} \quad \text{Gl. (3.6.22)}$$

wobei W als diagonale Wichtungsmatrix definiert ist.

Das Reaktionsnetzwerk wurde basierend auf einem Hybridoma Netzwerk von Paredes et. al.<sup>[36][72][73]</sup> weiterentwickelt.

### **3.7 NMR spektroskopische Methoden**

Für die Bestimmung des Markierungsgrades des untersuchten Laktats wurde der Überstand von den Zellen abzentrifugiert. Um zu testen, ob Störsignale durch Anwesenheit markierter Proteine die Messung beeinflussen, wurde der Überstand in zwei Fraktionen aufgeteilt, von denen die eine nativ, die andere nach Proteinfällung durch 25 % Perchlorsäure (Merck) lyophilisiert wurde. Beide Proben wurden zur Messung in einer 33 % enthaltenden D<sub>2</sub>O Lösung wieder aufgenommen. Die Messung erfolgte in einem 400 MHz Spektrometer (Bruker AM-400). Die Aufnahmen wurden bei 20°C mit einer 5 mm Sonde durchgeführt. Um volle Relaxation der Kerne zu gewährleisten, wurde eine Verzögerungszeitzeit von 300 s zwischen den Pulsen eingehalten. Jedes Spektrum wurde mit 180 Pulsen aufgenommen. Zur Vermeidung des-NO Effektes wurde die Integration des <sup>13</sup>C- Spektrums mittels der „inverse-gate-decoupling“ Methode bei 300 s durchgeführt.

### 3.8 Wachstumskinetik

Nach dem Animpfen einer Kultur durchläuft diese zunächst eine Verzögerungsphase, die sogenannte Lag- oder Adaptionphase. Danach erhöht sich die Wachstumsgeschwindigkeit allmählich. Schließlich wachsen die Zellen mit einer konstanten maximalen Geschwindigkeit. Diese Phase wird als exponentielle Wachstumsphase bezeichnet. Sie kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$R_X = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Gl. (3.8.1)}$$

$R_X$  = Wachstumsgeschwindigkeit;  $X$  = Zelldichte;  $\mu$  = spezifische Wachstumskonstante

Die Integration ergibt folgende Gleichung:

$$X_v = X_{v0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad \text{Gl. (3.8.2)}$$

Der Abfall der Wachstumsgeschwindigkeit und im ungünstigen Fall der Wachstumsstillstand aufgrund des Mangels an Substrat kann als Beziehung zwischen  $\mu$  und der Restkonzentration an begrenzendem Substrat beschrieben werden. Das begrenzende Substrat ist der Bestandteil des Mediums, der als erster vollständig verstoffwechselt wurde. Monod bewies 1942 folgenden Zusammenhang:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad \text{Gl. (3.8.3)}$$

$S$  = Restkonzentration an begrenzendem Substrat;  $K_S$  = Monodkonstante (Verwertungs- oder Substratsättigungskonstante)

Die Monodkonstante gleicht der Substratkonzentration, wenn  $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$  ist. Der Zahlenwert von  $K_S$  ist ein Maß für die Affinität des Organismus zum primären Substrat. Ein hoher  $K_S$ -Wert weist auf eine geringe, ein niedriger auf eine hohe Affinität zum Substrat hin.

Die Wachstumskinetik läßt sich nun durch Einsetzen von Gl. (3.8.3) in (3.8.1) beschreiben:

$$R_X = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S} \right) \cdot X \quad \text{Gl. (3.8.4)}$$

### 3.9 Spezifische Verbrauchs- und Bildungsraten

Für die Berechnung der spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten im diskontinuierlichen Verfahren wurden experimentell ermittelte und berechnete Werte „least square gefittet“. Diese Methode beruht auf einem Iterationsverfahren, das Fehlerquadrate zwischen experimentellen und berechneten Meßpunkten minimiert. Die errechnete Substratkonzentration ist eine Funktion der spezifischen Verbrauchsrate  $q$ , die im gewählten Zeitraum ebenso als konstant angesehen wird, wie die Wachstumsrate  $\mu$ .

$$\frac{d[S_i]}{dt} = q_{si} \cdot 10^{-3} \cdot X_v \quad \text{Gl. (3.9.1)}$$

die Lösung dieser Gleichung ergibt:

$$[S_i] = [S]_0 + \frac{q_S \cdot 10^{-3} X_{V0}}{\mu} \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1) \quad \text{Gl. (3.9.2)}$$

Ein positiver Wert für  $q_s$  bedeutet Produktion, ein negativer Wert Verstoffwechslung der Komponente. Analog dazu ergibt sich für die spezifische Verbrauchsrate von Glutamin, unter der Berücksichtigung, daß neben der zellulären Verstoffwechslung simultan eine thermische Zerfallsreaktion stattfindet:

$$\frac{d[Gln]}{dt} = -k_d \cdot [Gln] - q_{si} \cdot 10^{-3} \cdot X_v \quad \text{Gl. (3.9.3)}$$

und als Lösung :

$$[Gln] = [Gln]_0 \cdot e^{-(k_d t)} + \frac{q_{gln} \cdot 10^{-3} X_{V0}}{\mu + k_d} \cdot (e^{(\mu t)} - e^{-(k_d t)}) \quad \text{Gl. (3.9.4)}$$

Für die Ammoniumkonzentration ergibt sich aufgrund der Summe aus Zellabbauprodukt und thermischem Zerfallsprodukt :

$$\frac{d[NH_4^+]}{dt} = -k_d \cdot [Gln] + q_{NH_4^+} \cdot 10^{-3} \cdot X_v \quad \text{Gl. (3.9.5)}$$

sowie:

$$[NH_4^+] = [NH_4^+]_0 + (Gln_0 \cdot e^{-(k_d t)} + \frac{q_{Gln} \cdot 10^{-3} X_{V0}}{\mu + k_d} \cdot (e^{-k_d t} - 1) + (q_{[NH_4^+]} + \frac{k_d \cdot q_{Gln}}{\mu + k_d}) \cdot \frac{10^{-3} X_{V0} (e^{\mu t} - 1)}{\mu}) \quad \text{Gl. (3.9.6)}$$

Der Index 0 bezieht sich auf den Zeitpunkt  $t = 0$ ,  $k_d$  bezeichnet die Zerfallskonstante des Glutamins bei  $37^\circ\text{C}$  (experimentell für das Medium Ultra CHO:  $0,0563 \cdot \text{d}^{-1}$ ; zum Vergleich: es wurde über die HPICE Methode eine Bildungsrate von  $0,0511 \cdot \text{d}^{-1}$  für das Zerfallsprodukt 2-oxo-Pyrolidincarbonsäure berechnet).

Die spezifischen Verbrauchsrate im kontinuierlichen Verfahren (Chemostat) wurden nach folgender Formel berechnet:

Für den Gleichgewichtszustand:

$$\dot{V} \cdot ([S]_{rein} - [S]_{raus}) = q_s \cdot X_v \cdot V_R \quad \text{Gl. (3.9.7)}$$

Im Nichtgleichgewichtszustand :

$$\frac{d[S]}{dt} = q_s \cdot X_v + \frac{\dot{V}}{V_R} ([S]_{rein} - [S]_{raus}) \quad \text{Gl. (3.9.8)}$$

$\dot{V}$ : Volumenstrom;  $X_v$ : Zellkonzentration;  $V_R$ : Reaktorvolumen;  $q$ : spezifische Verbrauchsrate

### **3.10 Der Prozeßmodus der kontinuierlichen Kultivierung ohne Zellrückhaltung (Chemostat)**

Die kontinuierliche Kultur ist definiert als ein biologisches System wachsender Zellen, dem einerseits permanent frische Nährlösung zugeführt und aus dem andererseits der gleiche Volumenstrom an Kulturüberstand, einschließlich der noch vorhandenen Substrate, Produkte, Zellen usw., ständig abgezogen wird.

Die Kinetik einer kontinuierlichen Kultur kann folgendermaßen beschrieben werden:

Es handelt sich um ein offenes System. Nachdem sich die Organismen der Fließrate angepaßt haben, erreicht das System einen stationären Zustand, in dem alle Parameter konstante Werte annehmen. Man spricht von einem stationären Zustand, da die Werte der verschiedenen Parameter im Gleichgewicht lediglich von den Substratkonzentrationen im Zulauf abhängen. Wichtig bei der kontinuierlichen Kultivierung ist die Durchfluß- oder Verdünnungsrate  $d$ , die wie folgt definiert ist:

$$d = \frac{\dot{V}}{V_R} \quad \text{Gl. (3.10.1)}$$

$d$  = Verdünnungsrate ( $\text{h}^{-1}$ );  $V_R$  = Arbeitsvolumen (L);  $\dot{V}$  = Volumenstrom ( $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ )

Die zeitliche Änderung der Zellkonzentration  $X$  ist dann einerseits durch die Zunahme infolge des Wachstums, andererseits aber durch die Abnahme wegen des Erntestromes gegeben:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - d \cdot X \quad [\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad \text{Gl. (3.10.2)}$$

Im Gleichgewichtszustand wird  $dX/dt = 0$  und daraus ergibt sich  $d = \mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ]. Diese Gleichung verdeutlicht den Zusammenhang zwischen spezifischer Wachstumsrate und Verdünnungsgeschwindigkeit bei dieser Prozeßführung. Der Mechanismus, der dem Kontrolleffekt der Verdünnungsgeschwindigkeit zugrunde liegt, ist letztendlich die Beziehung (3.8.3). Im Gleichgewichtszustand ist  $d = \mu$  und deshalb folgt:

$$d = \frac{\mu_{\max} \cdot \bar{S}}{K_S + \bar{S}} \quad \text{Gl. (3.10.3)}$$

$\bar{S}$  = Restkonzentration an Substrat im Medium im Gleichgewichtszustand

Durch Umformen ergibt sich:

$$\bar{S} = \frac{K_S \cdot d}{\mu_{\max} - d} \quad \text{Gl. (3.10.4)}$$

Gleichung 3.10.4 zeigt, daß die Substratkonzentration durch die Verdünnungsrate bestimmt wird. Dies tritt bei einem Wachstum auf, bei dem das Substrat bis zu der Konzentration verbraucht wird, die die geringere Wachstumsgeschwindigkeit aufrecht erhält, die der Verdünnungsrate entspricht.

Wenn die Substratkonzentration unter diesen Wert abgesunken ist (d.h. wenn die durch die Verdünnungsgeschwindigkeit bestimmte Wachstumsgeschwindigkeit nicht mehr aufrecht erhalten werden kann), dann treten folgende Ereignisse ein:

1. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen ist niedriger als die Verdünnungsgeschwindigkeit. Damit werden die Zellen im größerem Maße aus dem Gefäß ausgewaschen, als neu gebildet (Auswaschpunkt), was zu einer Verringerung der Biomasse führt.
2. Die Substratkonzentration im Gefäß steigt an, da eine geringere Zellkonzentration einen geringeren Umsatz bedeutet.
3. Die erhöhte Substratkonzentration führt dazu, daß die Zellen schneller wachsen, als das Medium verdünnt wird. Dadurch vergrößert sich die Biomasse.

Die Konzentration an Zellen in einem Chemostaten wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\bar{X} = \theta \cdot (S_R - \bar{S}) \quad \text{Gl. (3.10.5)}$$

$\bar{X}$  = Konzentration an Zellen im Gleichgewicht;  $\theta$  = Ausbeutekoeffizient in Bezug auf das limitierende Substrat (Maß für die Effektivität, mit der die Zellen das Substrat in Biomasse umwandeln);  $S_R$  = Ausgangskonzentration des Substrats im Medium;

Durch Kombination von Gleichung 3.10.5 und 3.10.4 ergibt sich:

$$\bar{X} = \theta \cdot \left( S_R - \frac{K_S \cdot d}{\mu_{\max} - d} \right) \quad \text{Gl. (3.10.6)}$$

Somit ist die Konzentration der Biomasse im Gleichgewicht durch die Betriebsvariablen  $S_R$  und  $d$  bestimmt.

Die kritische Verdünnungsgeschwindigkeit, bei der  $\bar{X}$  gleich Null wird (das ist, wenn alle Zellen aus dem Gefäß herausgewaschen sind) und  $\bar{S} = S_R$ , wird durch folgende Gleichung charakterisiert:

$$d_{krit} = \frac{\mu_{\max} \cdot S_R}{K_S + S_R} \quad \text{Gl. (3.10.7)}$$

$d_{krit}$  oder in diesem Sinne  $d_{opti}$  (optimale Verdünnungsrate) ist immer etwas niedriger als  $\mu_{\max}$ , der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit bei optimalen Nährstoffbedingungen, da  $\mu_{\max}$  in einem einfachen Chemostaten nicht erreicht werden kann, weil immer Bedingungen herrschen, unter denen eine Substratkonzentration begrenzend ist.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### ***4.1 Berechnung von metabolischen Flüssen einer CHO-Zelllinie unter zu Hilfenahme von Stoffbilanzen***

Die genauere Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen tierischer Zellen wird mittels der metabolischen Flußanalyse (engl.: metabolic-flux-analysis) ermöglicht.

Um makroskopische Auswirkungen einer Zellkultur, und damit sind Größen gemeint, die physikalisch meßbar sind (z.B. Produktion von Metabolite), mikroskopisch interpretieren zu können, ist die Betrachtung der Zelle als Mikroreaktor sinnvoll. Dazu müssen Stoffwechselfvorgänge der speziellen Zelllinie studiert werden, was eine intensive bibliograpische Suche voraussetzt. Mit diesen Informationen und dem genauen Wissen über das Verhalten der Zelllinie "in vitro", kann ein Netzwerk der wichtigsten Stoffwechselreaktionen der Zelllinie erstellt werden, wobei lediglich die Stöchiometrie der Reaktionsgleichungen für die Berechnungen eine Rolle spielt. Der Einfachheit halber wurde in diesem Ansatz auf die Einbeziehung der Kinetik der Reaktionen verzichtet.

Es zeigte sich, daß durch ein einfaches stöchiometrisches Modell eine Berechnung der wesentlichen Flüsse im Zellstoffwechsel durchaus möglich ist, sofern genügend Meßdaten der wichtigsten Komponenten vorliegen. Damit sind vor allem die Primärmetabolite Glukose, Laktat, Ammonium sowie alle essentiellen Aminosäuren gemeint. Ferner war die Bestimmung der Zellzahl unabdinglich, da ein Teil der Reaktionen im Metabolismus für die Vermehrung der Biomasse benötigt werden d.h. für die Produktion von DNA, RNA, Proteine, Lipide etc..

Die Bildung von neuem Zellmaterial wurde ebenfalls als Produkt des Stoffwechsels betrachtet.

Da das Netzwerk mehr Reaktionen als meßbare Größen enthält, war es notwendig verschiedene Annahmen vorzusetzen:

Die Konzentration aller intrazellulären Metabolite wie organische Säuren, Proteine, Zucker, Lipide etc. wird als konstant angesehen, sofern sie nicht als Zellmaterial aus der Zellteilung hervorgeht. In diesem Fall werden diese Komponenten als Teil der neu produzierten Biomasse angesehen. Der Anteil der jeweiligen Komponenten entspricht den Literaturwerten durchschnittlicher tierischer Zellen (Creighton et al.)<sup>[74]</sup>: 59,3 % Proteine, 16,5 % Lipide, 6,6 % Polysaccharide, 3,6 % RNA, 0,8 % DNA. Die restlichen 13,2 % sind anorganische Salze und kleinere Metabolite.



Der Vergleich zwischen experimentell ermittelten Verbrauchs- und Bildungsraten und den berechneten intrazellulären Flüssen muß entscheiden, ob oder in wieweit diese Lösung sinnvoll ist. Beispielsweise wurden experimentelle Verbrauchsraten für  $q_{\text{Thr}}$ ,  $q_{\text{Tyr}}$  und  $q_{\text{Phe}}$  berechnet, die nicht den Bedarf für die Biosynthese der Proteine deckte. Aufgrund der höchst aufwendigen Bestimmung der Proteinzusammensetzung mußten Daten aus der Literatur verwendet (Daten nicht gezeigt), obwohl bekannt ist, daß der Proteingehalt der Zelle von der Mediumzusammensetzung, d.h. Art und Konzentration der supplementierten Proteine bzw. Aminosäuren abhängig ist. Dies führte zu einigen Unstimmigkeiten zwischen experimentell ermittelten und vom Modell postulierten Werten. Bei der Berechnung der intrazellulären Flüsse wurde daher durch die Wichtung der einzelnen Komponenten sichergestellt, daß auch quantitativ untergeordnete Flüsse nicht vernachlässigt werden. Dennoch zeigten diese Tatsachen recht beeindruckend, welche Annahmen mit einer gewissen Vorsicht zu treffen sind.

Häufig liegt das Problem jedoch in der Zusammenstellung eines sinnvollen Reaktionsnetzwerks und die Suche nach ergänzenden Reaktionen, bzw. das Ausschließen bereits vorhandener Reaktionen ist vorzunehmen. Insbesondere die Kompartimentierung der Zelle und die damit notwendigen Transportsysteme führen zu einem komplizierten Netzwerk der Reaktionen.

### ***4.1.1 Methodisches Vorgehen zur Bestimmung der metabolischen Flüsse einer CHO-Zelllinie***

#### **4.1.1.1 Bestimmung des für die Berechnung relevanten Wachstumsintervalls**

Zur Bestimmung der spezifischen Verbrauchsraten wurden experimentelle Daten einer Batch Kultivierung verwendet, d.h. unter nicht chemisch gleichbleibenden Bedingungen. Durch die Bestimmung eines definierten Wachstumsintervall ist es möglich einen quasi stationären Zustand anzunehmen, in dem ein Fließgleichgewicht der intrazellulären Metabolite untereinander besteht; bei Überschuß wird der Metabolit ausgeschleust und ist extern meßbar.

Sinnvollerweise wählt man dazu die exponentielle Wachstumsphase der Kultivierung, da sie neben den oben erwähnten Gründen die einzige Phase ist, in der sich die Zellen ohne Limitierung eines Nährstoffes befinden. Für das Reaktionsnetzwerk bedeutet dies, daß in diesem Zeitintervall die Hauptabbauwege des Stoffwechsels eingehalten werden, ohne daß es zu Nebenreaktionen kommt,

die nicht mit dem aus der Literatur bekannten Stoffwechsel in der exponentiellen Wachstumsphase in Einklang zu bringen sind.

Darunter fällt auch die Adaptionsphase der Zellen. Sicherlich werden hier Reaktionen verstärkt für die Synthese des Enzymapparates Glykolyse und Citratcyklus ermöglicht, infolge eines nicht vorhandenen Wachstums ist diese Phase für die Berechnung der intrazellulären Flüsse nicht relevant.

Eine Beurteilung des Wachstumsintervalls wurde unter Berücksichtigung folgender Parameter durchgeführt: Lebend- und Totzellzahl, Konzentrationsverläufe von Glukose, Laktat und Glutamin.

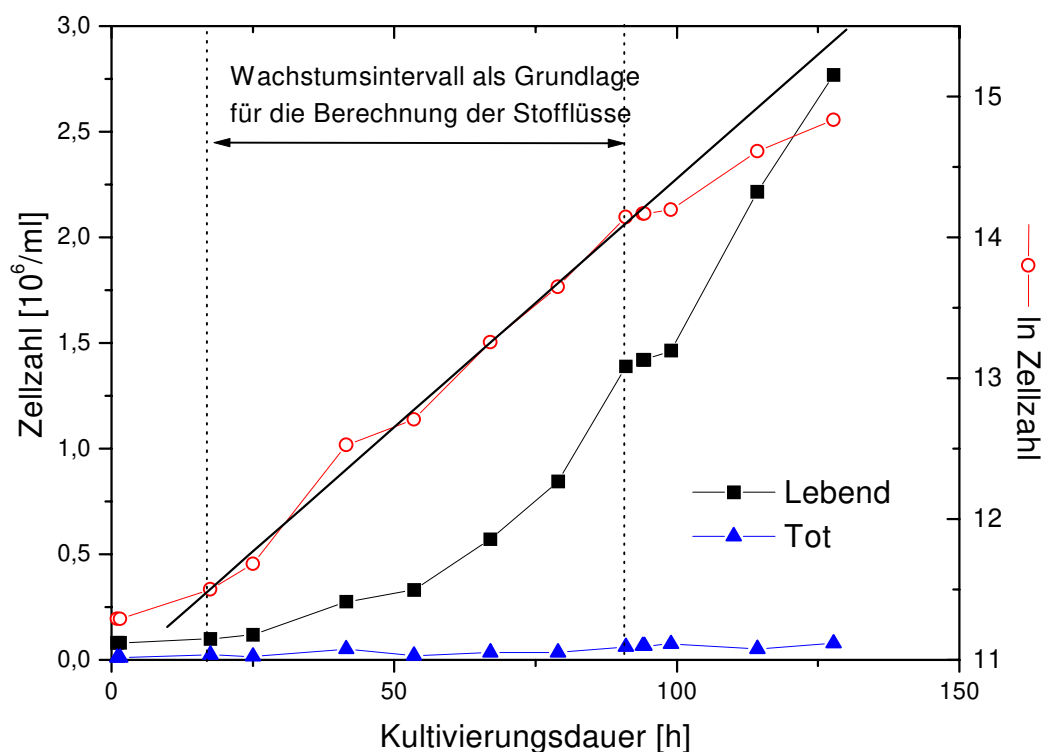


Abbildung 4.1.a: Zellkonzentrationen einer CHO-Zelllinie bei standardisierten Umgebungsbedingungen (37°C, 80 RPM, 40% pO<sub>2</sub>)

Ausgehend von einer Animpfdichte von  $10^5 \text{ Ze/ml}$  beobachtet man nach einer 24-stündigen Adaptionsphase ein exponentielles Wachstum der Kultivierung bis zur 90. Std., in der eine Zellkonzentration von  $1,38 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  erreicht wird, was eine ver-14-fachung der Anfangspopulation bedeutet. Bis zur 129. Std. kann eine weitere Verdopplung beobachtet werden. Die logarithmische Auftragung der Zellzahl zeigt jedoch, daß ab diesem Zeitpunkt keine konstante Wachstumsrate mehr vorliegt, d.h. es kommt zu eine negative Abweichung des erwarteten linearen Zusammenhang.

Der Grund für diese Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit liegt im Primärstoffwechsel begründet.

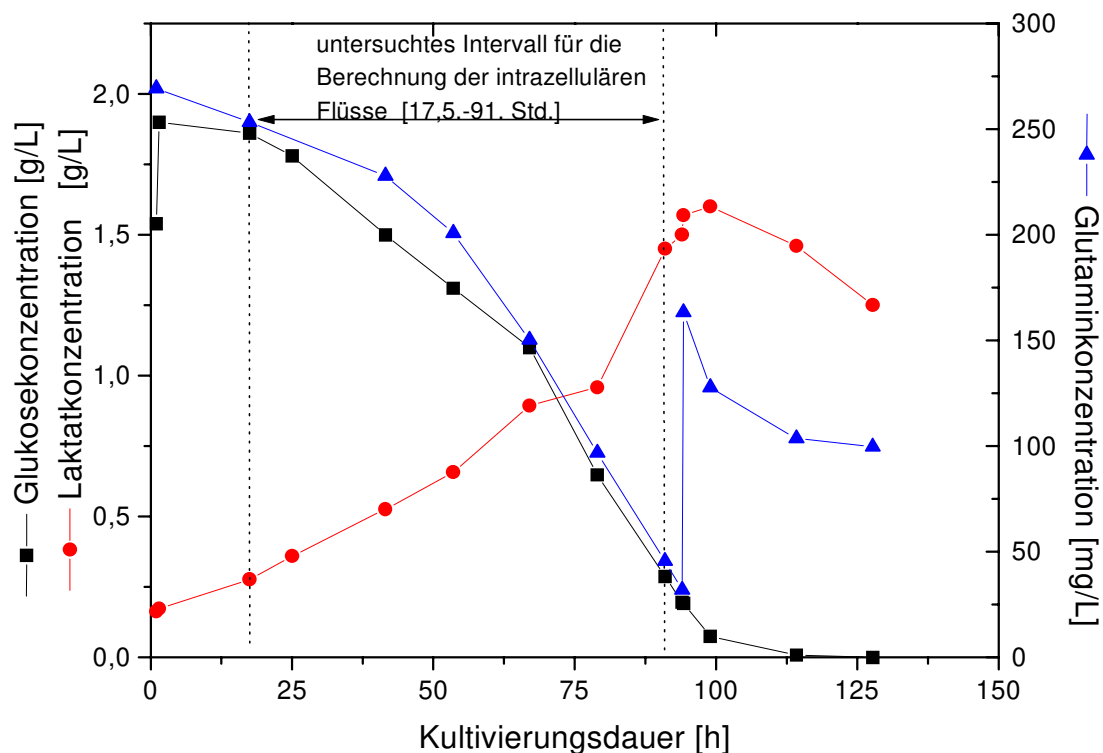


Abbildung 4.1.b: Darstellung der Konzentrationsverläufe der primären Substrate Glutamin, Glukose sowie des Abbauproduktes Laktat.

Die Verstoffwechslung der Glukose erfolgt analog zum exponentiellem Wachstum. Die Laktatproduktion verläuft synchron dazu. Ab der 100. Std., d.h. nach der vollständigen Verstoffwechslung der Glukose, verändert sich die Stoffwechsellage: Die Zellen remobilisieren das zuvor ausgeschleuste Laktat. Auf diese Tatsache soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden, sie wird aber in Kapitel 4.7 ausführlich diskutiert.

Dieser Tatbestand verdeutlicht aber, daß das Wachstum unter Glukoseverbrauch schneller verläuft als unter Laktatverbrauch. Die Differenzierung dieser Phasen muß unbedingt eingehalten werden.

Ein Blick auf den Verlauf der Aminosäure Glutamin suggeriert schon, daß diese in der 94. Std. nachgefüttert wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt fällt sie ebenfalls exponentiell ab, was im Einklang mit der wachsenden Biomasse steht.

Es sei vorweggenommen, daß der Laktatverbrauch eng mit dem Vorhandensein dieser Aminosäure verknüpft ist. Als Berechnungsgrundlage der intrazellulären Flüsse dienen die Daten der oben dargestellten Kultivierung zwischen der 17,5. und 91. Stunde.

#### 4.1.1.2 Berechnung der Wachstumsrate, sowie der spezifischen Verbrauchs- bzw. Bildungsraten der extrazellulär gemessenen Komponenten.

##### 4.1.1.2.1 Wachstumsrate

Über die least-square-Methode berechnete sich im betreffendem Zeitintervall eine konstante Wachstumsrate von  $0,88 \cdot d^{-1}$ .

##### 4.1.1.2.2 Berechnung der spezifischen Raten

Die spezifischen Verbrauchs-, bzw. Bildungsraten von allen Aminosäuren, Glukose, Laktat, Ammonium, Phosphat und organischen Säuren wurden ebenfalls über die least square Methode errechnet und sind in Tabelle 4.1.1.a zusammengefaßt:

Komponente	q [nmol/10 <sup>6</sup> Ze·h]	Komponente	q [nmol/10 <sup>6</sup> Ze·h]
Glukose	-240,23	Glutamat	-2,6
Laktat	339,446	Glycin	4,93
Glutamin	-41,65	Histidin	-1,05
Ammonium	95	Isoleucin	-7,73
DNA	0,11	Leucin	-8,95
RNA	0,45	Lysin	-11,55
Lipide	2,89	Methionin	-1,68
Proteine	62	Phenylalanin	-1,52
Zucker	4,91	Serin	-9,83
Alanin	15,51	Threonin	-2,97
Arginin	-6,07	Tyrosin	-1,83
Asparagin	-10,14	Valin	-6,17
Aspartat	-7,06	Cystein	-5,963
Prolin	-2,98	Phosphat	10,81
Pyruvat	12,42	Citrat	4,68

Tabelle 4.1.a: Durch least-square-Prozedur ermittelte zellspezifische Verbrauchs- und Bildungsraten, der durch Messung zugänglichen Metabolite.

Grundsätzlich zeigte sich bei genauerer Betrachtung der Laktatausbeute, daß entgegen dem Verhalten andere Zelllinien<sup>[36][48]</sup> der Umsatz von Glukose zum Stoffwechselendprodukt Laktat nur zu 71 % erfolgte. Diesbezüglich muß der Durchsatz im Citratcyklus der untersuchten CHO Zelllinie von größerem Ausmaß sein als bei anderen Zelllinien, da der Rest des Pyruvats, der nicht zu Laktat reduziert wird, im Citratcyklus zu CO<sub>2</sub> und Wasser oxidiert wird.

## **4.2 Massenbilanzen**

Bevor überhaupt eine Lösung des Netzwerkes angestrebt werden konnte, mußte eine Bilanzierung aller relevanten Metabolite vorgenommen werden. Dazu wurden Kohlenstoff-, Stickstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffbilanzen berechnet, um eine Berücksichtigung aller Substanzen sicherzustellen. Insbesondere die Stickstoff- und Kohlenstoffbilanzen müssen erfüllt sein, da anderenfalls die Berechnung der Flüsse irrelevant ist. Zusätzlich wurden auch die Phosphor- und Schwefelbilanz integriert, die aber aufgrund der geringen Mengen kaum ins Gewicht fielen.

Eine genaue Elementarbilanz war anfangs insbesondere im Fall von Kohlenstoff nicht möglich, so daß auf die Existenz von weiteren fehlenden Metaboliten geschlossen werden mußte. Aber auch in der Stickstoffbilanz gab es Probleme, jedoch trat hier der Fehler vermutlich durch „Stripping“ des produzierten Ammoniaks auf, da nicht mit einer Rücklaufkühlung gearbeitet wurde und der Austrag des Ammoniaks durch die Silikon Schlauchbegasung so gefördert wird.

Die Etablierung der HPICE Technik ermöglichte die Detektion verschiedener organischer Säuren, die bisher unentdeckt geblieben waren, und führte zum Ausgleich der Massenbilanz. Organische Säuren sind Zwischenprodukte des Citratzyklus, die infolge exzessiver Substratmetabolisierung als Nebenprodukt von den Zellen ausgeschieden werden können. Über die Einführung dieser zusätzlichen Daten war es möglich die Elementarbilanzen zu lösen. Diese sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Spezie	C	H	N	O	P	S	FW	q	Spezie
Ala	3,0	7,0	1,0	2,0	0	0	89,0	15,51	Ala
Arg	6,0	14,0	4,0	2,0	0	0	174,0	-6,07	Arg
Asn	4,0	8,0	2,0	3,0	0	0	132,0	-10,14	Asn
Asp	4,0	7,0	1,0	4,0	0	0	133,0	-7,06	Asp
CO <sub>2</sub>	1,0	0	0	2,0	0	0	44,0	497,00	CO <sub>2</sub>
Cys	3,0	7,0	1,0	2,0	0	1,0	121,0	-2,17	Cys
Glc	6,0	12,0	,0	6,0	0	0	180,0	-240,23	Glc
Gln	5,0	10,0	2,0	3,0	0	0	146,0	-41,65	Gln
Glu	5,0	9,0	1,0	4,0	0	0	147,0	-2,60	Glu
Gly	2,0	5,0	1,0	2,0	0	0	75,0	4,93	Gly
His	6,0	9,0	3,0	2,0	0	0	155,0	-1,05	His
Ile	6,0	13,0	1,0	2,0	0	0	131,0	-7,73	Ile
Leu	6,0	13,0	1,0	2,0	0	0	131,0	-8,95	Leu
Lys	6,0	14,0	2,0	2,0	0	0	146,0	-11,55	Lys
Met	5,0	11,0	1,0	2,0	0	1,0	149,0	-1,68	Met
NH <sub>3</sub>	0	3,0	1,0	0	0	0	17,0	95,00	NH <sub>3</sub>
O <sub>2</sub>	0	0	0	2,0	0	0	32,0	-461,14	O <sub>2</sub>
Phe	9,0	11,0	1,0	2,0	0	0	165,0	-1,52	Phe
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0	3,0	0	4,0	1,0	0	98,0	-3,45	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Pro	5,0	9,0	1,0	2,0	0	0	115,0	-2,98	Pro
Ser	3,0	7,0	1,0	3,0	0	0	105,0	-9,83	Ser
Thr	4,0	9,0	1,0	3,0	0	0	119,0	-2,97	Thr
Trp	11,0	12,0	2,0	2,0	0	0	204,0	-0,68	Trp
Harnstoff	1,0	4,0	2,0	1,0	0	0	60,0	3,09	Harnstoff
(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	0	0	0	3,0	0	1,0	80,0	-1,00	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>
(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	0	0	0	3,0	0	2,0	112,0	1,00	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>
Tyr	9,0	11,0	1,0	3,0	0	0	181,0	-1,83	Tyr
Val	5,0	11,0	1,0	2,0	0	0	117,0	-6,17	Val
H <sub>2</sub> O	,0	2,0	0	1,0	0	0	18,0	376,72	H <sub>2</sub> O
Laktat	3,0	6,0	0	3,0	0	0	90,0	339,40	Laktat
Proteine	4,77	9,60	1,35	2,47	0	0,050	126,86	62,00	Proteine
DNA	9,80	25,60	3,70	10,10	1,0	0	387,60	0,11	DNA
RNA	9,49	21,81	3,77	9,91	1,0	0	378,06	0,45	RNA
Lipide	39,0	80,0	1,0	9,0	1,0	0	737,0	2,89	Lipide
Zucker	6,0	12,0	0	6,0	0	0	180,0	4,91	Zucker
Citrat	6,0	8,0	0	7,0	0	0	192,0	4,68	Citrat
Pyruvat	3,0	4,0	0	3,0	0	0	88,0	12,42	Pyruvat
Spezie	C	H	N	O	P	S	FW		Spezie
Summen-Produkt	0,065	-0,007	-0,648	0,6	-0,001	0,248			Summen-Produkt

Tabelle 4.2.a: Massenbilanz einer Batch Kultivierung: Die Anzahl der Atome eines Elements der jeweiligen Komponente wurde mit der Verbrauchs-, bzw. Bildungsrate multipliziert. Farbige unterlegte Größen stellen Komponenten dar, die nicht direkt durch Messung zugänglich sind, sich jedoch über die Bilanz indirekt errechnen lassen.

Das Summenprodukt ist in der unteren Zeile angegeben. Ein negatives Vorzeichen bedeutet definitionsgemäß, daß mehr verbraucht als produziert worden ist.

Zelluläre Bestandteile werden ebenfalls als Produkte definiert. Deren Produktionsraten können bei Kenntnis der Biotrockenmasse ( $0,36 \cdot [\text{mg}/10^6 \text{Ze}]$ ) und Zellkomposition (siehe oben) berechnet werden.

Bei der Berechnung der Massenbilanz ergibt sich weiterhin ein respiratorischer Koeffizient von 1,078, der im Rahmen der Literaturwerte anderer Zelllinien liegt. Der respiratorische Quotient ist als Verhältnis von gebildetem Kohlendioxid zu verbrauchtem Sauerstoff definiert. Bei reiner Glukoseoxidation müßte sich ein Wert von 1 ergeben ( $6 \text{ CO}_2/6 \text{ O}_2$ ). Ein Wert über eins ist möglich durch anaplerotische Auffüllung des Citratcyklus insbesondere durch die Aminosäure Glutamin.

### **4.3 Erstellung des Reaktionsnetzwerks für die CHO-SS0/A2 Zelllinie**

Die Zusammenstellung aller wichtigen Reaktionen gestaltete sich zu einer schwierigen Aufgabe. Es war kritisch zu prüfen, ob die betreffende Reaktion für die spezielle Zelllinie eine Rolle spielt. Das Rohnetzwerk konnte von dem bereits vorhandenen Netzwerk der in Kap. 3.6 erwähnten Hybridomazelllinie übernommen werden<sup>[36]</sup>. Eine Verfeinerung des Netzwerks wurde an bestimmten Stellen vorgenommen, da der Gesamtfehler der least-square-Prozedur einen relativ hohen Wert ergab.

Das hier zu Grunde liegende Netzwerk besteht aus 68 Komponenten (Gleichungen) und 52 zu berechnenden Flüssen (Unbekannte), siehe Anhang.

Im vorliegenden Fall mußten mit einer Vielzahl verschiedener Netzwerkkonfigurationen experimentiert werden, um eine akzeptable Lösung des Systems zu erreichen.

### **4.4 Stoffwechsellage und Interpretation**

Der Grund für die verminderte Laktat Bildung ist vermutlich der besser funktionierende Transport von NADH aus dem Cytoplasma der Zelle in die Mitochondrien.

Dafür ist der sogenannte "Malat-Aspartat"-Shuttle (Kap. 2.2.1) verantwortlich, der in diesem Fall aufgrund seines hohen Flusses separat betrachtet werden muß. Es ist eine Differenzierung zwischen dem Malat des Transportersystems und dem Malat des übrigen Citratcyklus zu treffen, da dies den anabolischen Reaktionen nicht zur Verfügung steht und so das Netzwerk durcheinander bringt.

Eine Separation dieser NADH/NAD-Pumpe in Form einer gesonderten Reaktion im Reaktionsnetzwerk verhalf zu deutlich besseren Ergebnissen. Der Gesamtfehler der "least-square-Prozedur" konnte durch diese Maßnahme deutlich gesenkt werden.

Aufgrund der Detektion der organischen Säure Citrat im Zellkulturüberstand mußte ein weiteres Transportsystem eingeführt werden, das Malat-Citrat-Transportsystem. Nur im Antiport mit Malat ist der Transport von Citrat durch die Mitochondrienmembran möglich.

Des Weiteren wurde der Malat- $\alpha$ Ketoglutarat-Antiporter, der sogenannte „Malat Shunt“, in das Netzwerksystem integriert. Erst die Implementierung aller Transportsysteme führte zu einer sinnvollen Lösung der stöchiometrischen Massenbilanz.

Das Reaktionsnetzwerk, sowie die Ergebnisse der berechneten intrazellulären Flüsse werden im folgendem Kapitel vorgestellt.

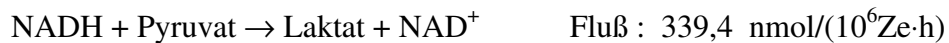
#### 4.4.1 Kataboler und anaboler Stoffwechsel

Die Berechnung der Flüsse ergab, daß ausgehend von einer Glukoseaufnahmerate von 240 [nmol/(10<sup>6</sup>Ze·h)], nur 143[nmol/(10<sup>6</sup>Ze·h)] in den Citratcyklus fließen, jedoch ca. 340[nmol/(10<sup>6</sup>Ze·h)] in die Sackgasse des Laktats, welches die Zelle unter den anfallenden Mengen nicht verwerten kann und ausschleust, und sich dann als toxischer Metabolit anreichert.

Dahingehend fließen nur ca. 16 [nmol/(10<sup>6</sup>Ze·h)] durch den Pentosephosphatweg, über dem die Vorstufen der RNA- und DNA-Bausteine synthetisiert werden. Dies entspricht ca. 6,55% des gesamten glykolytischen Flusses und liegt im Rahmen der Literaturwerte, die zwischen 0,7-11% angegeben werden. Andererseits berichteten Bonarius et al.<sup>[14]</sup> einen Fluß von ca. 95 % durch den PPP kultivierter Hybridomazellen, und begründeten diese Beobachtung mit dem hohen NADPH Bedarf der Biosynthese bei Zellen mit hoher Wachstumsrate. Demnach ermöglicht nur der oxidative Zweig des PPP die Synthese adäquater Mengen NADPH<sup>[24][75]</sup>. Dies muß allerdings bezweifeln werden, denn nach Berechnung solcher Mengen zu Verfügung stehendem NADPH müßte die Zelle deutlich schneller wachsen, als die angegebene Wachstumsrate von 0,83·d<sup>-1</sup>. Andererseits scheint dieses Problem eng mit der Hypothese einer aktiven Transhydrogenase zusammen zu hängen, die für diese Zelle postuliert wurde. Hier scheint ein unnötig hohes NADPH/NADH Verhältnis generiert zu werden. Im diesem hier vorgestellten Modell wird keine Interkonversion zwischen den Reduktionsäquivalenten NADPH und NADH postuliert, da keine eindeutiger Beweis für die Aktivität der Transhydrogenase vorliegt.



Der immens hohe glykolytische Fluß, dessen Durchsatz nur durch die fehlerhafte Regulation des Glukosetransportes in die Zelle erklärt werden kann, hebt sich quantitativ von allen anderen katabolen Flüssen ab. Als Beweis für die wenig wirksame Regulation kann die Verwertung zum anaeroben Stoffwechselendprodukt Laktat herangezogen werden. Die Beobachtung einer 71 %igen (zum Teil sogar bis 90 % bei anderen Zelllinien oder unter anderen Bedingungen) Verwertung in diese Sackgasse des Stoffwechsel, ist für die Zelle die schnellste Möglichkeit gewaltige Mengen Coenzym NADH, die bei der heftigen Glykolyse anfallen, zu reduzieren.



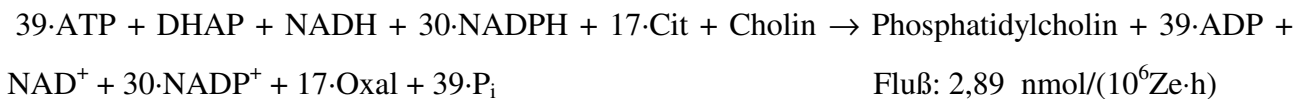
Unter physiologisch regulierten Bedingungen „in vivo“ geschieht dies in Verbindung mit der Atmungskette. Bei transformierten Zellen, was für diese CHO Zelllinie zutrifft, scheinen diese Regulationsmechanismen wenig effizient zu sein. Dennoch, das Transportsystem für cytoplasmatisches NADH in die Mitochondrien scheint, hinsichtlich der reduzierten Laktatausbeute von 71%, deutlich besser zu funktionieren als bei anderen Zellen „in vitro“.

Des weiteren kann ein hoher anaplerotischer bei  $\alpha$ -Ketoglutarat einmündender Fluß berechnet werden. Dieser ist eindeutig durch die Glutaminolyse gegeben. Glutamin gilt von jeher als Energiequelle kultivierter Zellen<sup>[76][77][78]</sup>. Im vorliegenden Fall kann der Durchsatz durch den Citratcyklus insgesamt als äußerst rege eingestuft werden. In vielen anderen Untersuchungen, (Bonarius et al., Coleman et al.)<sup>[14][79]</sup> wurde ein geringfügiger Fluß von Citrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat postuliert (3-15% des glykolytischen Flusses), da der Austrag von Citrat zur Biosynthese den Zyklus an C6-Körpern beraubt. Demgegenüber kann hier ein Fluß von 25 % berechnet werden. Der Fluß von Acetyl-CoA beträgt sogar 173,5 [nmol/(10<sup>6</sup>Ze·h)], das sind molar 36% (Bonarius: 6-16%) des glykolytischen Flusses. Der Austrag von Citrat für Biosynthesezwecke wird durch den anaplerotischen Fluß der Glutaminolyse kompensiert. Die Glutamatdehydrogenase ermöglicht den Transport in die Mitochondrien an dieser Stelle und bekräftigt eindeutig die Aktivität dieses Enzyms. Dahingegen berichten Bonarius et al.<sup>[14]</sup>, daß sämtliches Glutamin dort über Transaminierungsreaktionen in den Citratzyklus gelangt, was hier aufgrund der geringen Alaninproduktion und der nicht vorhandenen Hydroxyprolinproduktion ausgeschlossen wird.

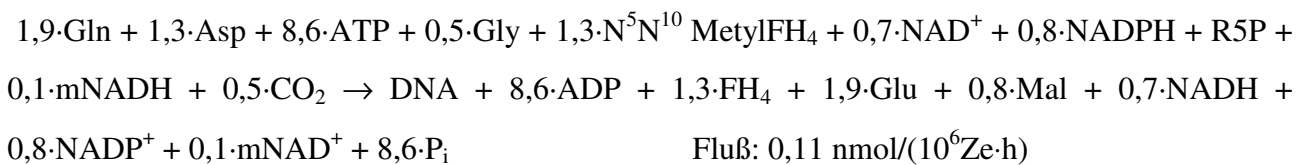


Die Komplexität des Netzwerks ist durch die Vielzahl der zum Teil ineinandergreifenden Reaktionen bedingt. Nicht angegeben ist der Fluß der Proteinbiosynthese, für dessen Bedarf der Anteil der jeweiligen Aminosäuren schon abgezogen wurde. Das gleiche gilt für die DNA-, RNA- und Lipidsynthese.

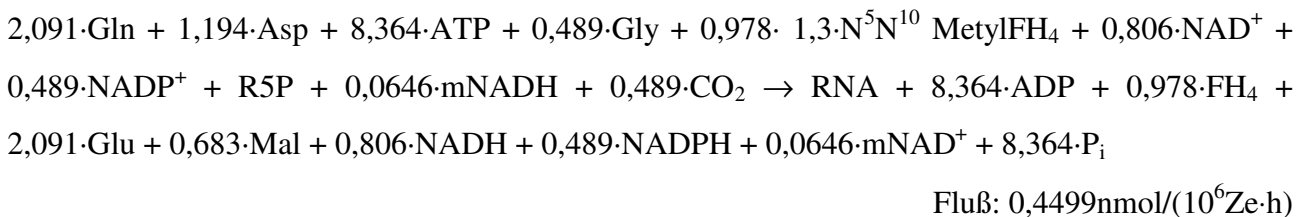
#### 4.4.2 Lipidsynthese



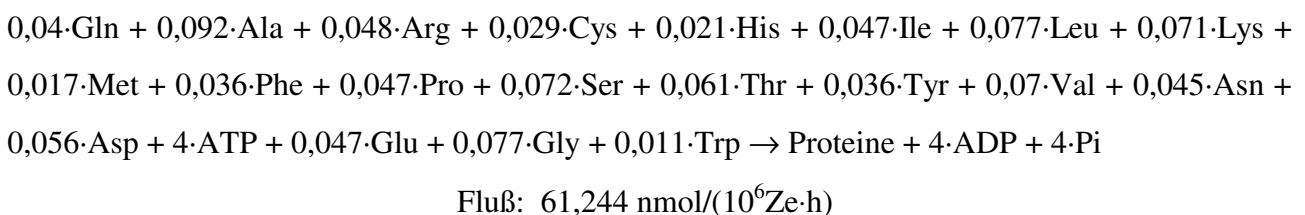
#### 4.4.3 DNA Synthese



#### 4.4.4 RNA Synthese



#### 4.4.5 Proteinbiosynthese



Bei diesen Gleichungen handelt es sich um Nettobilanzen zum Aufbau von einem Mol des Makromoleküls. Deutlich wird, daß nur der Fluß der Proteinbiosynthese quantitativ in der Größenordnung kataboler Stoffwechselwege wie Glykolyse und Citratcyclus liegt, demgegenüber die Lipid-, DNA- und RNA-Synthese quantitativ von untergeordneter Bedeutung sind.

#### 4.4.6 Transportsysteme

Die schon erwähnte Kompartimentisierung der biochemischen Reaktionen verlangt Transportsysteme. Im Falle des Malat-Aspartat-Shuttle bedeutet dies, daß eine bestimmte Menge der am Zyklus beteiligten Metabolite Malat, Aspartat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Glutamat und Oxalacetat nicht für andere Reaktionen zu Verfügung stehen. Insbesondere Malat scheint einen entscheidenden Knotenpunkt im Intermediärstoffwechsel zwischen Cytoplasma und Mitochondrien darzustellen.

Dies belegt auch die Funktionsweise des Malat-Citrat Transporters. Eine Antiport ermöglicht das Ausschleusen von Citrat ins Cytoplasma, wo es für die Fettsäuresynthese benötigt wird. Um die Transporteigenschaften zwischen Cytoplasma und Mitochondrien aufrecht zu erhalten, muß Malat über einen Dicarboxylat-Transporter gegen anorganisches Phosphat ausgetauscht werden.

Das aus der Fettsäuresynthese stammende Oxalacetat wird über die cytosolische Malatdehydrogenase reduziert und überschüssiges Malat über den Malat- $\alpha$ -Ketoglutarat Transporter (Malat-Shunt) zu Pyruvat abgebaut. Malat wurde bei der Analyse des Zellkulturüberstand im Gegensatz zu Citrat, Succinat und Pyruvat nicht detektiert, was für die Funktionalität der Malatdehydrogenase spricht, die im letzteren Fall decarboxylierend wirkt.

Zur Validierung dieses Sachverhaltes wurde ein Experiment mit isopenmarkierter Glukose durchgeführt, bei der mittels NMR-Spektroskopie eine quantitative Analyse der Stoffwechselendprodukte Aufschluß über die Richtigkeit des Modells geben kann<sup>[25]-[29]</sup>. Dieses wird im nächsten Kapitel ausführlicher behandelt.

Abschließend soll noch einmal herausgestellt werden, daß die Lösung dieser stöchiometrischen Bilanz eine mögliche von vielen Lösungen darstellt, den tatsächlichen intrazellulären Vorgängen jedoch recht nahe kommt. Erst ein Vergleich der Gesamtlösung mit dem Zellverhalten "in vitro" ermöglicht die Beurteilung, ob die Lösung Sinn ergibt, oder ob einfach das Resultat und damit das Netzwerk nicht ausreichend definiert ist. Die Lösung der Matrix muß nicht unbedingt immer einen biologischen Sinn haben, denn sie ist nur das Resultat der komplizierten Berechnung des least-square -Verfahren.

## 4.5 Validierung mittels $^{13}\text{C}$ markierter Glukose

Der Beweis für die Richtigkeit des Modells und die Hypothese der aufgestellten Reaktionen, wurde mit  $^{13}\text{C}$  markierter Glukose geführt.

Dazu wurde dem Kultivierungsmedium Glukose mit  $^{13}\text{C}$  Markierung in allen 6 Positionen entsprechend der Standardkonzentration von 1,7 g/L zugesetzt. Die Durchführung erfolgte aus Kostengründen in einem Monolayer (15ml), d.h. unter unregelmäßigen Bedingungen hinsichtlich pH und  $\text{pO}_2$ . Nachdem nach 70 Std. die eingesetzte Glukose verbraucht war, wurde das Experiment abgebrochen, der Überstand abzentrifugiert und für die Vorbereitung der NMR-Messung lyophilisiert. Es wurde sowohl ein Protonenspektrum als auch ein  $^{13}\text{C}$ -Spektrum aufgenommen, um Unterschiede im Markierungsgrad des Stoffwechselproduktes Laktat festzustellen. Bei 100 % gelabelter Glukose erwartet man ein in allen drei Positionen vollständig gelabeltes Stoffwechselprodukt Laktat, wenn dies ausschließlich aus der Glykolyse stammt. Unter Berücksichtigung der Vorhersage des Modells fließt aber ein Anteil von ca. 55nmol/(10<sup>6</sup>Ze·h) aus dem Citratcyclus über den Malat-Shunt in den Pyruvat-Pool, aus dem dann Laktat entsteht. Bei Richtigkeit des Modells muß auch ungelabeltes Laktat, das vorwiegend der starken Glutaminolyse entstammt, detektiert werden.

Dies konnte mittels der NMR Analyse bestätigt werden. Eine quantitative Unterscheidung zwischen gelabeltem und ungelabeltem Laktat konnte durch das Protonenspektrum erreicht werden. Dabei ergab sich folgendes Spektrum:

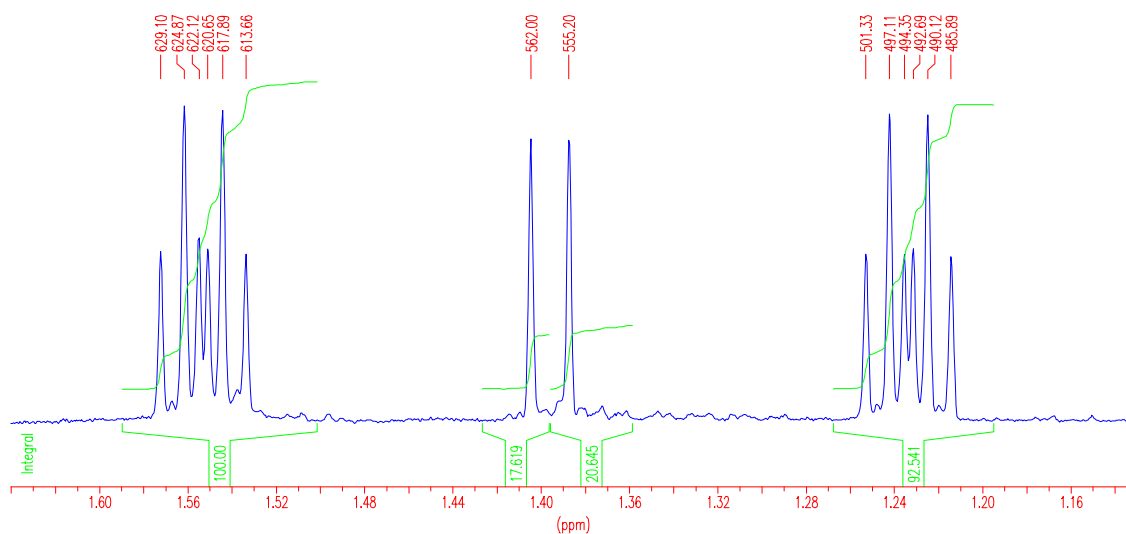


Abbildung 4.5.a: Protonenspektrum zur Unterscheidung von gelabeltem und ungelabeltem Laktat.

Das Spektrum zeigt in der Mitte ein Dublett bei 1,39 ppm, welches das ungelabelte Laktat markiert, da nur eine Kopplung zwischen Protonen der Methylgruppe und dem Proton am Hydroxyl-C-Atom möglich ist. Symmetrisch dazu sind zwei Multipletts bei 1,23 ppm und 1,55 ppm zu erkennen, die durch die C-H Kopplung des gelabelten Laktats entstehen.

Folgende Kopplungskonstanten konnten ermittelt werden:

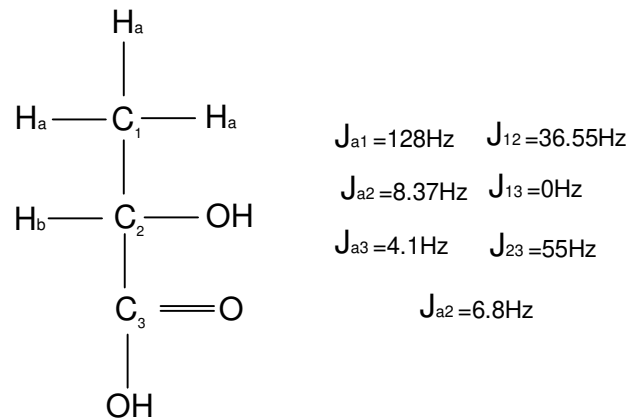


Abbildung 4.5.b Ermittlung der Kopplungskonstanten (J) des Laktat durch Auswertung über Protonen- und  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren.

Die Kopplungskonstanten entsprechen den in der Literatur bekannten Werten<sup>[80][36]</sup>. Durch Integration der Signale ergibt sich ein Verhältnis von 19,87 % ungelabeltem und 80,13 % vollständig gelabeltem Laktat.

Durch die Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums werden weitere Spezies dieser Komponente ermittelt, die vorwiegend durch Veränderung des Kohlenstoffgerüsts im Citratcyklus entstehen. Im Spektrum können die Dubletts des Carboxyl-C-Atomes bei 183 ppm, des Methyl-C-Atomes bei 21 ppm, sowie des doppelten Dubletts des Hydroxyl C-Atomes bei 68 ppm identifiziert werden. Diese Signale entstammen einem vollständig gelabeltem Laktat. Des weiteren liegen auch geringe Mengen der teilweise gelabelten Spezies vor, die zum einen als Singulett Signale oder wiederum als Dubletts auftauchen, wie das folgende  $^{13}\text{C}$ -Spektrum verdeutlichen kann.

Dieses Ergebnis ist nur im Einklang mit dem vom Modell vorhergesagtem Malat-Shunt Fluß zu bringen. Existiere dieser nicht, würde ausschließlich gelabeltes Laktat entstehen.

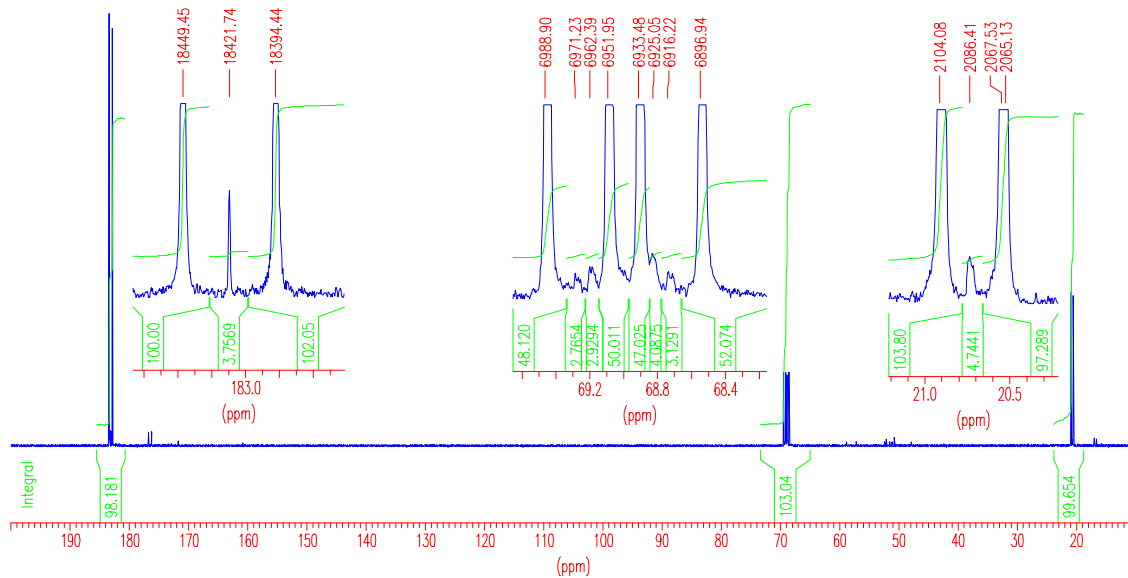


Abbildung 4.5.c: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum mit Ausschnittsvergrößerung der relevanten Signale.

Die Enzymspezifität der einzelnen Syntheseschritte führt zu einer Vielfalt von Kombinationsmöglichkeiten. Deren genaue Herleitung ist eine komplexe Angelegenheit, gibt aber aufgrund der vollständigen Markierung der Glukose keine zusätzliche Information, weswegen lediglich das Verhältnis der folgende Molekülen ermittelt werden kann.

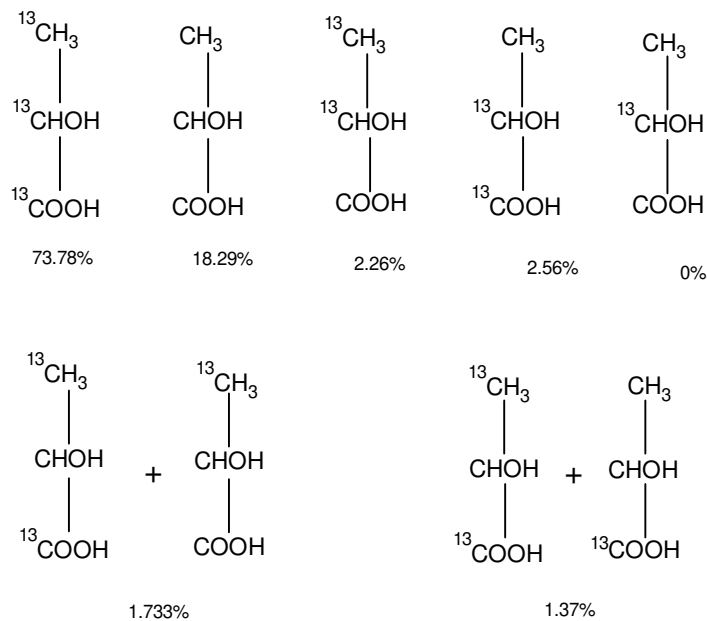


Abbildung 4.5.d: prozentualer Anteil der verschiedenen Markierungsspezies von Laktat. Die beide Paare in der unteren Zeile können aufgrund NMR spektraler Untersuchung nicht unterschieden werden.

Grundsätzlich können durch die  $^{13}\text{C}$ -Markierung der Glukose folgende Aussagen getroffen werden: Der Fluß durch den Malat Shunt ist auf jeden Fall existent, ohne diesen Reaktionsweg wäre das Vorhandensein einer ungelabelten Spezies im Abbauprodukt Laktat nicht möglich.

Die Berechnung der Flußanalyse verlangt eine Synthese von  $54 \text{ nmol}/[10^6\text{Ze}\cdot\text{h}]$  Pyruvat, die über den Austrag von Malat aus dem Citratcyklus entsteht. Über die Glykolyse fließen  $461 \text{ nmol}/[10^6\text{Ze}\cdot\text{h}]$  in den Pyruvatpool, d.h. aufgrund des Modells können maximal 11,7 % des Laktat ungelabelt sein. Es wurden aber ca. 26 % teilweise oder ungelabeltes Laktat gefunden. Berücksichtigt man die Tatsache, daß die Sauerstoffversorgung, sowie die pH-Wert-Regulierung in diesem Experiment unzureichend bzw. nicht existent war, ergibt sich durch die nicht optimalen Bedingungen folgende Erklärungsmöglichkeit: In Spinnerflaschen wurden bislang höhere spezifische Verbrauchsraten der anplerotischen Aminosäuren berechnet als unter geregelten Bedingungen, was als zusätzliche Energiegewinnung unter erhöhtem aber uneffizienteren Substratverbrauch gedeutet wird. Der Überschuß wird über einen verstärkten Fluß im Malat-Shunt aus den Citratcyklus heraus geführt, was die erhöhte Menge an nicht gelabeltem Laktat erklärt.

Grundsätzlich anders gestaltete sich die Laktatausbeute in sauerstofflimitierten Experimenten. Wird üblicherweise eine Ausbeute von 70-75 % gefunden, so ergab sich in diesem Experiment ein Ausbeutekoeffizient von ca. 0,95, was mit den Spinnerflaschen-Experimenten in Einklang zu bringen ist.

Es zeigte sich bereits an anderer Stelle, daß ein bestimmter Anteil des Laktats aus dem Glutamin, bzw. anderen Aminosäuren stammen muß (Kapitel 4.6.2), was mit dem hier vorliegenden Experiment manifestiert werden kann. Unter diesen Aspekten scheint die vollständige Oxidation im Citratcyklus in unregulierten Systemen nicht so effizient zu sein, so daß anstatt dem Abbau zu  $\text{CO}_2$  und Wasser überschüssiges Malat ausgeschleust wird.

Dennoch scheinen die Transportsysteme, speziell der Malat-Aspartat-Zyklus trotz teilweiser Limitierung der Atmungskette weiterhin gut funktionieren. Im Gegensatz dazu stellt man bei anderen Zelllinien,<sup>[36][48]</sup> deren Atmungsaktivität (oder Transportfähigkeit) gestört ist, fest, daß Glukose aus Gründen der NADH-Regenerierung hauptsächlich zu Laktat verstoffwechselt wird und keine weitere Oxidation stattfindet (Messungen ergaben nur 10% ungelabeltes Laktat).

Im vorliegenden Fall tritt aufgrund des erhaltenen Markierungsgrades weiterhin mindestens 26 % der Gesamtmenge der Glukose in den Citratcyklus ein. Bei vollständiger Oxidation dieser Menge entspräche dies ungefähr dem Lakatausbeutekoeffizient von 0,7-0,75 unter sauerstoffgeregelten Bedingungen. Dort werden durchschnittlich 70-75 % Laktat, bezogen auf die eingesetzte Glukose,



gewonnen, von denen aber bei Berücksichtigung der intrazellulären Flüsse 11,7 % aus dem Citratcyklus stammen.

#### 4.5.1 Schlußfolgerungen

Das  $^{13}\text{C}$ -Experiment konnte einen qualitativen Beweis für die Richtigkeit des Modells liefern, quantitativ zeigen sich einige Mängel, die aber durchaus mit den vom Standardzustand abweichenden experimentellen Bedingungen, unter denen der Versuch durchgeführt werden mußte, erklärt werden können.

Eine qualitative Betrachtung ist nur bei Modifizierung des Experimentes möglich. Die Durchführung ist nur unter geregelten Bedingungen im Reaktor möglich und mit immens hohen Kosten der  $^{13}\text{C}$  markierten Glukose verbunden, was aufgrund der daraus erhaltenen Informationsfülle als nicht adäquat angesehen wird.

## 4.6 Chemostatische Prozeßführung

Die Durchführung einer Chemostat-Kultur erwies sich als geeignet, um bei konstanter Durchflußrate den Einfluß eines Metaboliten zu prüfen, alle übrigen Substratbedingungen dabei aber annähernd konstant zu halten.

Die Chemostat-Kulturen mußten aus Kostengründen in 400-500 ml Reaktorvolumen enthaltendem Tecne Spinnern (physikalisch unregelter Reaktortyp) durchgeführt werden, der keine pH und  $pO_2$  Regelung gewährleistete. Die Durchflußrate wurde geringfügig unter dem Wert für die maximale Wachstumsrate eingestellt, der sich aus diversen Batch-Versuchen zu  $\mu=0,6\cdot d^{-1}$  errechnete. Um einem möglichen Auswaschen zuvor zu kommen, wurde eine Austauschrate von  $0,5-0,57\cdot d^{-1}$  eingestellt, was unter Berücksichtigung des Reaktionsvolumens zu einer täglich ausgetauschten Zellsuspension 200 bzw. 250ml resultiert (0,139 bzw. 0,174 ml/min).

Aufgrund der mechanischen Beanspruchung der Reaktorzulaufschläuche wurde der Schlauchinnenquerschnitt zusehens stärker deformiert, was sich trotz öfter nachreguliertem Anpreßdruck der Schlauchquetschbügel nicht kompensieren ließ (Volumenkonstanz  $\pm 10$  ml).

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen Medium Ultra CHO (Boehringer Ingelheim Bioproducts) wurden definierte Pulszugaben sowie verschiedene Zulaufkonzentrationen von Glukose und Glutamin eingestellt. Ultra CHO enthält standardmäßig ca. 1,8 g/L Glukose und 250 mg/L Glutamin. Die Glukoseausgangskonzentration kann als vergleichbar gering eingestuft werden, wenn man berücksichtigt, daß Standardbasalmedien wie IMDM oder DMEM mit 3-3,5 g/L Glukose supplementiert sind.

### 4.6.1 Kontinuierliche Prozeßführung mit Pulszugabe von Glutamin und Glukose

In diesem Versuch wurden definierte Pulszugaben, d.h. 1 g/L Glukose und 200 mg/L Glutamin im Abstand von 100 Std. durchgeführt. Die Einstellung der Durchflußrate erfolgte zu  $0,57\cdot d^{-1}$ . Die Antwortfunktionen der Kultivierung auf diese Substratänderung sollen im folgendem charakterisiert werden.

#### 4.6.1.1 Bestimmung der Zellzahlen

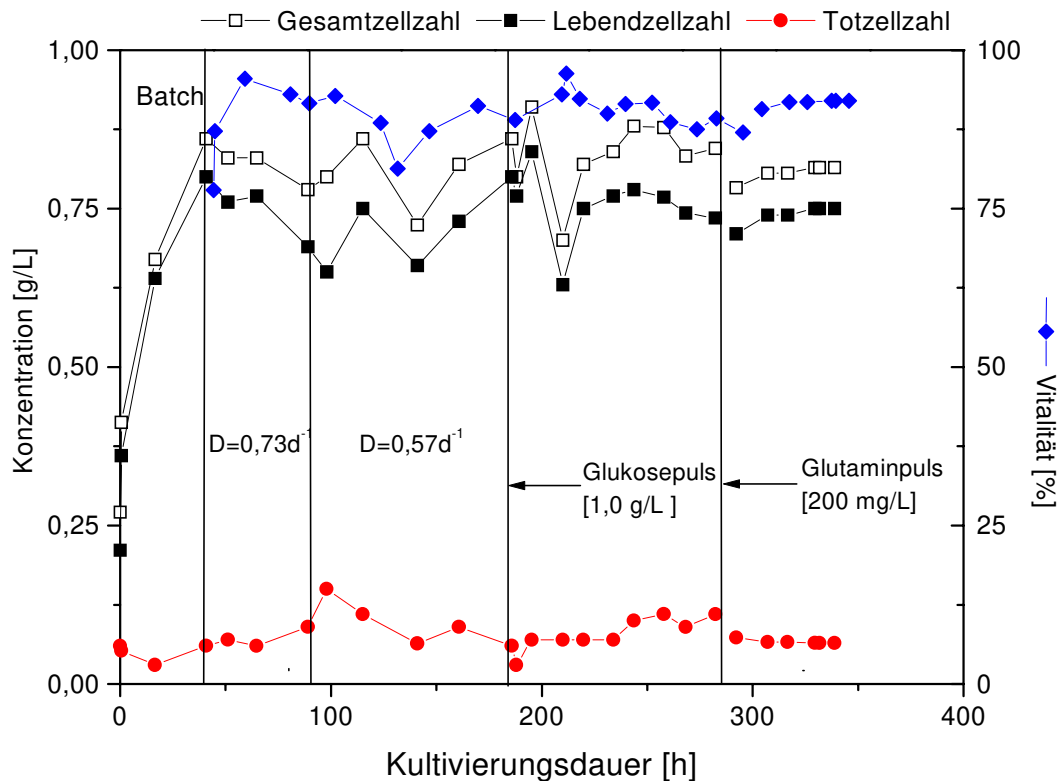


Abb.4.6.1.a: Zellzahlentwicklung in Abhängigkeit von Glukose- bzw. Glutaminpulszugabe

Ausgehend von  $0,2 \cdot 10^6$  Ze/ml steigt die Zellzahl in der Vorlauf Batch-Phase auf etwa  $0,8 \cdot 10^6$  Ze/ml an. Aus Gründen der Glukoselimitierung wurde zu Beginn der kontinuierlichen Phase eine Steigerung der Durchflußrate auf  $d=0,729 \cdot d^{-1}$  vorgenommen, aufgrund des daraufhin einsetzenden vermehrten Zellaustrags aber schon nach 40. Std. auf  $0,57 \cdot d^{-1}$  gesenkt. Bei dieser Durchflußrate stellte sich eine durchgehend konstante Zellzahl von  $0,7 \cdot 10^6$  Ze/ml ein. Die Zugabe des Glukose- bzw. Glutaminpulses ruft keine wesentlichen Veränderungen in den Zellzahlen hervor. Lediglich die kurzfristige Abnahme nach dem Glukosepuls deutet darauf hin, daß durch die verstärkte Laktatbildung das Wachstum kurzfristig inhibiert wird. Die Beobachtungen stehen im Einklang zu den Ergebnissen von Miller et al.<sup>[82]</sup>. Es treten zum Ende der Kultivierung relativ starke Schwankung bei der Zellzahlbestimmung auf, die durch die zunehmende Aggregatbildung insbesondere nach Zugabe des Glutaminpuls zu beobachten war. Mögliche Gründe dafür werden in Kap. 4.9 erläutert. Die Ungenauigkeit konnte durch die zusätzliche Bestimmung der Zellzahl über die Zellkernmethode reduziert werden<sup>[85]</sup>.

#### 4.6.1.2 Bestimmung der Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten

Der Einfluß der Pulszugaben auf den Zellstoffwechsel kann eindrucksvoll anhand des Verlaufes der Glukoseverstoffwechslung und Laktatproduktion verfolgt werden. Dazu wurden die spezifische Glukoseverbrauchsrate und Laktatbildungsrate berechnet. Außerdem ist der Laktatausbeutekoeffizient  $\theta_{\text{Lac/Glc}}$  angegeben.

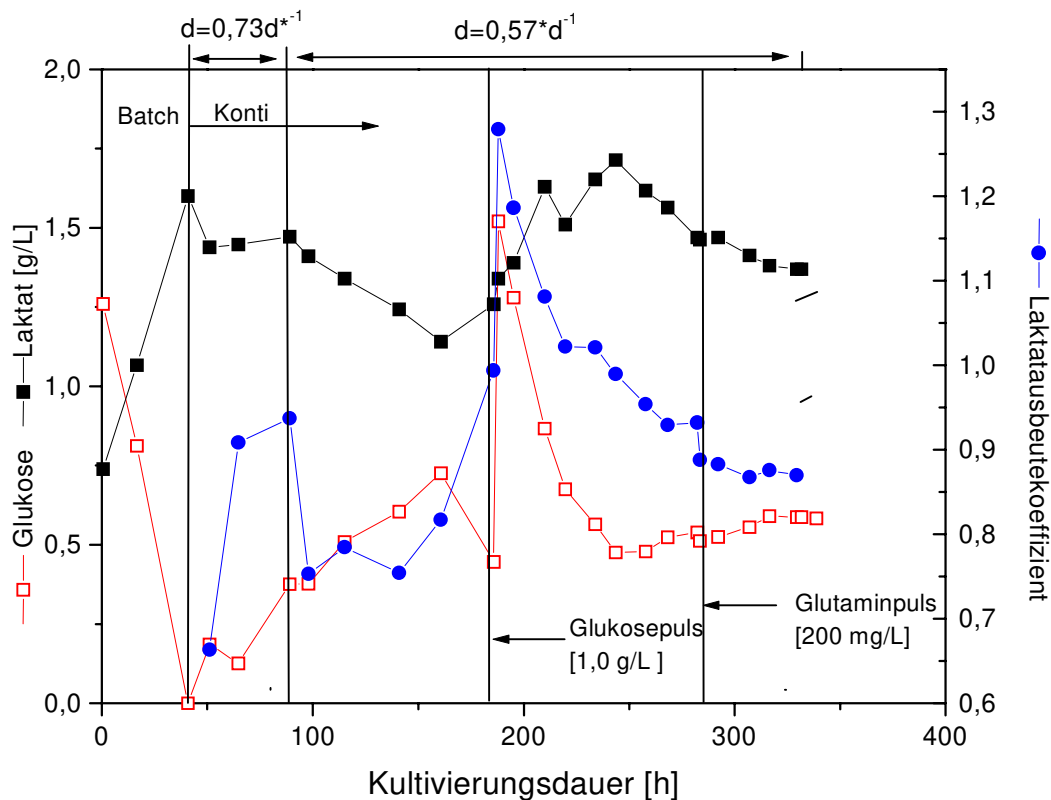


Abb.4.6.1.b: Entwicklung der Glukose- bzw. Laktatkonzentration nach Zugabe der Nährstoffpulse

Die Schwankungen der Restkonzentration von Glukose vor der Pulszugabe wurde durch die Änderung der Durchflußrate hervorgerufen. Das Absinken der Glukosekonzentration kurz vor dem Glukosepuls auf einen Wert von 0,446 g/l wird als Einstellung des Gleichgewichtswertes gedeutet. Diese Vermutung wird auch durch die Tatsache gestützt, daß sich nach dem Glukosepuls ähnliche Konzentrationswerte wieder einstellen. Jedoch konnte eine weitere Beobachtung dieser Werte nicht durchgeführt werden und eine eindeutige Beurteilung dieses Gleichgewichtswertes wäre unzulässig. Nach der Pulszugabe der Glukose in der 188. Stunde steigt die spezifische Glukoseverbrauchsrate  $q_{\text{Glc}}$  dementsprechend auf 1,82 [ $\text{mg}/(10^6 \text{Ze}/\text{d})$ ], fällt dann aber innerhalb von 56 Std. wieder auf das Vorpulsniveau von 1,21 [ $\text{mg}/(10^6 \text{Ze}/\text{d})$ ] zurück. Demgegenüber durchläuft die

Laktatproduktionsrate langsam ein Maximum von 1,43 [mg/(10<sup>6</sup>Ze/d)] und fällt zurück auf 1,25 [mg/(10<sup>6</sup>Ze/d)], was jedoch nicht dem Vorpulsniveau von 0,61 [mg/(10<sup>6</sup>Ze/d)] entspricht. Weiterhin fällt qLac auch nach der Glutaminpulszugabe, so daß vermutet wird, daß noch kein Gleichgewichtszustand erreicht ist.

Vor dem Glukosepuls wurde ein durchschnittlicher Ausbeutekoeffizient  $\theta_{\text{Lac/Glc}}$  von 0,95 berechnet. Dieser steigt nach der Pulszugabe auf Werte um 1,3, was nur mit der zusätzlichen Laktatverwertung anderer Nährstoffe, insbesondere Glutamin erklärt werden kann. Nach der Pulszugabe von Glutamin ist eine bessere Verwertung der Glukose zu beobachten,  $\theta_{\text{Lac/Glc}}$  beträgt nur noch 0,87. Hier deutet sich ein gegenläufiges Verhalten an, worauf bei den späteren Fed-Batch-Experimenten näher eingegangen werden soll (Kapitel 4.7).

#### 4.6.1.3 Beeinflussung des Aminosäurestoffwechsels

Die Abbildungen 4.6.1.c und 4.6.1.d zeigen die Konzentrationsverläufe von Glutamin, Asparagin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Die Glutaminkonzentration liegt vor dem Glukosepuls konstant bei 170 mg/l. Nach dem Glukosepuls ist im Gegensatz zu den Ergebnissen von Miller et al.<sup>[82]-[84]</sup> deutlich eine Akkumulation von Glutamin im Medium zu erkennen, denn von der 190. bis zur 280. Stunde steigt die Glutaminkonzentration von 170 g/l auf 250 mg/l an. Dies äußert sich bei der Berechnung der spezifischen Verbrauchsrate qGln. Vor dem Glukosepuls wurde ein Gleichgewichtswert von 60 [μg/10<sup>6</sup>Ze/d] berechnet, der aber nach der Pulszugabe auf etwa 25 [mg/(10<sup>6</sup>Ze/d)] abfiel. Auch die Ammoniumkonzentration in diesem Zeitintervall bestätigt die reduzierte Glutaminaufnahme, diese sank von 10 mg/L auf 8,5 mg/L. Folgende Erklärung kann diese Beobachtung deuten: Infolge der exzessiven Glukoseverstoffwechslung, die durch das Überangebot des Pulses induziert wird, ist die verstärkte Umwandlung von Pyruvat in Laktat notwendig, um große Mengen NADH, die in der schnellen Glykolyse gebildet wurden, zu NAD<sup>+</sup> zurück zu oxidieren. Demzufolge steht weniger Acetyl-CoA für den Citratcyklus zur Verfügung. Aufgrund des geringeren Stoffdurchsatzes werden die Reaktionen im Citratcyklus verlangsamt und der Bedarf an Glutamin, wie auch an weiteren anaplerotischen Aminosäuren, ist gering. Dies wird durch Komponenten im Kulturüberstand angezeigt. Dies verdeutlichen die folgenden Abbildungen:

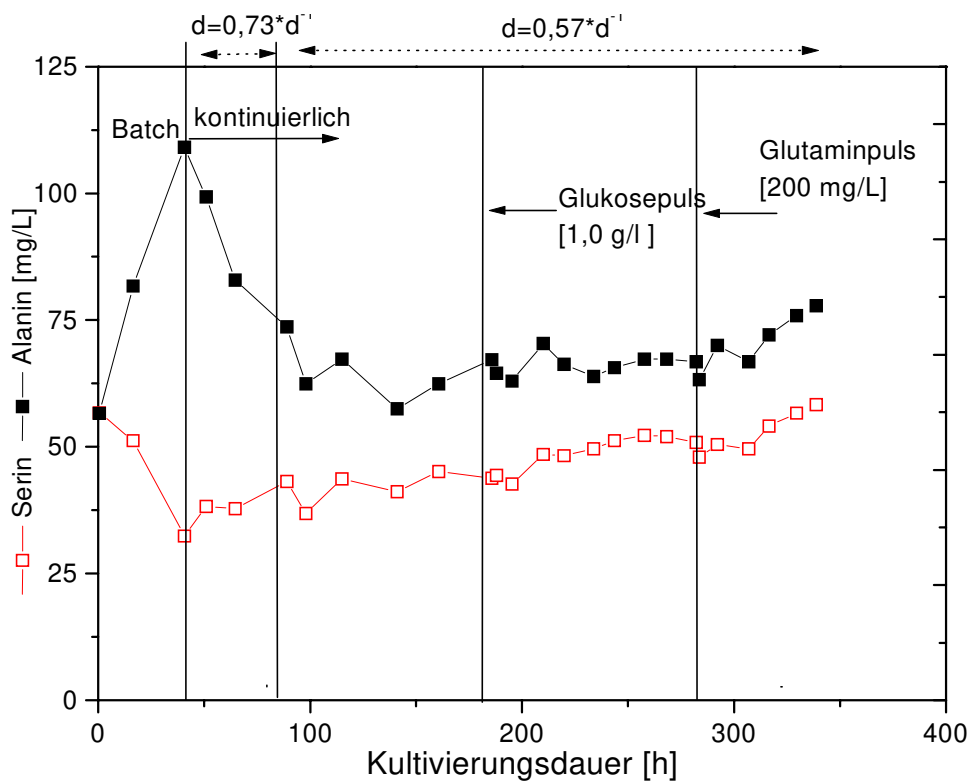
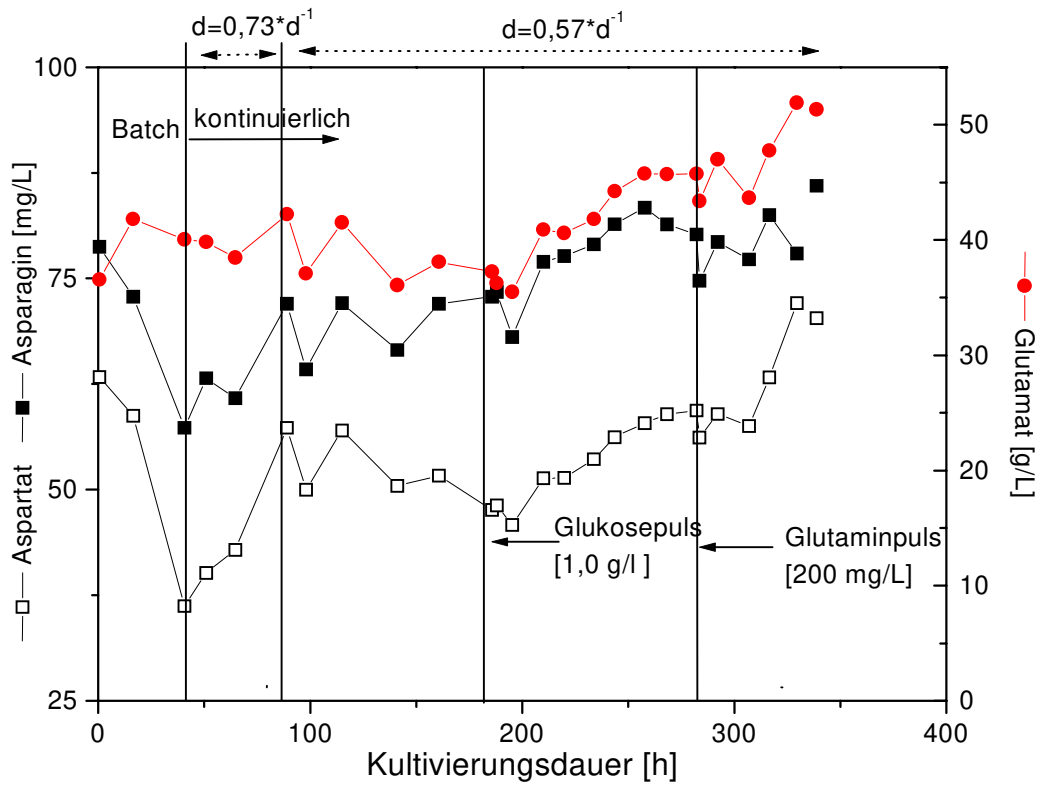


Abbildung 4.6.1.c und 4.6.1.d: Konzentrationsverläufe der anaplerotischen Aminosäuren des Citratcyclus (oben), sowie von Aminosäuren, die mit der Glykolyse in Verbindung stehen (unten).

Wie aus den Abbildungen 4.6.1.c und d erkennbar, reichern sich die Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure, und Asparagin nach der Pulszugabe von 1g/L Glukose deutlich in Kultivierungsüberstand an, was den verminderten Bedarf zu diesem Zeitpunkt indiziert. Dahingegen weisen Alanin und Serin einen konstanten Wert auf. Beide Aminosäuren werden nur indirekt vom Durchsatz im Citratcyklus beeinflusst.

Nach dem Glutaminpuls in der 284. Stunde steigt die Verbrauchsrate aufgrund des Glutaminüberangebotes wieder auf durchschnittlich  $63 \text{ } [\mu\text{g}/(10^6 \text{ Ze/d})]$  an, was etwas höher ist, als vor dem Glukosevorpulsniveau. Zu diesem Zeitpunkt hat sich auch im Glukosestoffwechsel wieder ein Gleichgewicht eingestellt. Hier jedoch hat die erhöhte Glutaminolyse bei reduzierter Glykolyse den Effekt, daß beide Stoffwechselabbauwege besser ineinander greifen. Dies wird durch die verminderte Laktatproduktion angezeigt.

Im Aminosäurestoffwechsel bewirkt der Glutaminpuls eine Anreicherung der Aminosäuren Alanin sowie Glutaminsäure. Beide Aminosäuren sind Nebenprodukte der Glutaminolyse, (Alanin als Transaminierungs-, Glutamat als Desaminierungsprodukt), was deren verstärkte Produktion erklärt<sup>[83]</sup>. Im Falle von Asparagin zeigt sich ein konstanter Verlauf, dagegen kann der steigende Verlauf von Aspartat aufgrund seines ambivalenten Charakter (Kap. 4.6.2.1.4) nur unzureichend gedeutet werden.

#### **4.6.2 Kontinuierliche Prozeßführung zur Beurteilung der tatsächlich benötigten Substratmenge**

Die Ergebnisse der vorher gegangenen Versuche zeigten keine grundsätzlich besseren Wachstumsbedingungen, d.h. Glukose-, und Glutaminpulse führten zu keiner grundlegenden Änderung in der Biomasse, bzw. der Produktkonzentration. Im Gegenteil, es war eine Verschwendung der Substrate zu beobachten, ohne daß die Biomasse positiv davon beeinflusst worden wäre. Diese Tatsache läßt die Vermutung zu, daß ein bisher unbekannter Bestandteil des Mediums inhibiert oder zu einer gegebenen Zeit erschöpft ist. Da die Analysen aller Aminosäuren, der organischen Säuren, Phosphat und Glukose keine Defizite aufweisen, wird insbesondere der Einfluß verschiedener nicht detektierter Moleküle wie Vitamine, Lipide, Fettsäuren, sowie Polypeptiden vermutet.

Eine Detektion dieser Bestandteile scheint nur unter erschwerten Bedingungen möglich, des weiteren ist die katalytischen Wirkungsweise dieser Moleküle noch nicht genau bekannt, so daß primär eine effektive Ausnutzung des Kultivierungsmediums als Ziel angestrebt wird.

Tatsächlich scheinen transformierte Zelllinien „in vitro“ aufgrund ihres unregulierbaren Stoffwechsel durch die reichhaltig supplementierten Medien im höheren Maße „überfüttert“ zu sein. Spätestens die Beobachtung der immens unökonomischen Glukoseverwertung (80-90 % Laktat) läßt Zweifel an der richtigen Fütterungsweise der Zellen zu. Die Möglichkeit einer katabolen Kontrolle, d.h. die richtige Zudosierung der Substrate ist in der Literatur durchaus beschrieben<sup>[111]</sup>-  
[113].

Aufbauend auf diese Tatsache wurde im vorliegenden Experiment versucht, durch Variation der Eingangskonzentration der beiden Hauptsubstrate Glukose und Glutamin eine optimale Ausbeute bezüglich Biomasse und Abbauprodukte zu erreichen. Aus diesem Grund wurde auch bei anfänglicher Variation der Eingangsgehalt von Glukose auf 2,25 g/L erhöht und erst dann im weiteren Verlauf des Experiments herabgesetzt. Auf eine weitere Erhöhung der Glukoseeingangskonzentration wurde verzichtet, da sich in vorangegangenen Experimenten herausstellte, daß insbesondere die Vitalität der Zellen durch die erhöhte Laktatproduktion merklich leidet.

#### **4.6.2.1 Glukosereduzierung**

##### 4.6.2.1.1 Verlauf der Biomasse bei Variation der Glukosezulaufkonzentration

Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse der Glukosereduzierung und im Anschluß die der Glutaminreduzierung diskutiert.



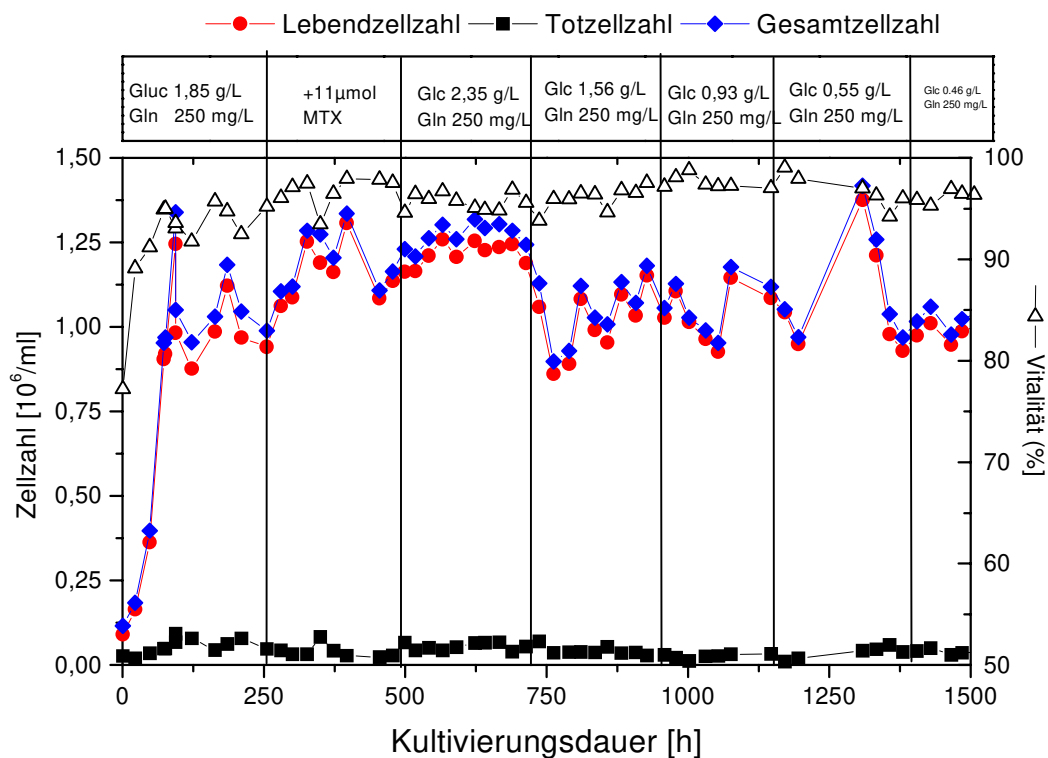


Abbildung 4.6.2.1.a: Zellzahl und Vitalität der Chemostat-Kultivierung bei Variation der Glukose im Zulaufmedium

Der Verlauf der Lebendzellzahl zeigte, dass ausgehend von einer Animpfdichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml nach 94 Std. im Batchbetrieb eine maximale Zellzahl von  $1,25 \cdot 10^6$  Ze/ml erreicht wird.

In der Batch-Phase wird  $\mu=0,605 \cdot d^{-1}$  errechnet, was im Rahmen der üblichen Wachstumsrate liegt und die Einstellung einer Verdünnungsrate von  $0,5 \cdot d^{-1}$  rechtfertigt.

Ab der 94 Std. wurde auf kontinuierliche Prozeßführung umgeschaltet. Durch die Einstellung des ersten Gleichgewichtszustandes sank die Zellzahl auf  $0,9-1,0 \cdot 10^6$  Zellen/ml, ist jedoch erwartungsgemäß einigen Schwankungen unterworfen, die auf die Ungenauigkeiten im Zulaufstrom, bzw. Ablaufstrom zurückzuführen sind. Um nachteilige Effekte durch Plasmidinstabilität auszuschließen, wurde vor Reduzierung der Glukose ein stationärer Zustand mit Kultivierungsmedium inklusive  $11 \mu\text{mol}$  Selektionsmarker Methothrexat durchlaufen. Wie Abbildung 4.6.2.1.a zeigt, konnte keine nachteilige Wachstumseigenschaft (wenn, dann wäre eine schlechtere Wachstumsgeschwindigkeit festzustellen, da nicht Plasmid transfizierte Zellen absterben). Gegenteiliges war anfangs durch eine Zunahme der Lebendzellzahl auf ca.  $1,2 \cdot 10^6$  Zellen/ml zu beobachten.

In Gegenwart von 2,35 g/L Glukose im Vorlauf wird eine weitere Erhöhung der Lebendzellzahl auf  $1,25 \cdot 10^6$  erreicht. Jedoch kann man Abbildung 4.6.2.1.a auch entnehmen, daß die Vitalität der Zellen durchaus leidet. Des weiteren wird auf die nicht vollständige Verstoffwechslung der Glukose im Reaktor hingewiesen (Abb.4.6.2.1.c), d.h. der Chemostat befindet sich nicht mehr unter glukoselimitierten Bedingungen. Eine weitere nicht detektierbare Komponente im Medium scheint limitierend zu wirken, sicherlich keine der Aminosäuren, wie Abbildung 4.6.2.1.e zeigt.

#### 4.6.2.1.2 Ausbeutekoeffizienten Biomasse/Glukose und Biomasse/Glutamin

##### 4.6.2.1.2a Ausbeutekoeffizient Biomasse/Glukose ( $\theta_{X/Gluc}$ )

Mit Tabelle 4.6.2.1.a wird ein wichtiger Aspekt aufgezeigt, der einen Verzicht auf eine weitere Erhöhung der Glukoseingangskonzentration rechtfertigt.

Der Ausbeutekoeffizient Biomasse/Glukose  $\theta_{X/Gluc}$  zeigt einen exponentiellen Abfall bei steigender Glukosekonzentration. Dieser gibt an, wieviel der umgesetzten Glukose in den molekularen Aufbau der Zelle fließt, d.h. ein Koeffizient größer als eins ist denkbar, denn Glukose ist ja nicht das einzige Substrat, welches in die Biomasse eingeht. Außerdem sind Zellkulturmedien nicht vergleichbar mit den Minimalmedien für den Einsatz in Bakterienkultivierungen, wo maximale Umsatzkoeffizienten zu 0,5 gefunden werden<sup>[110]</sup>.

Schon bei einer Eingangskonzentration von 1,85 g/L erreicht  $\theta_{X/Gluc}$  einen Wert von nur 0,214, was eine äußerst ineffektive Ausnutzung der Glukose demonstriert. Bei 2,35 g/L Glukose im Zulauf zeigt  $\theta_{X/Gluc}$  eine ähnlich schlechte Ausnutzung der Glukose (0,215). Dahingegen steigt der Ausbeutekoeffizient bei verminderter Glukoseingangskonzentration exponentiell (bei 0,46 g/L Glukose ist  $\theta_{X/Gluc} = 0,87$ ).

Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, daß  $\theta_{X/Gluc}$  nicht im Einklang mit dem Ausbeutekoeffizient  $\theta_{Glc/Lac}$  zu bringen ist. Dieser bleibt während der gesamten Kultivierungsdauer relativ konstant bei 0,9.

Damit bleibt die Frage offen, wie es bei fast 90 % iger Verwertung der Glukose zu Laktat möglich ist, eine derartige Steigerung in der Effektivität der Glukose/Biomasse Verwertung zu beobachten.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Glukose definitiv das Grundgerüst der Biomasse bildet, bleibt offensichtlich nur die Erklärung, daß ein großer Anteil der produzierten Milchsäure nicht aus der Glukose stammt. Auf diese Tatsache wurde schon in Kapitel 4.5 eingegangen.

<b>S<sub>0</sub>Gluc</b> <b>[g/L]</b>	<b>1,85</b>	<b>1,85</b> <b>+MTX</b>	<b>2,35</b>	<b>1,56</b>	<b>0,93</b>	<b>0,66</b>	<b>0,55</b>	<b>0,46</b>
<b><math>\theta_{X/Gluc}</math></b>	0,211	0,241	0,215	0,297	0,39	0,61	0,687	0,87
<b>edEr <math>\pm</math></b>	0,016	0,015	0,011	0,021	0,069	0,069	0,038	0,014

Tabelle 4.6.2.1.a: Ausbeutekoeffizienten Biomasse/Glukose bei verschiedenen Glukoseeinlaufkonzentrationen, sowie die Standardabweichung der experimentellen Meßwerte vom Durchschnittswert.

#### 4.6.2.1.2b Ausbeutekoeffizient Biomasse/Glutamin

Die Verlagerung der Glutaminbereitstellung zur Energiegewinnung zugunsten der Biosynthese schreitet als Folge der Glukosereduzierung voran, was sich in den fallenden Werten für  $\theta_{X/Gln}$  äußert (4g/g bei S<sub>0</sub> Glukose 1,8g/L → 1,85g/g, bei S<sub>0</sub> Glukose 0,46 g/L).

Dahingehend verbessert sich  $\theta_{X/Glc}$  wie schon erwähnt bei Reduzierung der Glukose im Eingangsmedium, was als effizientere Ausnutzung der Glukose bewertet werden kann.

Zum Vergleich zeigt Abbildung 4.6.2.1.b den zeitlichen Verlauf beider Umsatzkoeffizienten  $\theta_{X/Glc}$  und  $\theta_{X/Gln}$ .

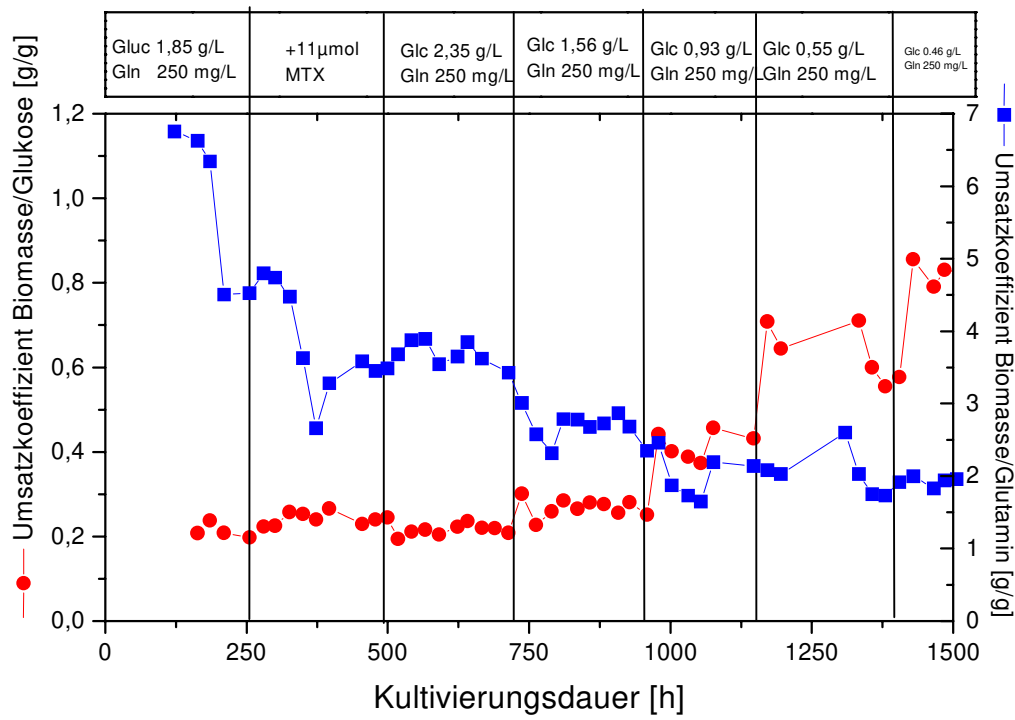


Abb. 4.6.2.1.b: Verlauf von  $\theta_{X/Glc}$  und  $\theta_{X/Gln}$  bei Variation der Eingangssubstratkonzentration

## 4.6.2.1.3 Glukoseverstoffwechselung und Laktatproduktion

In Graphik 4.6.2.1.c sind die Konzentrationen von Glukose und Laktat über die gesamte Kultivierungsdauer dargestellt. Der daraus resultierende Laktatausbeutekoeffizient wurde für alle Gleichgewichtszustände berechnet und ist in der Graphik ebenfalls aufgetragen.

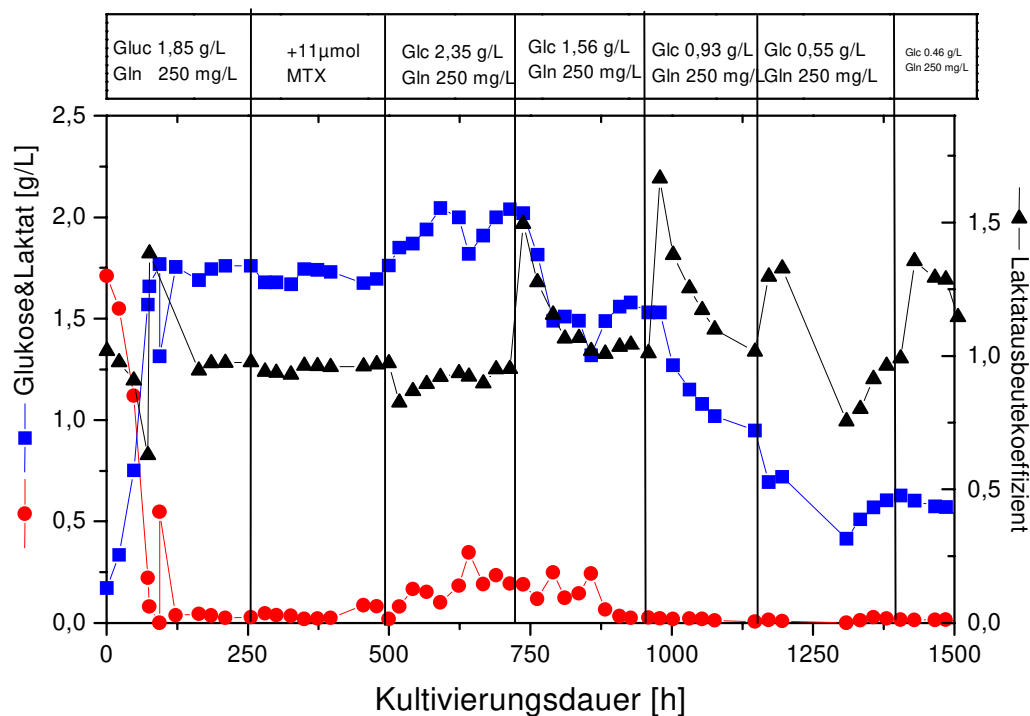


Abbildung 4.6.2.1.c: Konzentrationsverläufe von Glukose und Laktat, sowie der daraus resultierende Ausbeutekoeffizient einer 2-monatigen Chemostat-Kultivierung

Grundsätzlich wurde versucht den Chemostaten glukoselimitierend zu betreiben, was auch weitgehend gelang. Im ersten Gleichgewichtszustand betrug die Laktatkonzentration ca. 1,74 g/L, was einem Ausbeutekoeffizienten von 0,96 entspricht. Dies änderte sich auch nicht im Falle der Methotrexatbehandlung.

Im Falle der Glukoseerhöhung ab der 500 Std. sieht man aber deutlich eine verbleibende Restkonzentration von 100-250 mg/L, was darauf hindeutet, daß eine unbekannte Komponente substratlimitierend wirkt.

Die Laktatkonzentration steigt von 1,75 g/L auf ca. 2 g/L, der Laktatausbeutekoeffizient fällt kurz nach der Eingangserhöhung von 0,97 auf 0,82, erreicht aber sein Ausgangsniveau im weiteren Verlauf der Gleichgewichtseinstellung wieder.

Bei Herabsetzung der Glukosezufuhrkonzentration auf 1,54 g/L wird die Laktatproduktion zwar erwartungsgemäß auf 1,5 g/L gedrosselt, interessanterweise bemerkt man bei der Betrachtung der

Ausbeutekoeffizienten  $\theta_{\text{Glc/Lac}}$ , daß dieser nach einem zwischenzeitlichen Anstieg in der Gleichgewichtseinstellung nicht den Ausgangswert annimmt, sondern Werte um 1,05, was auf den ersten Blick als ungewöhnlich erscheint. Dies läßt sich allerdings durch den verstärkten Verbrauch der Aminosäuren, die in den Citratcyclus bei  $\alpha$ -Ketoglutarat münden (Glutamin und Glutaminsäure) erklären. Über den Malat Ausschleusungsmechanismus wird dann zusätzliches Laktat ausgeschieden, das nicht aus dem anaeroben Abbau der Glukose stammt. Einen Beweis dieser Theorie liefert der Verlauf der spezifischen Glutaminverbrauchsrate in Abb. 4.6.2.1.d.

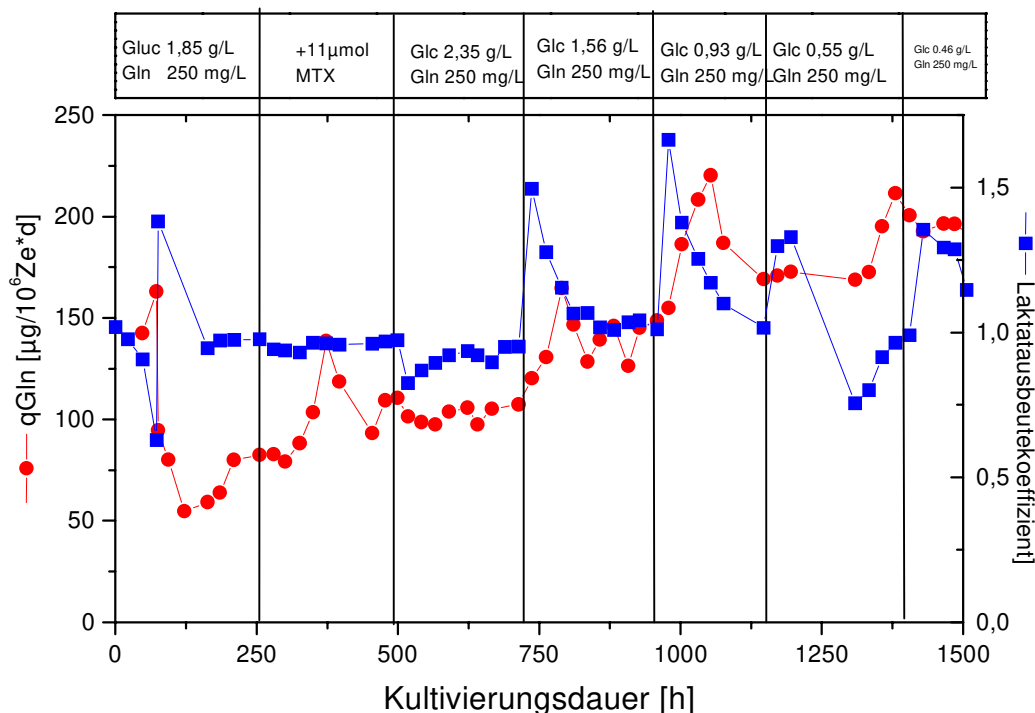


Abbildung 4.6.2.1.d: Verlauf der spezifischen Glutaminverbrauchsrate zur Verdeutlichung der vermehrten Laktatproduktion über den Malat-Weg.

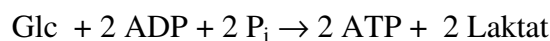
Die spezifische Glutaminverbrauchsrate zeigt recht eindeutig, daß die Reduzierung der für den Katabolismus zu Verfügung stehenden Glukose eine Veränderung hervorruft. Beträgt  $q_{\text{Gln}}$  im Ausgangszustand  $100 \text{ } [\mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}]$ , so führt die Reduzierung von Glukose im Zulauf auf  $1,55 \text{ g/L}$  zu einer Erhöhung von  $q_{\text{Gln}}$  auf ca.  $150 \text{ } [\mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}]$ . Auch der Laktatausbeutekoeffizient nimmt wie schon erwähnt einen Wert von 1,05 an. Bei der erneuten Verminderung auf  $0,96 \text{ g/L}$  Glukose im Zulauf steigt  $q_{\text{Gln}}$  weiter auf ca.  $175 \text{ } [\mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}]$  an, der Ausbeutekoeffizient liegt weiterhin oberhalb eins.

Die Glukosereduzierung auf 0,55 g/L in der 1200 Std. erzwingt eine erneute Erhöhung von qGln auf ca. 200 [ $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}$ ],  $\theta_{\text{Lac/Glc}}$  beträgt hier Werte um 1,03. Die letztendlich eingestellte Konzentration von 0,46 g/L bewirkt keine Veränderung mehr.

Auffallend ist, daß die spezifische Glutaminverstoffwechslung jeweils direkt nach der Reduzierung der Glukose deutlich zunimmt und erst im Verlaufe der Gleichgewichtseinstellung wieder auf einen konstanten Wert fällt. Vermutlich versucht die Zelle im Rahmen ihrer Möglichkeit den Energiemangel, der durch die Glukosereduzierung induziert wurde, mit einer vermehrten Glutaminaufnahme zu kompensieren.

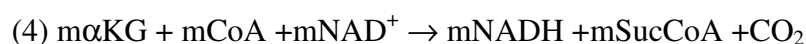
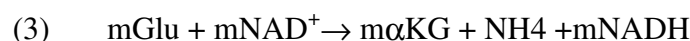
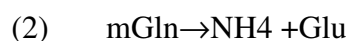
Der durchschnittliche Wert des Ausbeutekoeffizienten ( $\theta_{\text{Lac/Glc}} \approx 1$ ) zeigt, daß unter den vorherrschenden Bedingungen eine wesentlich stärkere anaerobe Glykolyse stattfinden muß, konnten doch bisherige Untersuchungen unter sauerstoffgesättigten Bedingungen zeigen, daß nur 75 % der Glukose zu Laktat verwertet wird. Folgerichtig werden 25 % der restlichen Glukose im Citratcyclus mit einer Ausbeute von 38 mol ATP/ mol Glukose umgesetzt. Diese effiziente Energieausnutzung im Zusammenspiel mit der Atmungskette ist von aeroben Bedingungen abhängig. Eine energetische Betrachtung kann an dieser Stelle nur qualitativ erfolgen, da keine genauen Daten über Laktatausbeute in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung vorliegen.

In der anaeroben Glykolyse wird der Energiebedarf durch folgende Schritte erzeugt:



In Rahmen der nicht regulierten Sauerstoffbedingungen dieser Chemostat-Kultivierung dürfte die im Citratcyclus oxidativ gewonnene Energie nicht annähernd erreicht werden. Wird nun die Glukosezufuhr bei gleichbleibendem Energiebedarf für Protein- und Biosynthese (die Lebendzellzahl bleibt konstant) verringert, müssen andere Energiequellen verfügbar gemacht werden. Dies geschieht unter Erhöhung der Glutaminverstoffwechslung.

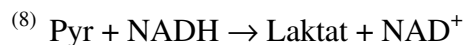
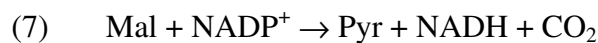
Dabei sind folgende biochemische Reaktionen beteiligt:



Beim Durchlauf dieser Reaktionen werden bis zur Bildung von Malat 9 mol ATP gewonnen.

Auf der Stufe von Malat würde als nächste Reaktion nun die Dehydrierung zum Oxalacetat erfolgen, die aber im Falle eines Acetyl-CoA Mangels (hervorgerufen durch die reduzierte Glykolyse) nur in einer Sackgasse endet.

Demzufolge wird Malat aus den Mitochondrien ausgeschleust, im Cytosol durch die nur dort vorkommende Pyruvatcarboxylase zu Pyruvat decarboxyliert und kann von dort aus, je nachdem, den Citratcyklus mit neuem Acetyl-CoA versorgen, oder weiter zum Laktat abgebaut werden. Der Citratcyklus ist in diesem Falle zweigeteilt.



Diese Theorie wurde durch  $^{13}\text{C}$ -NMR Experimente belegt (siehe Kapitel 4.5).

#### 4.6.2.1.4 Aminosäureverläufe

Die Glukosereduzierung beeinflusst nicht nur die Glutaminverstoffwechslung, sondern wirkt sich auf den gesamten Aminosäuremetabolismus aus.

S <sub>0</sub> Glukose [g/L]	Batch	2,35	1,85	1,85 +MTX	1,56	0,96	0,55	0,46
qAsp	21,28	51,21	58,35	54,27	37,7	39,6	42,7	38,4
qGln	120,12	105,5	100	112,8	138,55	177,8	208	195
qGlu	-	10,87	4,56	10,74	-4,2	-6,1	-3,89	-1,4
qAsn	18,14	28,6	34,7	33,9	34,7	46,2	47,1	42,2
qSer	22,03	27,87	41,1	30,46	32,6	48,8	50,1	48,1

Tabelle 4.6.2.1.b: Spezifische Verbrauchsraten einiger Aminosäuren bei Variation der Glukosenezulaufkonzentration, mit besonderer Betrachtung derjenigen, die in  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat münden. Dimension  $q = [\text{mg}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$ , negatives Zeichen indiziert hier eine spezifische Bildungsrate.



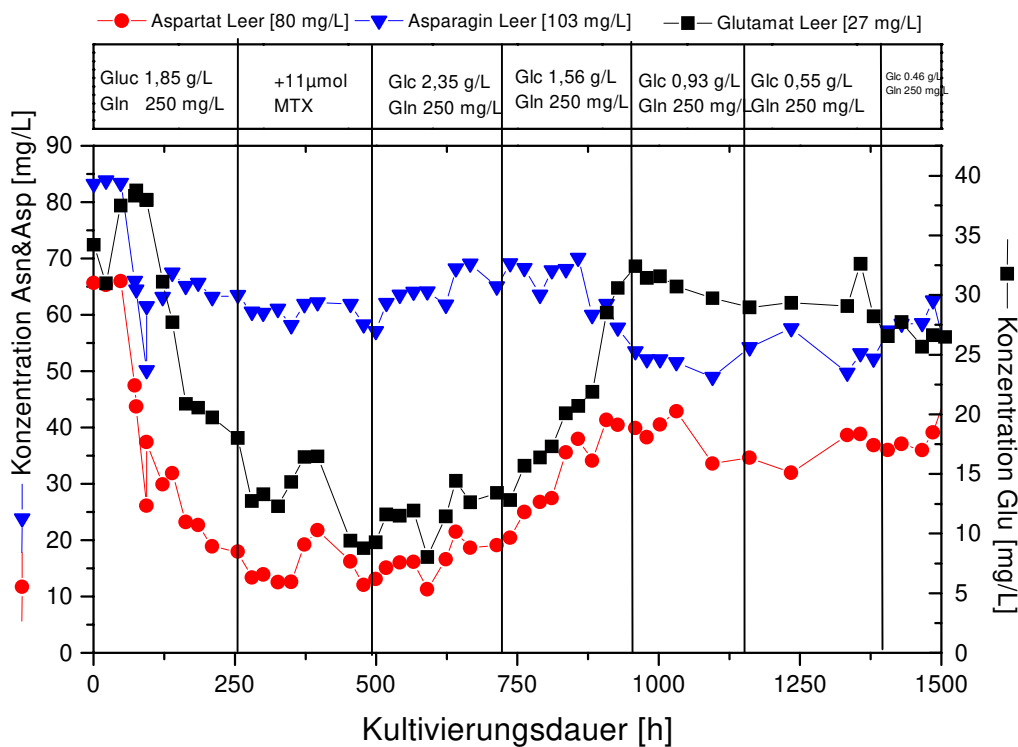
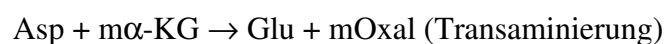


Abbildung 4.6.2.1.e: Konzentrationsverläufe verschiedener anaplerotischer Aminosäuren des Citratcyklus.

Abbildung 4.6.2.1.e zeigt den Verlauf derjenigen Aminosäuren, die den Citratcyklus bei Mangelercheinungen, d.h. auch bei Energiemangel, anaplerotisch auffüllen. Die Aminosäuren Glutamin und Glutaminsäure münden bei  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citratcyklus, dahingegen füllen Asparagin und Asparaginsäure den Zyklus bei Oxalacetat auf. Dabei müssen Glutamin, Asparagin, Asparaginsäure vorher des- bzw. transaminiert werden, um in den TCA-Zyklus zu gelangen, wie nachfolgende Gleichungen verdeutlichen:



Index m steht für mitochondrialer Metabolit.

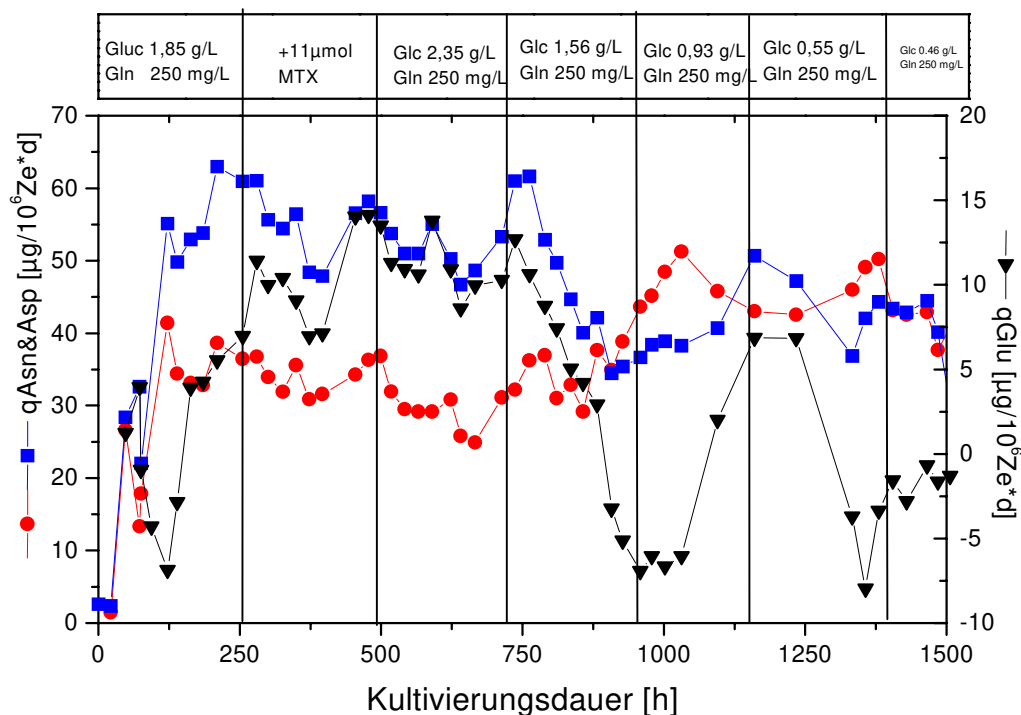


Abbildung 4.6.2.1.f: Zellspezifische Verbrauchsraten der Aminosäuren Asn, Asp, Glu und Gln.

Betrachtet man die Abbildungen 4.6.2.1.e und 4.6.2.1.f zusammen, offenbaren sich frappierende Unterschiede zwischen Batch- und kontinuierlicher Phase (ab 100. Std.), (siehe Tabelle 4.6.2.1.b).

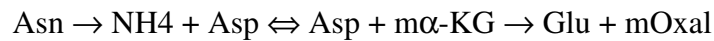
Bis zur Glukosezulaufreduzierung stellen sich folgende spezifische Verbrauchsraten ein:

Für  $q_{Asp}$  ergibt sich ein durchschnittlicher Wert von  $55 \text{ } [\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$ , für  $q_{Asn}$   $30 \text{ } [\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$ , für  $q_{Gln}$  ca.  $100 \text{ } [\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$  sowie  $10 \text{ } [\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$  für Glutamat.

Im Verlaufe der Glukosereduzierung von  $2,35 - 0,93 \text{ } [\text{g}/\text{L}]$  steigt  $q_{Gln}$  auf  $180 \text{ } [\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$ , auch  $q_{Asn}$  steigt von  $30$  auf  $48 \text{ } [\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$ , wohingegen sich die Desaminierungsprodukte der beiden Säureamide völlig anders verhalten. Aspartat wird mit ca.  $38 \text{ } [\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$  auffallend weniger verstoffwechselt, Glutamat wird mit einer spezifische Bildungsrate von  $6 \text{ } [\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}]$  sogar produziert. In den Restkonzentrationsverläufen aus Abbildung 4.6.2.1.e äußert sich dieser Verlauf durch Akkumulierung bzw. Konzentrationsabfall der jeweiligen Komponente.

Im Fall von Glutamat ist dieser Kurvenverlauf damit zu erklären, daß es durch die verstärkte Glutaminolyse und durch die Eigenschaft als Amid Akzeptor bei Transaminierungsreaktionen angereichert, und aus der Zelle ausgeschleust wird.

Aspartat befindet sich im folgenden Gleichgewicht :



Einerseits wird es durch Desaminierung von Asparagin gewonnen, andererseits mit  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat und Oxalacetat transaminiert. Dadurch, daß man noch immer eine Nettoverstoffwechsellung (d.h. Abnahme der Konzentration im Medium) beobachtet, kann dies nur bedeuten, daß die Desaminierung von Asparagin mehr Aspartat bereitstellt, und der Bedarf der Zelle, externes Aspartat einzuschleusen, erniedrigt ist. Durch die gegebene Glukosereduzierung wird die Auffüllung des Citratcyklus bei Oxalacetat sogar zurückgedrängt, da dem Zyklus weniger Acetyl-CoA zur Verfügung steht.

Des weiteren konnten auch für die Aminosäuren Cystein, Serin und Threonin erhöhte Verbrauchsraten detektiert werden.

Eine Erklärung für den Unterschied der Verbrauchsraten im Batch, bzw. kontinuierlichen Betrieb könnte die bereits in Kap. (4.5) diskutierte mangelhafte Sauerstoffversorgung der Zellen sein. Erst im kontinuierlichen Betrieb war eine Zelldichte von ca.  $1 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$  gegenwärtig, wohingegen im Batch-Vorlauf eine derartige Biomasse erst allmählich heranwachsen mußte.

Die Verbrauchsraten aller in den Citratcyklus mündenden Aminosäuren steigen nach Einsetzen des kontinuierlichen Betriebes deutlich an. Vermutlich ist die Effektivität der Energiegewinnung unter sauerstofflimitierten Bedingungen nur unter erhöhtem Stoffdurchsatz möglich.

#### 4.6.2.2 Glutaminreduzierung

##### 4.6.2.2.1 Zellkonzentration und Ausbeutekoeffizienten Biomasse/Glutamin ( $\theta_{X/Gln}$ ), sowie Biomasse/Glukose ( $\theta_{X/Glc}$ )

Im letzten Abschnitt des Chemostaten (1500.-1850. Std.) sollte bei minimaler Glukosekonzentration auch der Glutamineingangsgehalt reduziert werden. Dieser war vorher bei 250 mg/L eingestellt. Dies geschah in zwei Schritten, bei der jeweils die Konzentration halbiert wurde. (250  $\rightarrow$  125  $\rightarrow$  62,5 mg/L). Zum Schluß wurden die Bedingungen noch einmal wie im Ausgangszustand eingestellt, d.h. 1,8 g/L Glukose und 250 mg/L Glutamin, um sicherzustellen, daß nur die Substratbedingungen die Stoffwechselaktivität beeinflussen und keine Selektion eines neuen Subklones mit veränderten Stoffwechseleigenschaften vorliegt.

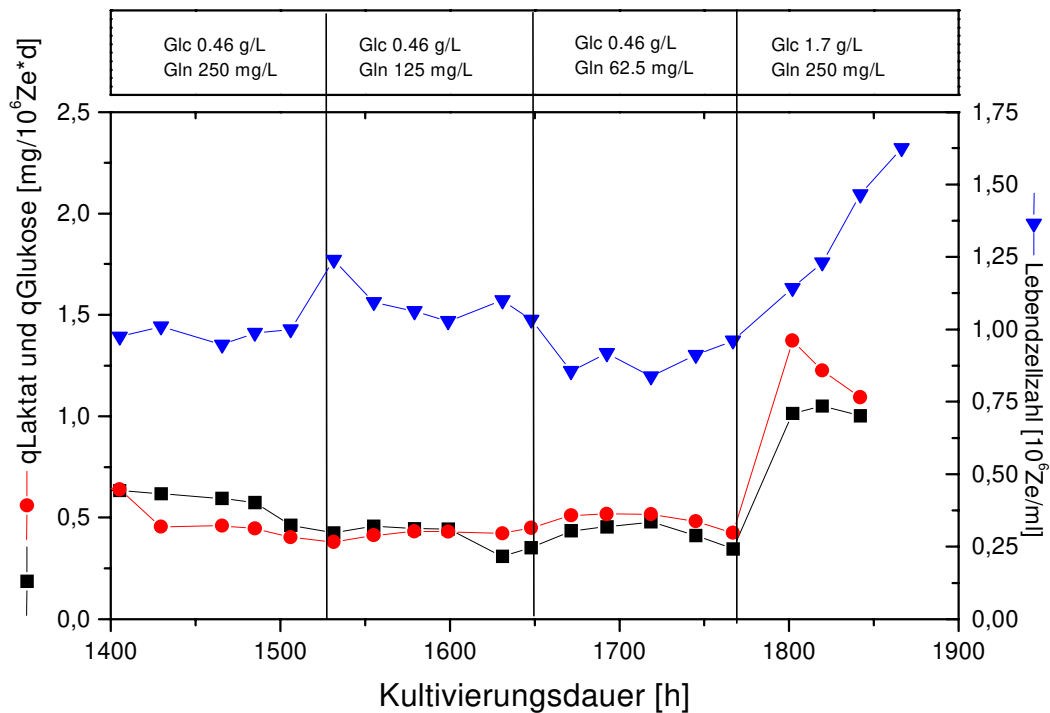


Abbildung 4.6.2.2.a: Zellzahl, sowie spezifische Verbrauchsdaten im Verlaufe der Glutaminreduzierung, sowie bei Einstellung der Ausgangsparameter

Anhand der Graphik 4.6.2.2.a sieht man einen leichten Abfall der Lebendzellzahl von 1,0 auf 0,85 [ $10^6\text{Ze/ml}$ ] zu dem Zeitpunkt, an dem die Reduzierung auf  $\frac{1}{4}$  der Ausgangskonzentration (62,5 mg/L Glutamin) erfolgte. Die Reduzierung auf 125 mg/L hatte keine Auswirkungen gezeigt.

Im Falle der Biomasseausbeutkoeffizienten zeigt sich erwartungsgemäß eine steigende Tendenz für  $\theta_{\text{X/Gln}}$ , wohingegen der Ausbeutkoeffizient Biomasse/Glukose  $\theta_{\text{X/Glc}}$  weitgehend konstant ist. Im Falle der Eingangskonzentrationerniedrigung auf 62,5 mg/L Glutamin scheint jedoch ein gegenläufiges Verhalten beider Substrate einzusetzen. Während  $\theta_{\text{X/Gln}}$  weiter steigt, nimmt  $\theta_{\text{X/Glc}}$  jetzt ab, was neben der Einbuße in der Lebendzellzahl ein weiterer Index für nicht optimale Bedingungen ist. Genauere Daten sind in Tabelle 4.6.2.2.a nachzulesen.

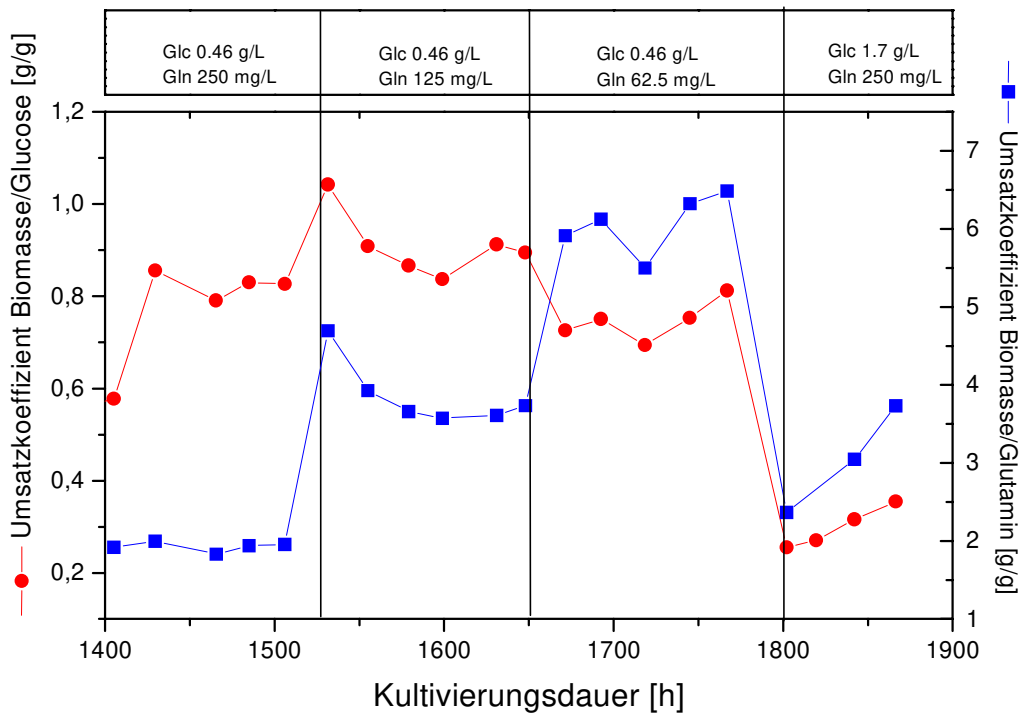


Abbildung 4.6.2.2.b: Umsatzkoeffizienten  $\theta_{X/Glc}$  und  $\theta_{X/Gln}$  bei Reduzierung der Glutaminkonzentration im Zulaufmedium. Die Glutaminreduzierung schließt an die Glukosereduzierung an, d.h. eine Adaption an limitierte Glukosebedingungen ist erfolgt.

<b>S<sub>0</sub> Glutamin [mg/L]</b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>62,5</b>	<b>250+ 1,87g/LGluc</b>
<b><math>\theta_{X/Gln}</math></b>	1,91	3,77	6,88	3,05
<b><math>\theta_{X/Glc}</math></b>	0,87	0,88	0,75	0,299

Tabelle 4.6.2.2.a Ausbeutekoeffizienten als Auswirkung der Glutaminreduzierung im Zulaufmedium.

## 4.6.2.2.2 Glukose- und Laktatstoffwechsel

Als weitere Auswirkung der Glutaminreduzierung vermindert sich die spezifische Verbrauchsrate für Laktat nach der Umstellung von 250 auf 125 mg/L und liegt jetzt numerisch unter der von Glukose, die durchgängig konstant bleibt. Dies hatte sich schon bei der Betrachtung des Laktatausbeutekoeffizienten gezeigt, verdeutlicht aber noch einmal die Beziehung zwischen Glutaminverstoffwechslung im Überschuß und erhöhter Laktatproduktion. So wird die zusätzliche Laktatproduktion über den Citratcyclus durch die Glutaminreduzierung zurückgedrängt. Der Citratcyclus scheint über diese Maßnahme regulierbar und kann der gedrosselten Glykolyse angeglichen werden.

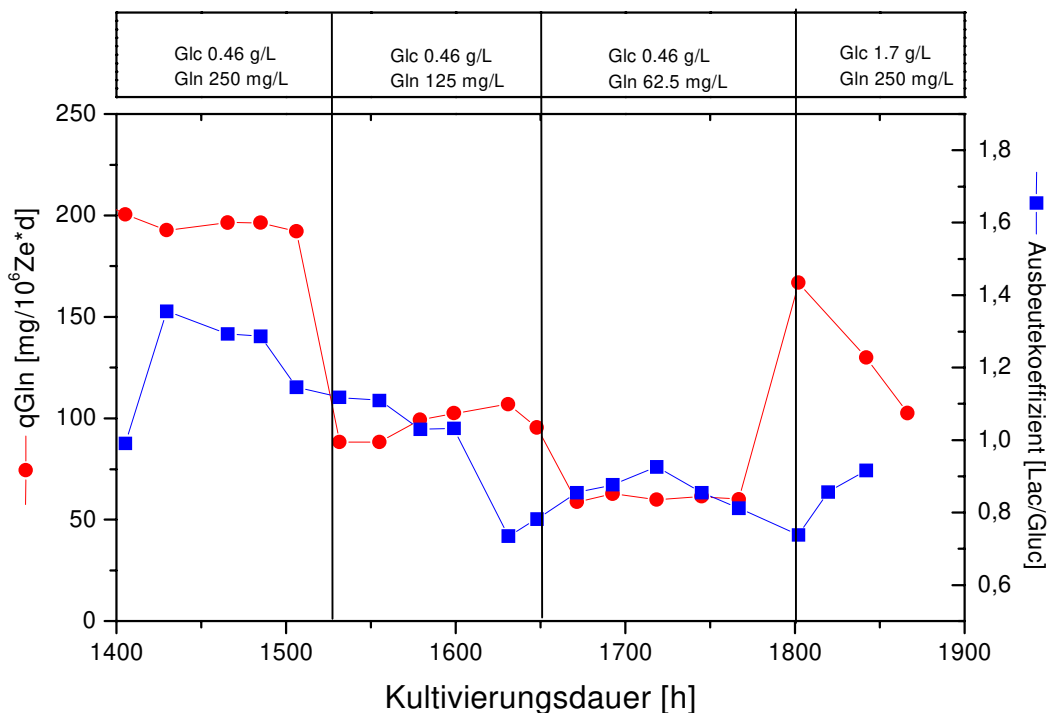


Abb. 4.6.2.2.c: spezifische Glutaminverbrauchsrate, sowie Laktatausbeutekoeffizient

Die ab der 1600. Std. durchgeführte Reduzierung von Glutamin im Vorlauf von 250 mg/L auf 125 mg/L erzwingt erwartungsgemäß eine Verminderung in der Glutaminaufnahme auf ca. 100  $[\mu g/10^6 Zellen \cdot d]$ , der Laktatausbeutekoeffizient sinkt auf 0,85. Hiermit scheint sich die in diesem Kapitel geäußerte Vermutung zu bestätigen. Unter glutaminreduzierten Bedingungen wird weniger Laktat produziert. Anscheinend benötigt die Zelle das noch vorhandene Glutamin im stärkeren Maße für die Biosynthese, und es wird somit nicht mehr „verschwendet“. Die erneute Reduzierung

auf 62,5 mg/L führt zu einer weiter verminderten Aufnahmerate von 60 [ $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}$ ], der Umsatzkoeffizient beträgt weiterhin 0,85-0,9.

Offensichtlich reicht die zum Schluß eingestellte Zulaufkonzentration von 62,5 mg/L Glutamin nicht mehr aus, eine Zellkonzentration von ca.  $1,0\cdot 10^6\text{Ze}/\text{ml}$  aufrecht zu erhalten, denn ein Blick auf die Wachstumskurve in Abbildung 4.6.2.2.a zeigt, daß die Zellzahl nach dieser Reduzierung auf ca.  $0,85\cdot 10^6\text{Ze}/\text{ml}$  sinkt. Glutamin ist der Amid-Donator in der Nukleotidsynthese. Eine Limitierung bewirkt die Verlangsamung der DNA Produktion und folgerichtig der Biosynthese.

Die Wiedereinstellung der Standardparameter führt nicht nur zu einer eindeutigen Erhöhung der Zellkonzentration auf 1,6 [ $10^6\text{Ze}/\text{ml}$ ], sondern auch die spezifischen Verbrauchs- bzw. Bildungsraten steigen wieder deutlich an (qGlc auf 0,9 und qLac auf 0,7 [ $\text{mg}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}$ ]). In diesem Fall liegt qGlc wieder höher als qLac.

#### 4.6.2.2.3 Aminosäureverstoffwechslung unter glutaminreduzierten Bedingungen

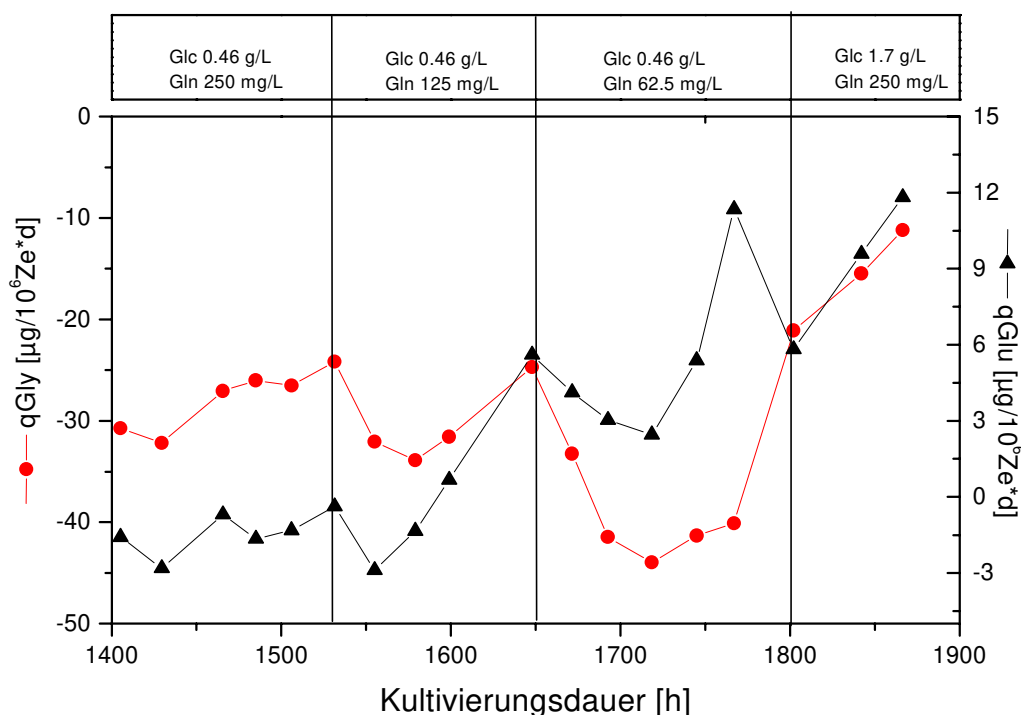


Abbildung 4.6.2.2.d: Zellspezifische Verbrauchs- bzw. Bildungsraten für Glutamat und Glycin während der Reduzierung von Glutamin im Zulaufmedium.

Die spezifischen Verbrauchsdaten der untersuchten anaplerotischen Aminosäuren zeigen bis auf Glutamat und Glycin kaum eine Beeinflussung durch die Glutaminreduzierung, d.h. sie weisen einen konstanten Verlauf auf. Bei Glutamat kann dahingegen ein verändertes Verhalten beobachtet werden: War vorher durch die hohe Glutaminolyse eine Nettoproduktion dieses Metaboliten erkennbar, wird nach der Reduzierung auf 125 mg/L Glutamin eine deutliche Verstoffwechsellung erkannt, was den erhöhten Bedarf an Brennstoff für den Citratzyklus symbolisiert. Da Glutamat nun beschränkt verfügbar ist, kann es nicht mehr in dem Maße als Amid-Akzeptor verwendet werden. Trotzdem wird über die Glutamatdehydrogenase weiterhin Ammoniak produziert. Dieser wird über die Glycinproduktion gebunden, und einen alternativen Weg zur Ammoniakentgiftung darstellt. Dieser Sachverhalt tritt sehr deutlich anhand der erhöhten Glycinproduktionsrate in diesem Zeitraum zu Tage [qGly (250 mg/L Gln) = 26 [ $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}$ ]  $\rightarrow$  qGly (125 mg/L Gln) = 32 [ $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}$ ]  $\rightarrow$  qGly (62,5 mg/L Gln) = 41 [ $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}\cdot\text{d}$ ]. Eine weitere Bestätigung müßte auch die Alanin Produktion geben, leider war bei der Analyse der Aminosäuren keine Auftrennung zwischen Alanin und Arginin möglich. Hier wäre eine niedrigere Produktionsrate zu erwarten, weil weniger Glutamat mit Pyruvat zu Alanin und  $\alpha$ -Ketoglutarat transaminiert werden kann. Andererseits ist die Stoffwechselaktivität tierischer Zellen recht flexibel, und insbesondere durch die regulatorischen Begebenheiten sind genaue Vorhersagen sehr zweifelhaft.



## ***4.7 Optimierung von Wachstums- und Produktionseigenschaften durch Fed Batch Kultivierungen.***

### **Fed-Batch Kultivierung:**

Fed-Batch-Kultivierungen zeichnen sich durch die hohe Wirtschaftlichkeit der Medienausnutzung aus. Tritt im Verlaufe der Kultivierung eine Mangelercheinung eines meßbaren Nährstoffes auf, so kann dieser jederzeit nach gefüttert werden. Üblicherweise sind die Hauptsubstrate schon recht früh erschöpft und ermöglichen bei erneuter Zugabe eine Verlängerung des Zellwachstums.

Im Verlauf dieser Kultivierungsmethode treten große Schwankungen hinsichtlich aller Komponenten auf, die durch die betreffende Fütterung noch verstärkt werden.

Es ist unbedingt erforderlich die Auswirkungen der Zufütterung einer bestimmten Komponente zu charakterisieren, um nicht durch überflüssige Zudosierung einen wachstumshemmenden Einfluß zu initiieren. Dies tritt des öfteren ein, wenn eine Kombination verschiedener Substrate zu gefüttert wird. Weiterhin ist nicht nur die Menge des zu dosierten Substrates wichtig, sondern auch die Zufütterungstechnik, die kontinuierlich oder pulsweise erfolgen kann.

Dabei wurden schwerpunktmäßig die beiden Hauptsubstrate Glukose und Glutamin als Agenzien verwendet, aber auch der Einfluß der essentiellen Aminosäuren wurde berücksichtigt.

In diesem Zusammenhang stellte sich auch die Sauerstoffsättigung in der Kulturbrühe als interessante Größe heraus, die in die Beurteilung der Ergebnisse mit einbezogen wurde.

### **4.7.1 Fermentation mit pulsweiser Glukosefütterung (Fgluc)**

Glukose stellte sich durch die voran gegangenen Batch-Versuche als schnell metabolisierte Komponente heraus, die durch die Vorgabe in der Rezeptur des Mediums (Grundgehalt 1,7 g/L) schon nach 90-100 Kultivierungstunden erschöpft war. In der folgenden Kultivierung wurde die Glukose pulsweise in kleineren Portionen zugefüttert (0,5 g/L), denn schon Rössler et al. (1995)<sup>[49]</sup> beobachteten bei Untersuchungen mit der selben Zelllinie, daß die Zellen bei erhöhter Glukosezudosierung mit einer massiven Laktatproduktion reagierten. 25 Stunden

nach der Nachfütterung wurde die kritische Laktatkonzentration überschritten und der Zelltod setzte umgehend ein.

Die Bedingungen der Kultivierung wurden folgendermaßen gewählt: 37°C, 100 RPM, pH 7,2, Sauerstoffsättigung 40% (Kalibration der Elektrode erfolgte mit reinem Sauerstoff).

#### 4.7.1.1 Wachstumskurve

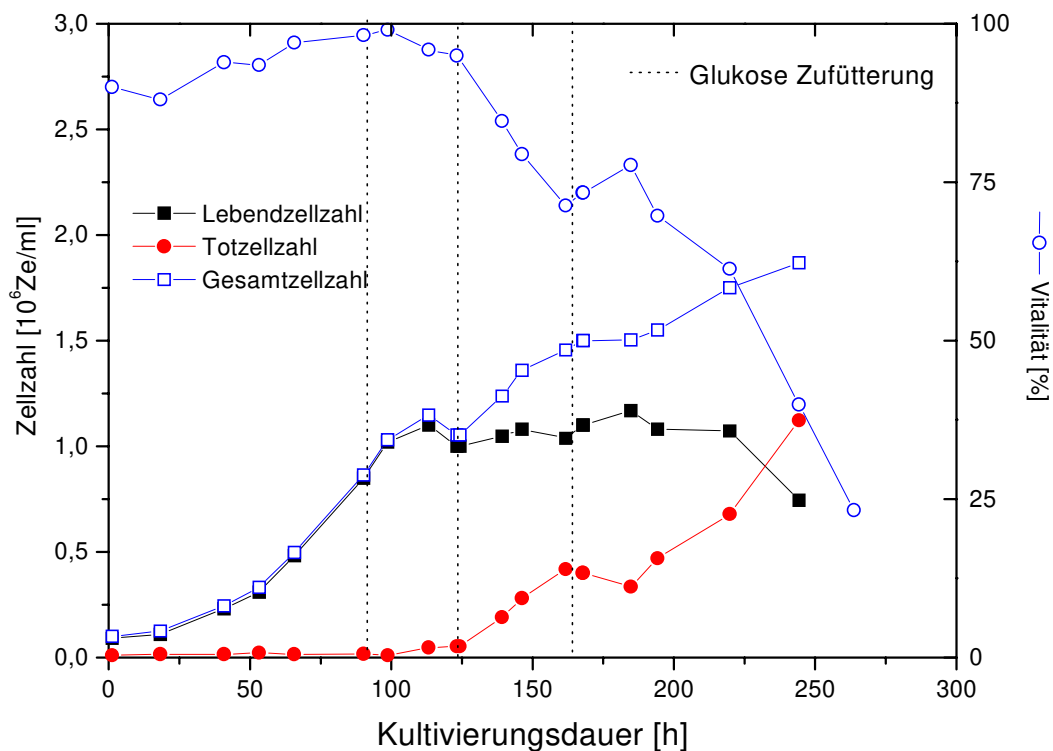


Abbildung 4.7.1.a: Wachstumskurve einer Glukose Fed-Batch-Fermentation; gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Glukosezufütterung.

Die Wachstumskurve in Abbildung 4.7.1.a zeigt, daß ausgehend von  $1 \cdot 10^5$  Ze/ml eine Lebendzellezahl von  $1 \cdot 10^6$  Ze/ml in der 115. Std. erreicht wird, die trotz Glukosefütterung bis zur 225. Std. relativ konstant bleibt. Danach ist eine deutliche Abnahme erkennbar. Ein Blick auf die Gesamtzellzahl widerlegt jedoch die Vermutung einer Wachstumsinhibierung. Kann die in der 95. Std. durchgeführte Glukosefütterung noch keine Veränderung hervorrufen, so induziert die erneute Fütterung in der 125. Std. ein Ansteigen der Zellkonzentration auf ca.  $1,9 \cdot 10^6$  Ze/ml bis zum Schluß der Kultivierung. Dieser Anstieg in der Biomasse resultiert aus

der ab der 125. Std. immer deutlicher zunehmenden Totzellzahl. Anscheinend kann die Glukosezufütterung zwar eine weitere Biosynthese aufrechterhalten, der Zustand der Kultivierung zeigt jedoch einen deutlichen Mangel einer oder mehrerer Nährstoffe. Des weiteren wird auch die Inhibierung des Metaboliten Laktat für diesen Zustand in Betracht in Betracht gezogen. Um den Sachverhalt erklären zu können, müssen die Konzentrationsverläufe der primären Substrate mit einbezogen werden.

#### 4.7.1.2 Stoffwechsel

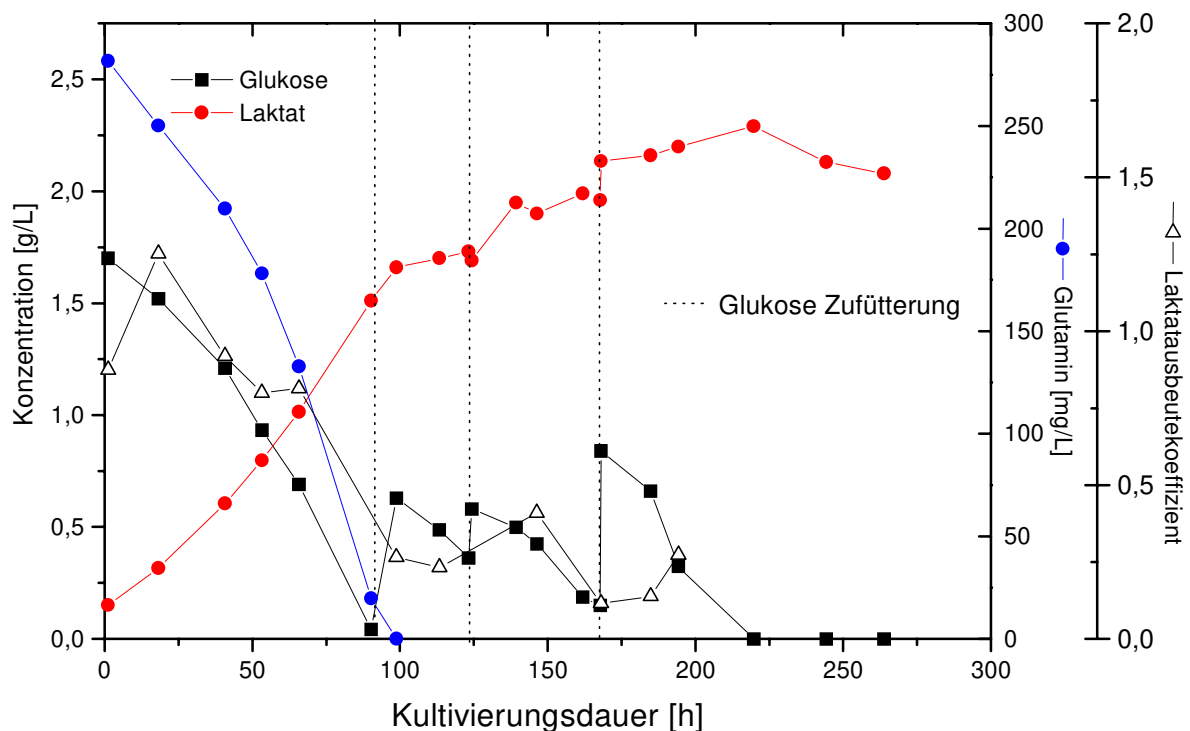


Abbildung 4.7.1.b: Konzentrationsverläufe der Primärsubstrate Glutamin, Glukose und Laktat, sowie der aus letzteren berechnete Laktatausbeutekoeffizient.

Im Zusammenhang mit Abb. 4.7.1.b kann die Wachstumskurve deutlicher interpretiert werden. Der Zeitpunkt der Limitierung von Glutamin in der 95. Std. fällt zusammen mit der ersten Zufütterung von Glukose und demonstriert den essentiellen Bedarf dieser Aminosäure für das Zellwachstum. Trotz vorhandener Glukose ist kein Wachstum mit gleichbleibender Geschwindigkeit möglich. Dahingegen ist die Vitalität der Kultur bis zur zweiten Fütterung äußerst gut (90-95%). Die zeitverzögerte Wiedereinsetzung der Biosynthese vermag durch die Adaptionsschwierigkeiten an die neue Umgebung erklärt werden. Die Funktion von Glutamin besteht in der Amidbereitstellung für die Purin- und Pyrimidinnukleotidsynthese. Eine

Limitierung dieser Komponente verhindert den DNA-Aufbau, somit wird das Wachstum eingestellt. Da Glutamin jedoch keine essentielle Aminosäure darstellt, muß ein Aufbau dieser Komponente aus anderen Substanzen möglich sein. Dies geschieht durch die Glutaminsynthetase, die Glutamat zu Glutamin aminiert. Dieser Prozeß ist regulatorischen Bedingungen unterworfen. Eine Aktivierung der Glutaminsynthetase scheint hier zeitverzögert einzusetzen. Nach 25 Std. Stagnation setzt ab der 125. Std. das Zellwachstum wieder ein, wenn auch mit deutlich verminderter Wachstumsgeschwindigkeit.

Die Vitalität nimmt nach dieser Fütterung bis auf 75 % ab (160. Std.), erst die erneute Fütterung vermag einer weiteren Zustandsverschlechterung entgegen zu wirken, doch ab der 200. Std. setzt ein eindeutiges Zellsterben ein.

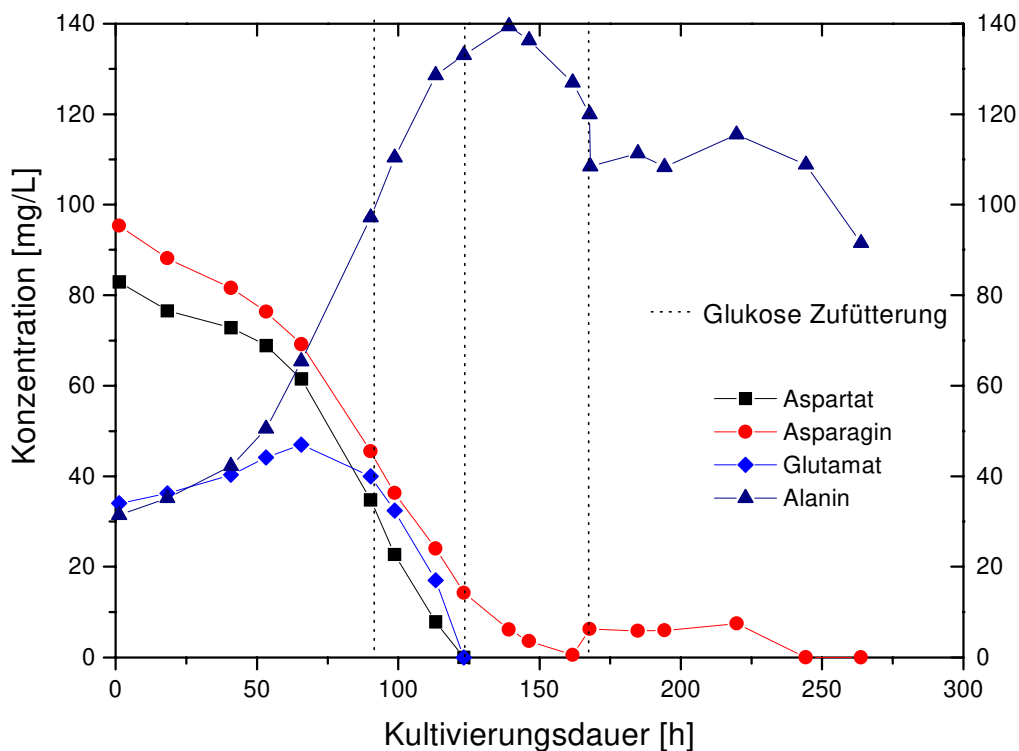


Abbildung 4.7.1.c: Konzentrationsverläufe der anaplerotischen Aminosäuren, die infolge der Glutaminlimitierung den Citratcyklus auffüllen.

Es sind hauptsächlich die Aminosäuren Aspartat, Asparagin, und Glutamat, die den Citratcyklus bei  $\alpha$ -Ketoglutarat, bzw. Oxalacetat anaplerotisch auffüllen können, und die weitere Energiezufuhr zu gewährleisten. Auch Alanin ist über die Transaminierungsreaktion eng mit Glutamat verknüpft.

Nach der Limitierung von Glutamin in der 95. Std. (Abb. 4.7.1.b) kann eine verstärkte Verstoffwechslung der obengenannten Aminosäuren beobachtet werden. Bis zur 125 Std.

sind Glutamat und Aspartat vollständig metabolisiert, ab der 160. Stunde auch Asparagin. Dieser Zeitpunkt fällt zusammen mit der ab dann schlechter werdenden Vitalität. Am Beispiel von Alanin läßt sich die Flexibilität des Stoffwechsels dieser Zelllinie demonstrieren. Alanin wird zuerst deutlich produziert. Nach der Erschöpfung von Glutamat und Aspartat nimmt die Konzentration nur noch geringfügig zu, und wird nach vollständiger Verstoffwechslung von Asparagin sogar verbraucht. Durch die schon erwähnte Umkehrung der Transaminierungsreaktion  $\text{Glu} + \text{Pyr} \leftrightarrow \text{Ala} + \alpha\text{-Ketoglutarat}$  läßt sich wieder Glutamat generieren, was zur Energieproduktion in den Citratcyklus rücktransferiert werden kann. Diese cytosolische Reaktion ist nicht zu verwechseln mit der mitochondrialen Reaktion  $\text{mGlu} + \text{mNAD}^+ \rightarrow \text{NH}_4 + \text{m}\alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{NADH}$ , die zur Energieproduktion durchlaufen wird und von der Glutamatdehydrogenase katalysiert wird.

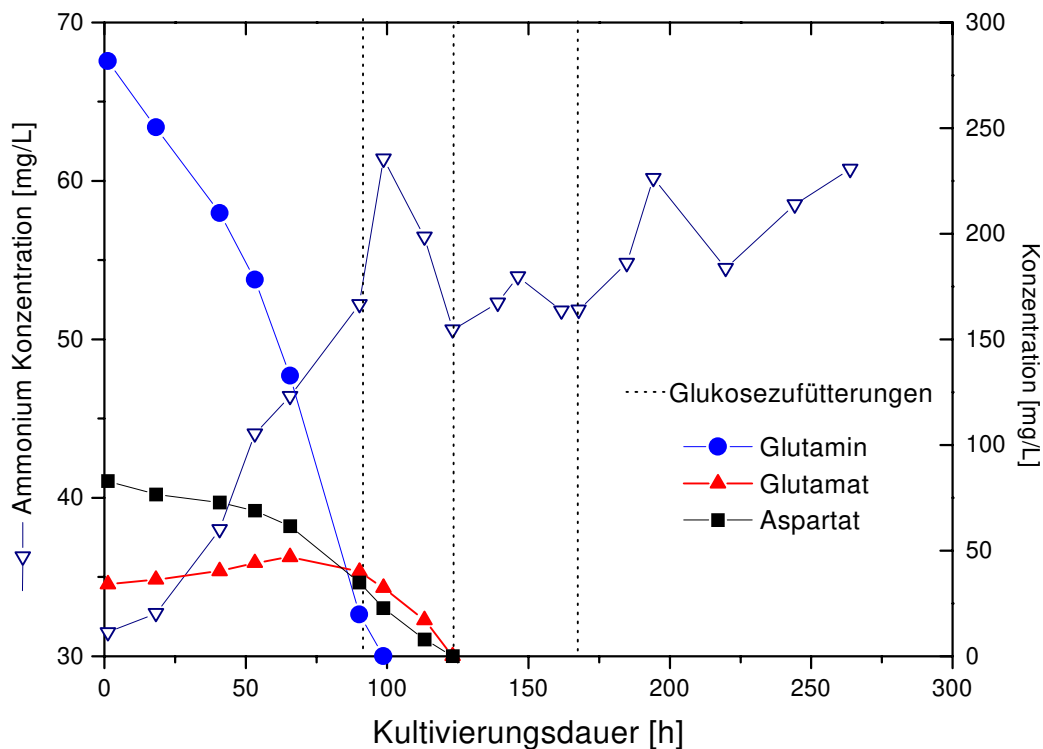


Abbildung 4.7.1.d: Glutamin ist essentiell für die Biosynthese. Die Ammoniumkonzentration indiziert den Wechsel von Glutaminolyse und Glutaminsynthese.

Der Verlauf der Ammoniumkonzentration verdeutlicht den Zeitpunkt, an dem ein Wechsel von Glutaminolyse zur Glutaminsynthese erfolgt. Bis zur vollständigen Verstoffwechslung von Glutamin in der 90. Std. kann ein dazu proportionaler Anstieg in der Ammoniumkonzentration beobachtet werden. Nach dessen Metabolisierung steigt diese nicht mehr an, im Gegenteil die Konzentration an Ammonium nimmt wieder ab. Es kann vermutet

werden, daß dies innerhalb der Glutaminsynthese durch Übertragung von Ammonium auf Glutamat begründet liegt. Nach der Erschöpfung von Glutamat und Aspartat in der 125. Std. ist deren Amidierung nicht mehr möglich und die Ammoniumkonzentration bleibt konstant. Die Zunahme in der Absterbephase kann vielleicht mit der dann einsetzenden Zellyse erklärt werden, wo intrazelluläres Ammonium freigesetzt wird.

Im Gegensatz zu den Experimenten von Rössler (1995)<sup>[49]</sup>, konnte bei dieser Fütterungstechnik, d.h. die Zugabe von mehreren kleinen Glukoseportionen, keine exponentielle Vitalitätsabnahme beobachtet werden, sondern eine lineare Abnahme.

Eine interessante Tatsache ergibt sich durch der Berechnung der Laktatausbeutekoeffizienten: In der anfänglichen Adaptionphase, bzw. zu Beginn der exponentiellen Phase liegt dieser über 1, im Laufe der exponentiellen Phase bei 0,85, in der Fütterungsphase sogar nur noch bei 0,3-0,4. Die Hauptmenge wird nicht mehr als Laktat verschwendet, sondern zu einem großen Teil zur Energiegewinnung und zur Biosynthese genutzt.

Weiteren Beobachtungen zur Folge scheint die Laktatausbeute eine Funktion der momentanen Glukosekonzentration im Medium zu sein, d.h. der aktive Transport der Glukose in die Zelle ist abhängig vom Gradienten zwischen Cytoplasma und Medium. Bei hohem Glukosefluß in die Zelle ist aus schon geklärten Transportschwierigkeiten nur die Laktatverwertung für die Zelle von Vorteil. Auch der Ausbeutekoeffizient  $\theta_{X/Glc}$  berechnet sich in dieser Phase zu 0,4 - 0,8, wohingegen dieser in der exponentiellen Wachstumsphase noch 0,1-0,2 betragen hatte.

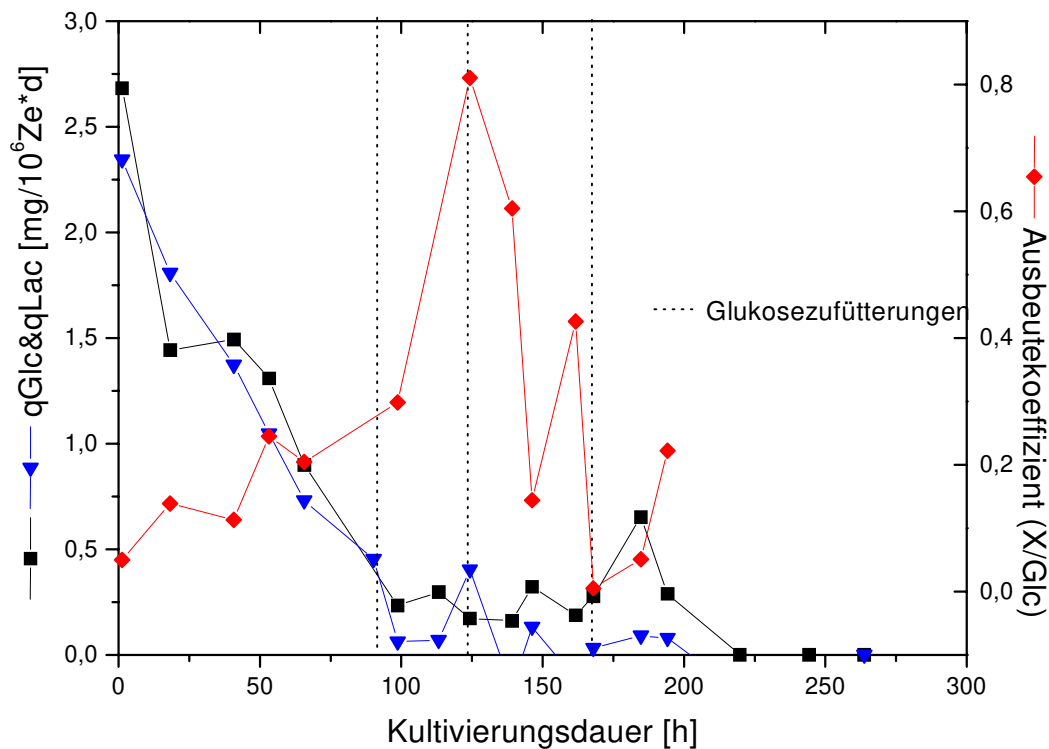


Abbildung 4.7.1.e: Spezifische Laktatproduktionsrate ( $q_{\text{Lac}}$ ) und spezifische Glukoseverbrauchsrate ( $q_{\text{Glc}}$ ), sowie der Ausbeutekoeffizient  $\theta_{\text{X/Glc}}$ ; die gestrichelte Linie zeigt den Zeitpunkt der Glukosezufütterung.

Der Verlauf, der in Abbildung 4.7.1.e dargestellten spezifischen Raten, bekräftigt noch einmal die aufgestellte Hypothese, daß die spezifische Glukoseaufnahme, sowie die daraus resultierende Laktatproduktion abhängig von der gegenwärtigen Glukosekonzentration ist. Die Glukoseverbrauchsrate beträgt anfangs 2,6 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)], fällt jedoch im Verlaufe der exponentiellen Wachstumsphase bis auf 0,3-0,4 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)]. Liegt die spezifische Laktatproduktionsrate bis zur 100. Std. nur geringfügig unter  $q_{\text{Glc}}$ , so verlagert sich dieses Verhältnis in der Fütterungsphase deutlich zu Gunsten der effektiveren Glukoseausnutzung. Dies bestätigt sich auch durch die steigenden Werte des Ausbeutekoeffizienten  $\theta_{\text{X/Glc}}$ , der während der Glukosenachfütterung zwar schwankt, doch ein deutlich günstigeres Verhältnis Biomasse/Glukose zeigt ( $\theta_{\text{X/Glc}} = 0,3-0,8$ ). Ähnlich hohe Koeffizienten wurden nur bei den Untersuchungen der Glukosereduzierung in Kapitel 4.6.2.1 erreicht.

### 4.7.1.3 Produktivität

Die Produktion des rekombinanten Proteins ist aus prozeßtechnischen Gründen ein entscheidender Faktor und muß bei der Etablierung der Fütterungsstrategie besonders berücksichtigt werden.

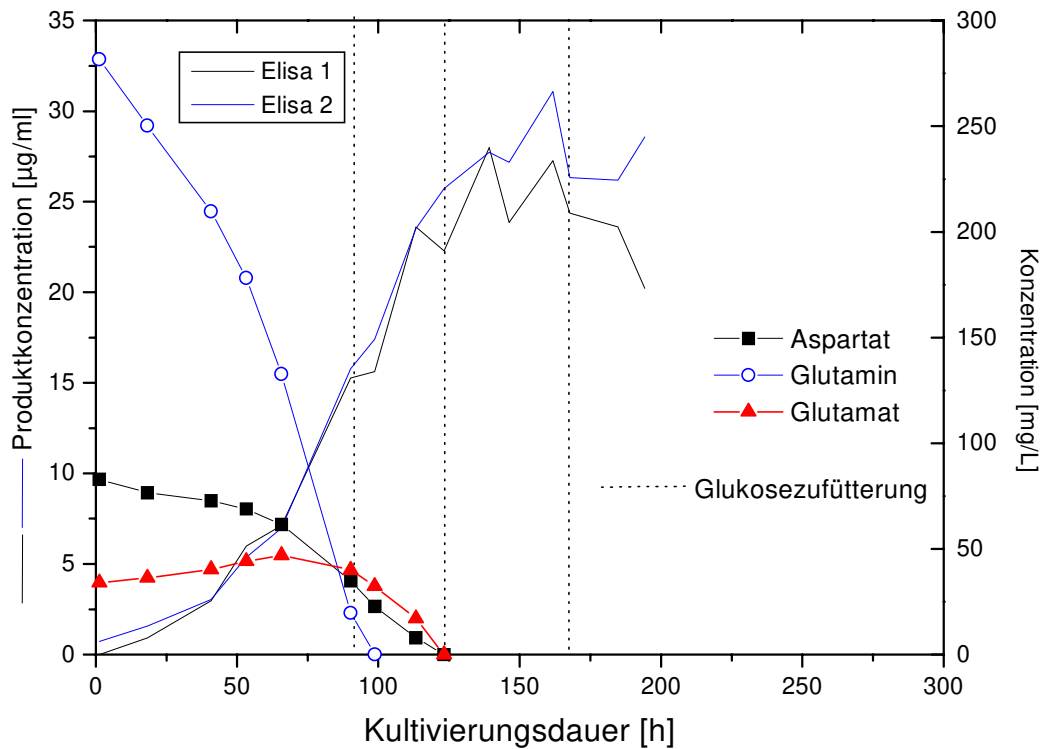


Abbildung 4.7.1.f: Aminosäuremangel beendet die Produktion des rekombinanten Proteins Antithrombin III. Dies indizieren die Konzentrationsverläufe der dargestellten Aminosäuren.

Nicht nur die Wachstumseigenschaften der Zelle werden durch die Aminosäurelimitierung beeinflusst, auch die Produktion des Antithrombin wird eingestellt. Der Produkttiter nimmt bis zur 130. Std. bis auf 25 µg/ml zu, steigt nach der Aminosäurelimitierung jedoch nicht mehr an. Unter aminosäurelimitierten Bedingungen können zellspezifische Proteine oder ganze Zellstrukturen, z.B. Zellmembranen nicht korrekt hergestellt werden, dies äußert sich in einer schlechteren Vitalität ab der 130. Stunde. Vermutlich werden die Syntheseschritte zusätzlicher Proteine eingestellt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die genetische Informationssequenz des ATIII's unter Mangelerscheinungen nicht richtig, unter Umständen sogar überhaupt nicht transkribiert wird, oder daß im Falle korrekter Transkribierung keine Translation stattfindet.



#### **4.7.1.4 Zusammenfassung**

Die Fütterung von Glukose in kleineren Portionen zeigt folgende Beeinflussung des Wachstumsverhalten: Eine klare exponentielle Wachstumsphase ist nur bis zur Verstoffwechselung von Glutamin zu erkennen (90. Std.). Danach wächst die Kultur zwar mit verminderter Wachstumsgeschwindigkeit weiter, die Glutaminlimitierung erzeugt jedoch einen Mangel weiterer anaplerotischer Aminosäuren des Citratcyklus, was sich durch die stetige Abnahme der Vitalität bemerkbar macht. Die Glukosefütterung kann diesen Prozeß nur verlangsamen. Die Produktion des Glykoproteins wird nach Erschöpfung diverser Aminosäuren eingestellt.

#### **4.7.2 Fütterung von Glukose und Glutamin (FGIn)**

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kultivierung hatten gezeigt, daß im Falle der Glukosefütterung zwar eine erhöhte Biomasse erreicht wurde, daß aber insbesondere die Vitalität und die Produktion Defizite zeigten, und wahrscheinlich aufgrund des Glutaminmangels induziert wurden. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurde eine Kombination aus alternierender Aminosäure- und Glukosefütterung unter ansonsten gleichen Rahmenbedingungen durchgeführt. Der Aminosäuremix bestand aus den anaplerotischen in  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat mündenden Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure, Asparagin und Asparaginsäure.

### 4.7.2.1 Zellwachstum und Vitalität.

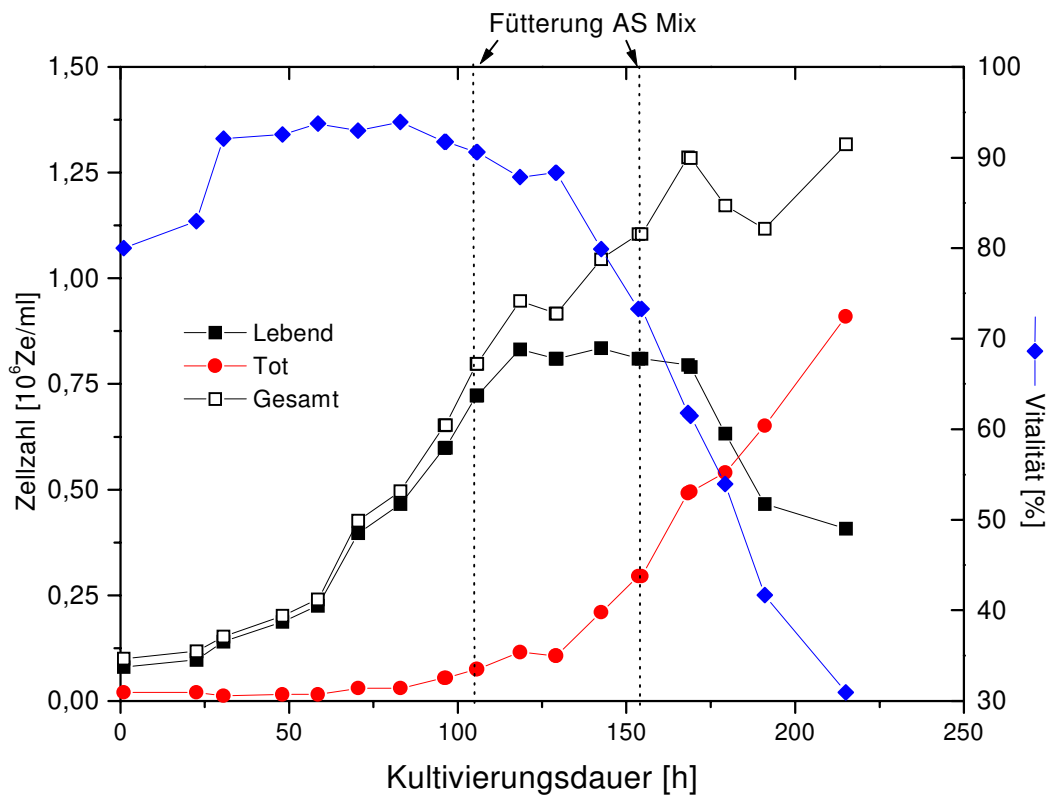


Abbildung 4.7.2.a: Zellzahlen und Vitalität bei der abwechselnden Fütterung von Aminosäuren (indiziert durch die gestrichelte Linie) und Glukose (Fütterung in der 96., 129. und 169. Std., jeweils 1 g/L)

Bei der Kombination von Glukose und Glutamin stellt sich unerwarteterweise ein äußerst schlechtes Wachstum ein. Die Lebendzellzahl erreicht in der 120. Std. einen maximalen Wert von  $0,83 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  und auch die Gesamtzellzahl liegt mit  $1,28 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  deutlich unter den Erwartungen, die man an die zusätzlichen Aminosäurefütterung gestellt hatte.

Die Vitalität der Kultur kann bis zur 130. Std. als äußerst positiv eingestuft werden (90-95%), danach fällt sie bis zur 190. Std. stark ab (bis auf 40%). Die Fütterung der Aminosäuren bewirkt keine Veränderung in der Lebendzellzahl, nur jeweils kurz nach der Fütterung ist ein geringfügiger Anstieg in der Gesamtzellzahl zu erkennen.

Die Erklärung für dieses nicht erwartete Ergebnis erfolgt durch Miteinbeziehung des Kurvenverlaufes der Laktatkonzentration (Abb. 4.7.2.b).

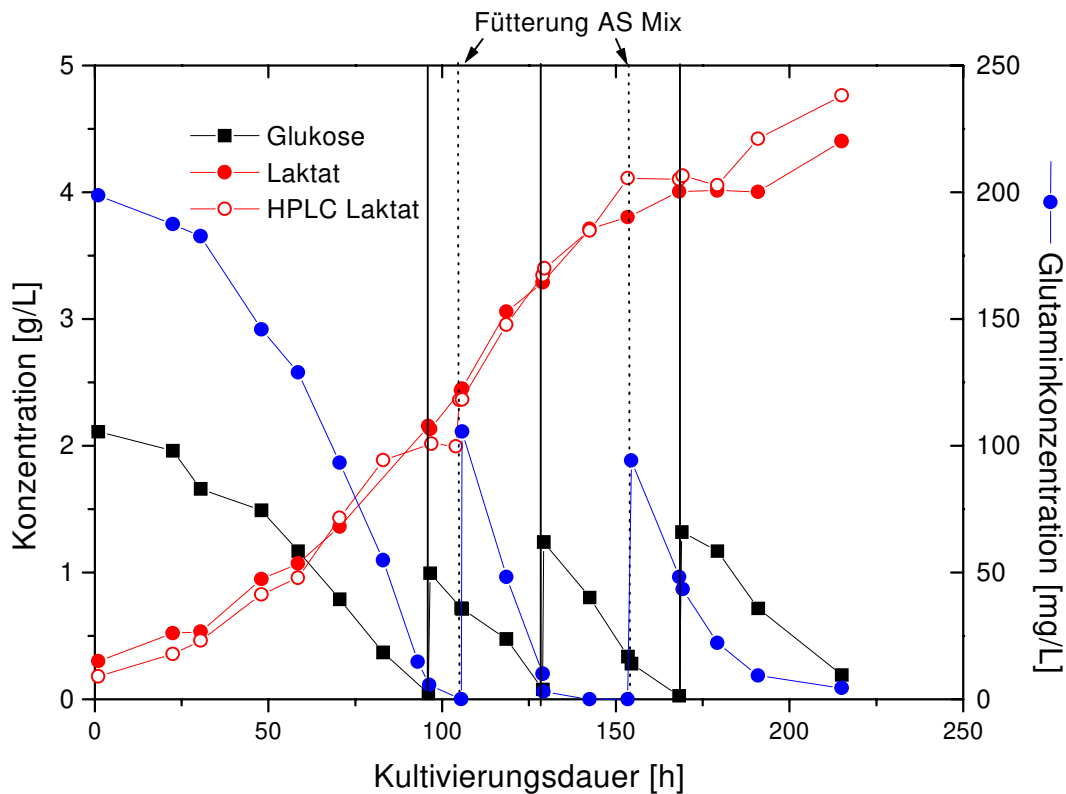


Abbildung 4.7.2.b: Konzentrationsverläufe von Glukose, Laktat und Glutamin (gestrichelte Linie indiziert Aminosäurefütterung, durchgängige Linie indiziert Glukosefütterung).

Als Folge der kombinierten, alternierenden Glukose- und Aminosäurezufütterung zeigt sich eine fast ausschließliche Laktatproduktion durch die Zellen. Die Laktatkonzentration steigt in der exponentiellen Phase bis auf knapp 2 g/L. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Kapitel 4.7.1 wird fast die gesamte Menge an zugeführter Glukose zu Laktat verstoffwechselt, der Laktatausbeutekoeffizient berechnet sich zu Werten zwischen 0,75 bis >1, d.h. auch die zusätzlich gefütterten Aminosäuren werden über den Malat-Shunt als Laktat ausgeschleust. Im Falle des zugeführten Glutamins in der 105. und 153. Std. wird der erstaunliche Bedarf dieser Komponente deutlich. Die zugegebene Menge (100 mg/L) wird innerhalb von 24. Std. verbraucht, jedoch nicht für die Biosynthese, sondern ausschließlich zur Energiegewinnung. Um die Besonderheiten im Stoffwechsel deutlicher zu darzustellen, wird noch einmal das Zeitintervall der Nachfütterungen gesondert betrachtet.

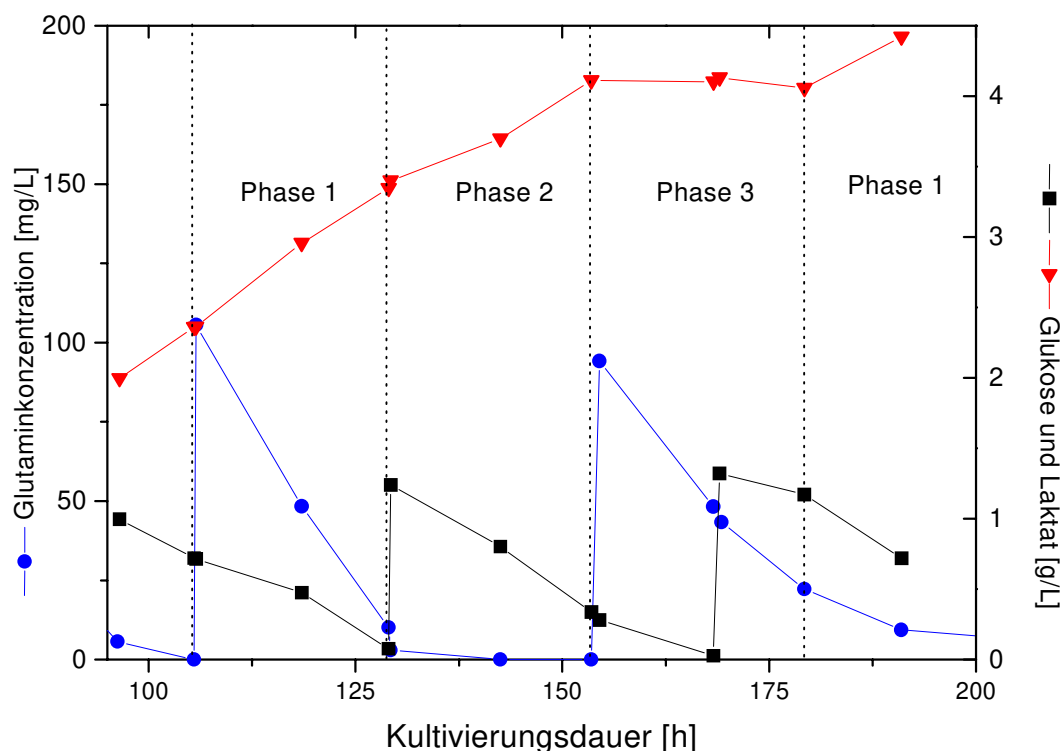


Abbildung 4.7.2.c: Umstellung im Zellmetabolismus in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Substrate.

Die Metabolisierung der beiden Substrate läßt sich in drei Phasen charakterisieren.

*Phase 1:* Beide Substrate sind im Überschuß vorhanden. Glykolyse und Citratcyclus kollabieren. Ein Ausweg scheint nur über die Exkretion diverser toxischer Metabolite möglich. Eine Indikation wird über den Laktatausbeutekoeffizient vorgenommen, der unter diesen Bedingungen oberhalb eins liegt. Dies ist nur möglich, wenn auch diverse andere Substrate über die schon besprochenen Wege zu Laktat abgebaut werden.

*Phase 2 :* Glukose ist vorhanden, Glutamin jedoch nicht. Die Verstoffwechslung zu Laktat ist vermindert,  $\theta_{\text{Lac/Glc}}$  (130-155. Std.) liegt ähnlich wie in der exponentiellen Phase bei 0,75.

*Phase 3:* Glukose ist fast verbraucht, Glutamin ist im Überschuß vorhanden. Es tritt keine weitere Produktion des Metaboliten Laktat, sowie der TCA Intermediate (Succinat, Citrat etc.) auf. Obwohl in der 170. Std. nachgefüttert, ist keine signifikante Verstoffwechslung von Glukose nachweisbar. Erst nach einer Übergangszeit von 10 Stunden setzt die Laktatproduktion wieder ein. Mit dieser Beobachtung deutet sich eine Phänomen an, welches schon in verschiedenen Batch-Kultivierungen aufgetreten war. Die Zelle ist in der Lage, ihren Stoffwechsel von Glykolyse auf Gluconeogenese umzuschalten. Weitere Einzelheiten werden in Kapitel 4.7.3 näher besprochen.

Die Messung der Aminosäuren zeigt erwartungsgemäß die deutlich schnellere Verstoffwechslung von Glutamin im Vergleich zu den anderen im Mix enthaltenen Komponenten. Der Grund liegt vermutlich im besseren Transport ungeladener Moleküle durch die Zellmembran, sowie der höheren Aktivität der Glutaminase. Wie schon im vorherigen Versuch werden nach der Glutaminlimitierung weitere anaplerotische Aminosäuren verstärkt metabolisiert, wobei die sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat in Gegenwart ihrer amidierten Ausgangsform zunächst als Intermediärmetabolite vorliegen und scheinbar nur geringfügig abgebaut werden. In Übereinstimmung zu Untersuchungen, bei denen Glutamat als Glutaminersatz im Medium eine verstärkte Zellaggregation induzierte (Kap. 4.10), war auch hier eine verstärkte Zellaggregation in der Fütterungsphase zu beobachten. Vermutlich stellt die elektrostatische Vermittlung dieser Aminosäure eine Ursache hierfür dar, dieses kann jedoch wegen weiterer im Überstand angehäufter geladener Komponenten (organische Säuren, Laktat) nicht bewiesen werden. Da aus oben genannten Gründen keine Notwendigkeit der Supplementierung dieser Komponente besteht, wird im folgenden auf die Fütterung von Glutamat verzichtet.

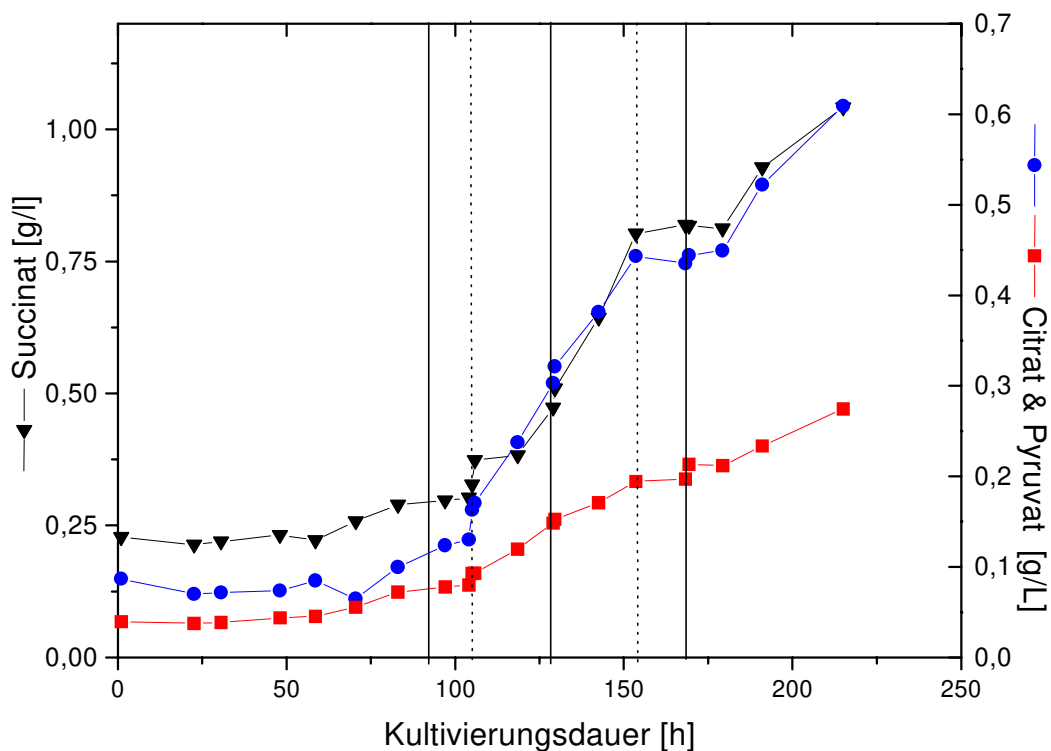


Abbildung 4.7.2.d: Fütterung von Glukose und Glutamin führt zum Kollabieren des Citratcyklus. Dies zeigen die Konzentrationsverläufe der im Überstand detektierten organischen Säuren (gestrichelte Linie gibt die Fütterung der Aminosäuren an, durchgängige Linie die Fütterung der Glukoseportionen).

Ein Kollabieren der Hauptstoffwechselwege im Überschuß der beiden Primärsubstrate Glukose und Glutamin kann durch die Messung der organischen Säuren, die hier zum ersten Mal etabliert wurde, belegt werden. Es wurden im Kulturüberstand folgende Zwischenprodukte des Citratcyklus gemessen: Citrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, und Succinat. Auch die organischen Säuren Laktat, Pyruvat und Formiat, die eng mit dem Zyklus verknüpft sind, konnten reproduzierbar bestimmt werden. Andere Zwischenmetabolite des TCA-Zyklus konnten nicht detektiert werden (Malat, Fumarat, Oxalacetat und Isocitrat).

Signifikante Änderungen der Konzentrationen im Überstand waren in Batch-Versuchen nicht zu beobachten. Erst die Fütterung diverser Substrate führte zu einer Akkumulation dieser Säuren im Überstand. Diese indizieren einen nicht balancierten Stoffwechsel. Die Messung der intrazellulären Bestandteile wurde durch die wenig reproduzierbaren Ergebnisse beeinträchtigt, des weiteren gab es keine eindeutigen Änderungen, die möglicherweise durch eine Umstellung im Stoffwechsel hätten herrühren können, lediglich eine Größenabschätzung der intrazellulären Mengen war durchführbar.

Durch das exzessive Nährstoffangebot infolge der alternierenden Zufütterungsweise in der Fermentation FGln kommt es zu einer starken Anhäufung von Laktat, Citrat und vor allem Succinat. Succinat wird in der exponentiellen Phase nur in geringen Mengen (von 226 auf 296 mg/L), bei Beginn der Aminosäurefütterung drastisch ausgeschleust (bis auf über 1g/L). Dies bedeutet eine fast fünffache Menge dessen, was in Batch-Fermentationen erreicht wird. Die Exkretion der organischen Säuren übertrifft rein rechnerisch die Menge an verstoffwechseltem Glutamin (und den anderen bei  $\alpha$ -Ketoglutarat mündenden AS), d.h. es muß auch aus dem Kohlenstoffgerüst der Glykolyse entstammen. Dieser Anteil fließt bei AcetylCoA in den Citratcyklus ein. Folgendes Schema verdeutlicht noch einmal die Zusammenhänge:

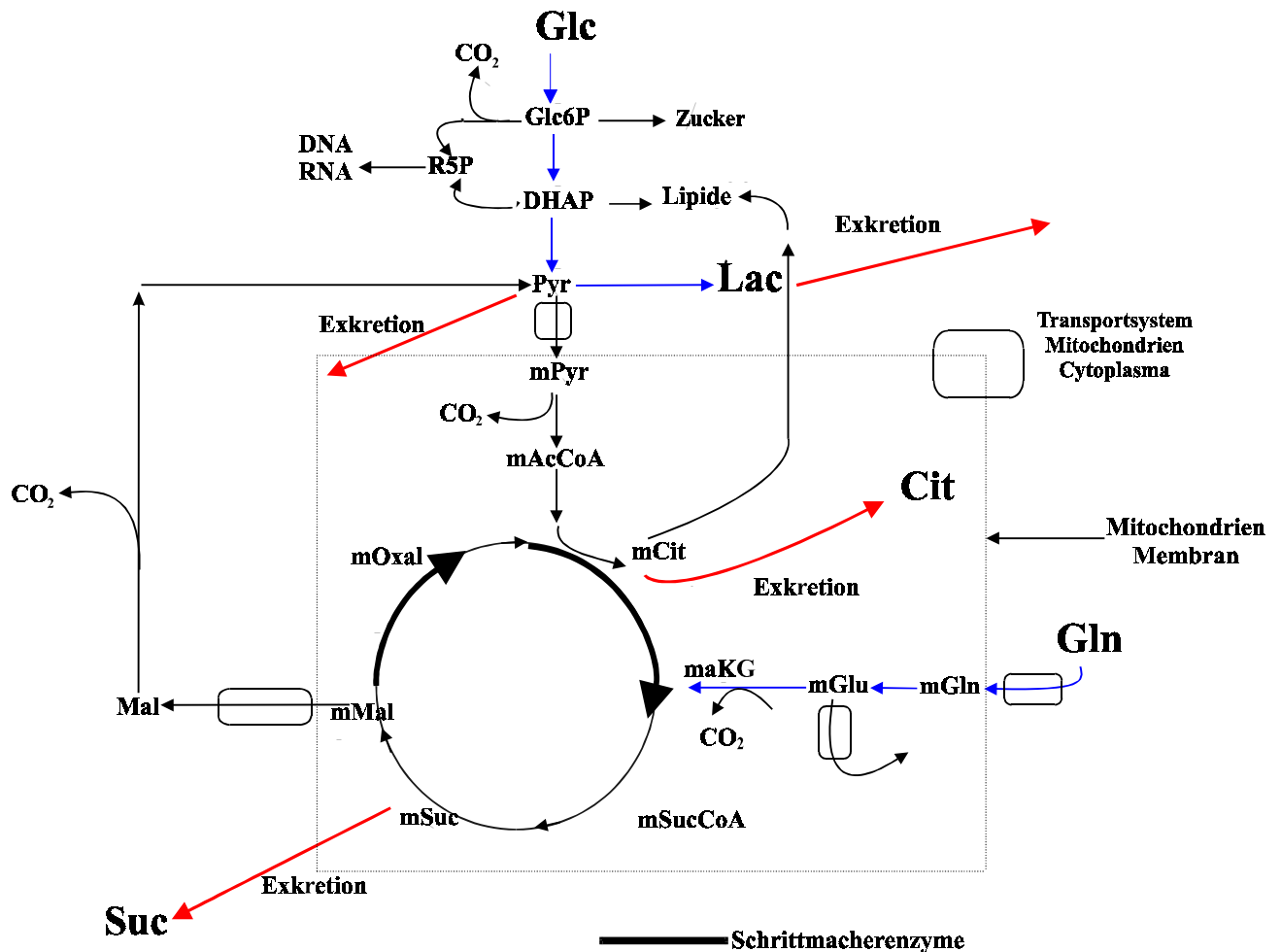


Abbildung 4.7.2.e: Exkretion von TCA Intermediaten als Reaktion des Stoffwechsels infolge hohen Substratdrucks (Schematische Darstellung).

Die Einteilung der Phasen, die in Abbildung 4.7.2.c vorgenommen wurde, hat weiterhin Bestand. In Phase 1 kollabiert der Citratzyklus. Der extrazelluläre Glukosedruck verursacht einen extrem starken glykolytischen Abbauweg. Aufgrund von Transportschwierigkeiten zwischen Cytoplasma und Mitochondrien, gelangt nur ein Teil der Glukose in den Citratzyklus, der größte Anteil wird über Laktat ausgeschleust. Der Citratzyklus versucht die Unmengen reduzierter Coenzyme, die bei der Glykolyse anfallen, zurück zu oxidieren. Er ist über  $\alpha$ -Ketoglutarat mit dem nötigen „Brennstoff“ Glutamin verbunden, jedoch können die sogenannten Schrittmacherenzyme des Zyklus die anfallenden Mengen der Vorstufen nicht mehr bewältigen. Durch die Messung großer Mengen Succinat und Citrat, kommen dafür nur die Enzyme, die die nächsten Schritte katalysieren in Frage: Malatdehydrogenase die Malat zu Oxalacetat dehydriert und die Isocitrat-Dehydrogenase, die auf ähnliche Art Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umsetzt. Potentiell könnte auch die Succinatdehydrogenase in Betracht kommen, aufgrund der hohen Mengen der über den Malat-Shunt ausfließenden C4-Körpern wird dies

jedoch bezweifelt. Für diese Hypothese der Schrittmacherenzyme spricht, daß weder Fumarat und Malat, sowie Isocitrat und wenig  $\alpha$ -Ketoglutarat als Intermediate extrazellulär detektiert wurden.

In Phase 2 ergibt sich ein ähnliches Bild, nur das aufgrund der Glutamin Limitierung alternativ Glutamat, Aspartat und Asparagin verstärkt abgebaut werden.

Wurden die TCA-Intermediate bis zur 155. Std. deutlich produziert, ist keine Produktion in Phase 3 festzustellen. Hier wurden zwar Aminosäuren gefüttert, die Glukose ist jedoch zu diesem Zeitpunkt fast verbraucht.

Anscheinend liegt hier eine richtige Abstimmung zwischen Citratcyklus und Glykolyse vor. Die zu Verfügung stehende Glukose limitiert den glykolytischen Fluß, infolgedessen weniger Intermediate durch den Zwang der Coenzymregenerierung entstehen. Letzteres wird auch noch einmal durch die stationäre Laktatkonzentration bekräftigt. In der Folgezeit wird durch die erneute Fütterung von Glukose wieder eine Überschußsituation induziert.

#### 4.7.2.2 Produktion

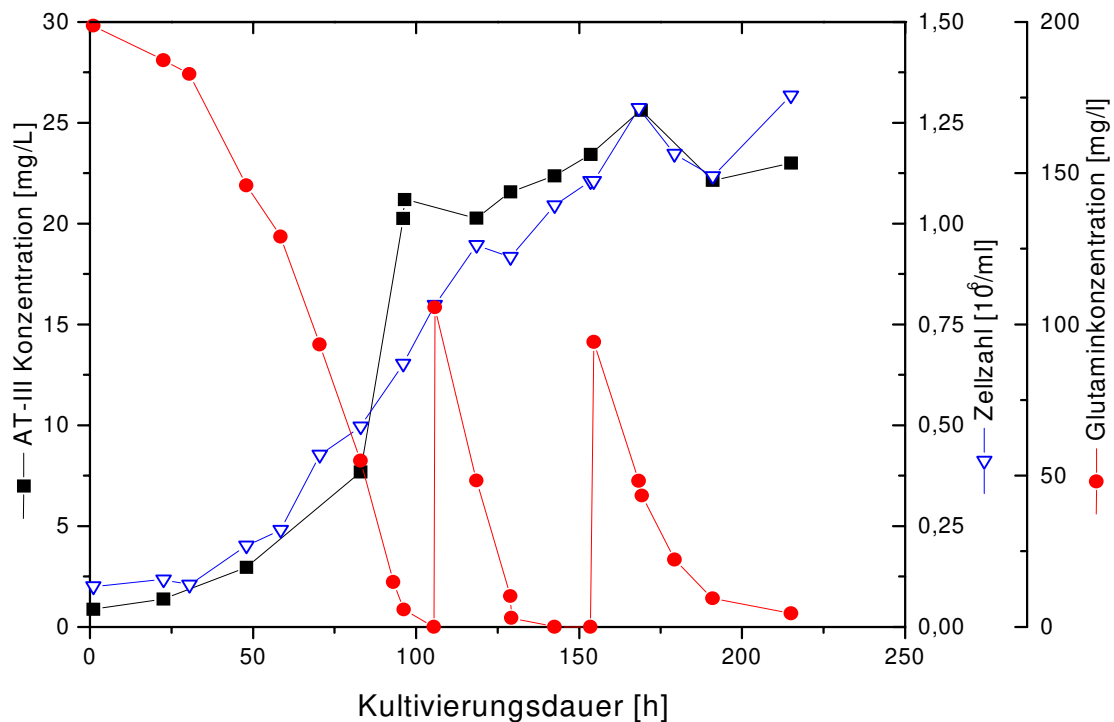


Abbildung 4.7.2.f: Konzentrationsverlauf des sezernierten Glykoproteins.

Die Produktion des Antithrombin III wird anscheinend nicht durch die Nachfütterung von Aminosäuren beeinflusst, indiziert durch den Glutaminkonzentrationsverlauf wie in obiger Graphik dargestellt.



Der Produkttiter steigt in der exponentiellen Wachstumsphase bis auf 21 mg/L, danach ist jedoch ähnlich wie bei der Gesamtzellzahl nur noch eine geringere Zunahme bis auf 25mg/L zu erkennen. Die Produktion scheint in diesem Zusammenhang deutlich wachstumsgekoppelt zu sein. Anscheinend generiert nur die fortlaufende Zellteilung mehr Produkt, die Tendenz zur Mitose ist jedoch hier durch die hohe Metabolitkonzentration eingeschränkt, was durch die Wachstumskurve zum Ausdruck kommt. Diesbezüglich ist eine Produktsteigerung nur zu erwarten, wenn die exponentielle Phase so weit wie möglich hinaus gezögert wird. Andererseits ist gerade im Umgang mit der Produktivität keine eindeutige Aussage möglich, hängt sie doch von vielen Faktoren ab. Insbesondere der komplexe Ablauf zur posttranslationalen Modifizierung wird durch viele Enzymschritte beeinflusst, d.h. die eingeschränkte Produktivität ist auch auf eine Inaktivierung der involvierten Enzyme zurückzuführen, die durch die vorherrschende Metabolitkonzentration reguliert wird. Dennoch scheinen nicht nur die prozessierenden Enzyme des Produktes, sondern der gesamte Enzymapparat einer Änderung zu unterliegen. Als Folge dessen stellt die Zelle die Biosynthese ein und konzentriert sich auf die Erhaltung der zellulären Funktionen. Des weiteren ist es trotz Produktion und Sezernierung des Produktes möglich, daß dieses aufgrund von Fehlern in dem für die immunologische Reaktion des ELISA's wichtigen Abschnitt nicht mittels Immundetektion erfaßt wird. Diese und andere Probleme bezüglich der Produktqualität und Heterogenität sind andere wichtige Zielsetzungen im Umgang eines Produktionsprozesses im Fed-Batch-Modus, gehören jedoch nicht in den Rahmen dieser Arbeit.

### **4.7.3 Induktion eines Diauxieverhalten durch spezielle Fütterungstechniken (FnGln)**

Wie sich im vorherigen Abschnitt herausgestellt hat, ist eine Zufütterung von Glukose und Glutamin aufgrund der exzessiven Metabolisierung nicht sinnvoll.

Aufgrund der Intermediäreigenschaften der Desaminierungsprodukte Aspartat und Glutamat wurde im folgenden nur eine Fütterung der Aminosäuren Asparagin und Glutamin unter Glukoselimitierung gewählt. Vorversuche hatten gezeigt, daß Glukose essentieller Bestandteil als Initiator des exponentiellen Wachstums ist, aber im weiteren Verlauf der Kultivierung nicht zwingend vorhanden sein muß, wenn als alternative Kohlenstoffquelle Laktat zur Verfügung steht. Hier war die Verstoffwechslung der Milchsäure schon des öfteren beobachtet worden, sogar bei Anwesenheit einer Glukoserestkonzentration im Medium.

### 4.7.3.1 Zellwachstum und Stoffwechsel

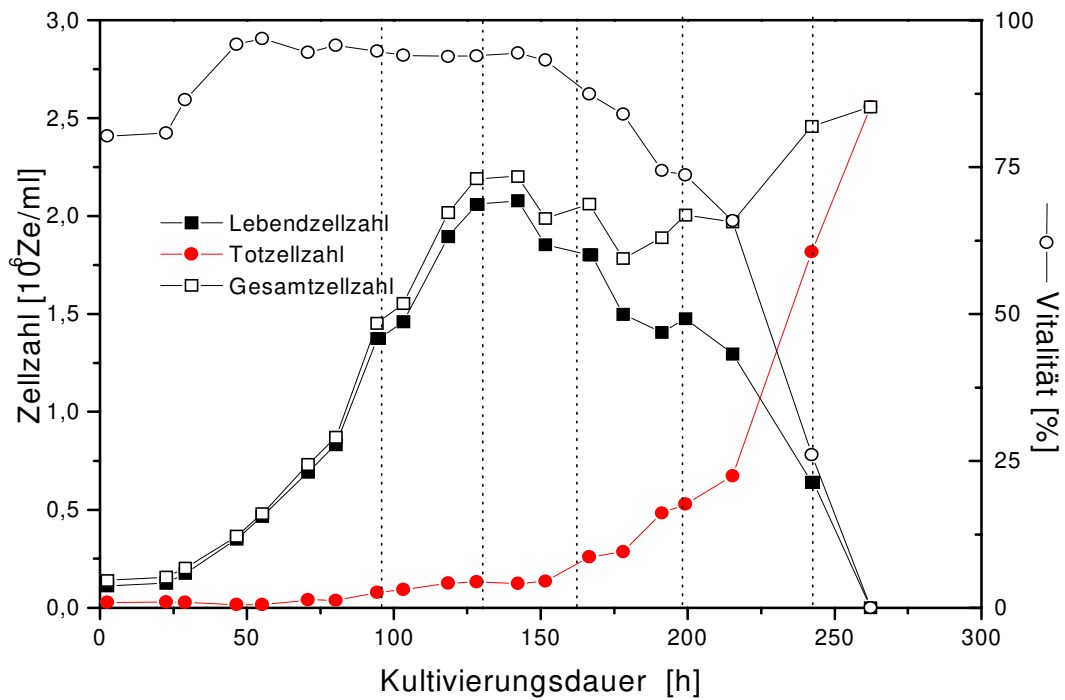


Abbildung 4.7.3.a: Zellzahlen und Vitalität der Fermentation FNGLn. Die gestrichelten Linien markieren den Zeitpunkt einer Zufütterung von 75 mg/L Glutamin und 40 mg/L Asparagin

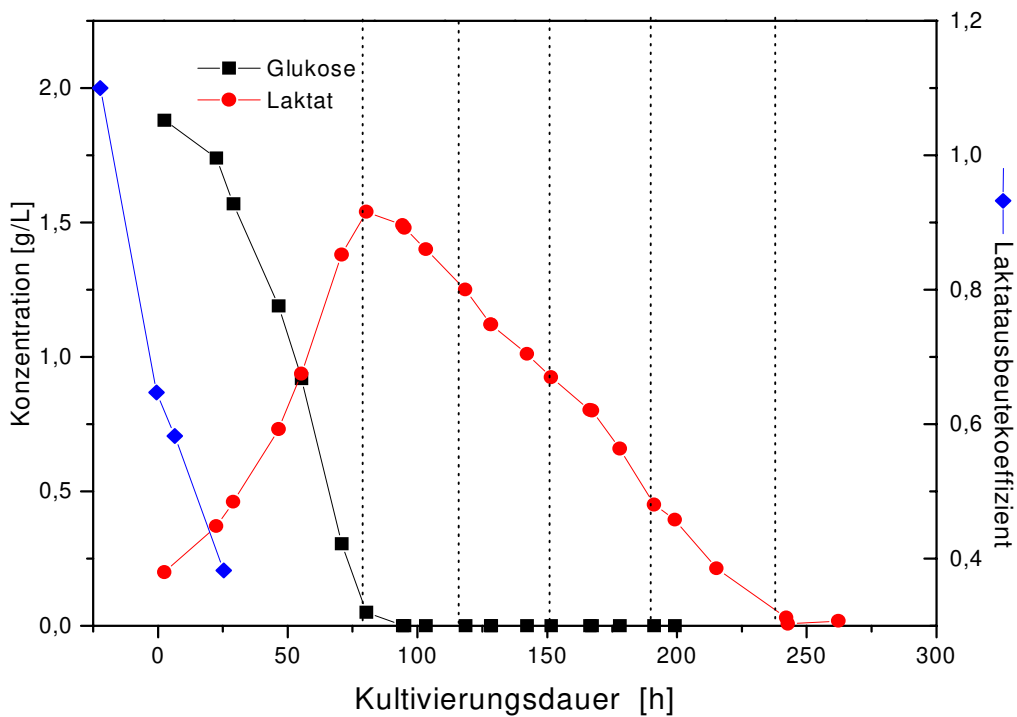


Abbildung 4.7.3.b: Verläufe von Glukose und Laktat während der pulsweisen Nachfütterung von Glutamin/Asparagin. Die gestrichelten Linien markieren den Zeitpunkt einer Zufütterung.

Die Fütterung von Glutamin/Asparagin unter Glukoselimitierung zeigt folgende Merkmale:

Die in der 142. Std. maximal erreichte Zellzahl liegt mit ca.  $2,1 \cdot 10^6$  Ze/ml deutlich höher als bei den Kultivierungen, in denen Glukose nach gefüttert wurde. Auch die Vitalität ist bis zur 151. Stunde mit 93-95 % äußerst gut.

Das in der 94. Std. beobachtete Plateau der Wachstumskurve demonstriert ein klassisches Diauxie-Verhalten. Zu diesem Zeitpunkt ist die Glukose verbraucht und die Zelle stellt ihren Metabolismus von Glykolyse auf Gluconeogenese um. Diese Umstellung im Stoffwechsel benötigt Zeit, was in einer Verlangsamung des Wachstums zum Ausdruck kommt. Nach der Umstellung auf Laktat wächst die Kultur mit geringerer Wachstumsgeschwindigkeit weiter. Ab der 145. Std. kann keine Zunahme in der Biomasse mehr beobachtet werden. Zwischen der 145. und 215. Std. nimmt die Vitalität langsam auf 60%, danach innerhalb 48 Std. drastisch bis auf 0% ab.

Interessanterweise wird unter diesen Fütterungsbedingungen Laktat wieder vollständig verstoffwechselt. Bisher war die einsetzende Verstoffwechslung jeweils am Schluß einer Fermentation aufgefallen, dem ein baldiges Absterben der Kultur folgte. Die vollständige Verstoffwechslung ist anscheinend nur unter Anwesenheit von Glutamin und Asparagin möglich. Eine energetische Betrachtung der Gluconeogenese zeigt den ATP-Bedarf der umgekehrt verlaufenden Reaktionen. Dieser Energieaufwand ist nur durch einen betriebsamen Citratcyklus zu realisieren, in dem Glutamin als „Brennstoff“ fungiert. Abbildung 4.7.3.d verdeutlicht, daß, ausgehend vom Laktat, der Weg zum Glukose6Phosphat (Glc6P) nur über den Umweg des Citratcyklus möglich ist. Dabei wird Pyruvat durch die Pyruvatcarboxylase zu Oxalacetat umgesetzt.

Hierbei sind die energieaufwendigen Reaktionen die Syntheseschritte von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat, und von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Biphospho-glycerat. Die Messung der TCA-Intermediate zeigt eine weitere Besonderheit.

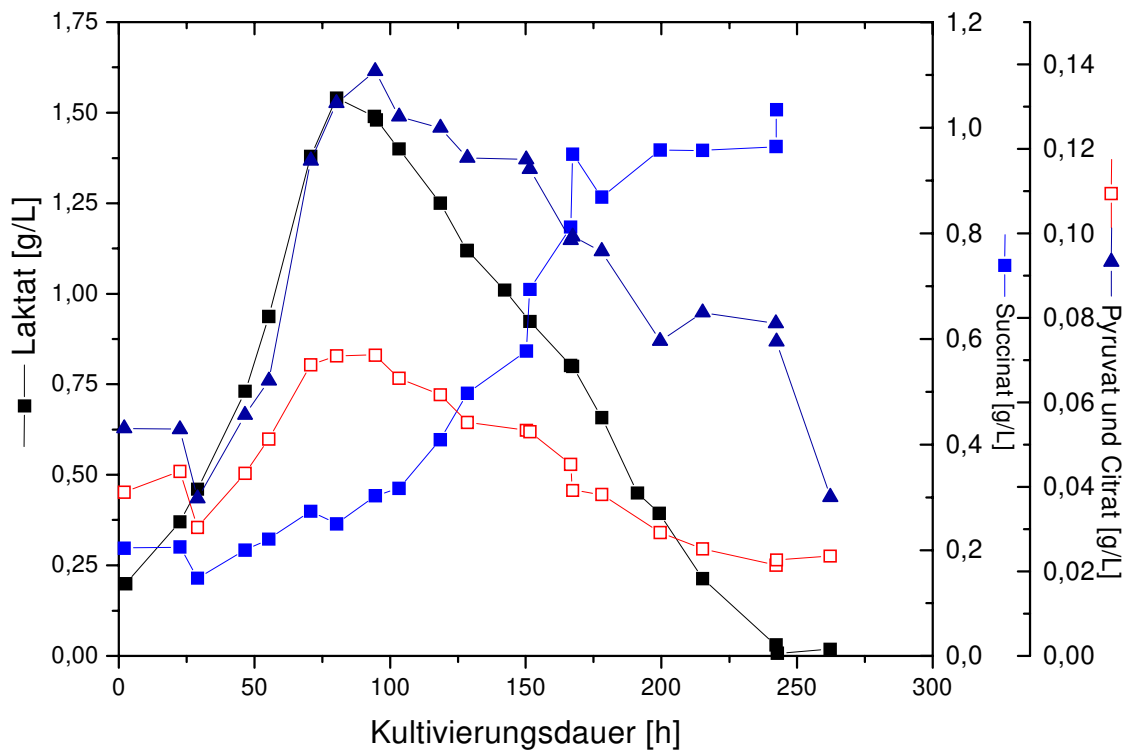


Abbildung 4.7.3.c: Verlauf der extrazellulär gemessenen TCA Intermediate.

Während des glykolytischen Abbaus von Glukose (bis zur 85. Std.) beobachtet man eine Sekretion der TCA-Intermediate Citrat, Pyruvat und Succinat, die wahrscheinlich wieder auf die exzessive Nährstoffaufnahme zurückzuführen ist. Bei Einsetzen der Gluconeogenese werden analog zum Laktat diese Intermediate wieder eingeschleust, was den Bedarf dieser Komponenten unter den geänderten Bedingungen anzeigt. Eine Ausnahme bildet Succinat, welches während der nächsten 100 Std. massiv von 250 mg/L bis auf ca. 1 g/L weiter ansteigt. Dieses Verhalten wurde schon im vorherigem Kapitel diskutiert und war dort mit der Geschwindigkeitsbeschränkung durch die Malatdehydrogenase erklärt worden. Hier scheint wohl die Reaktionsrichtung zum Zweck der Gluconeogenese ausschließlich transvers, d.h. der Fluß verläuft in Richtung Oxalacetat → Malat. Eine Generierung dieser Menge Succinat ist nicht durch die alleinige Verstoffwechselung von Glutamin und Glutamat möglich. Dies bedeutet, daß auch die aus AcetylCoA stammende Menge nach Umlauf des TCA-Zyklus letztendlich bei Succinat mündet und sich dort akkumuliert. Im Citratcyklus besteht eine stöchiometrische Notwendigkeit von 1 mol AcetylCoA und 1 mol Oxalacetat, welches in diesem Fall durch die Transaminierung von Aspartat zu Oxalacetat bereitgestellt wird. Bei Oxalacetat muß sich der Fluß aufteilen, einerseits um die Gluconeogenese durchzuführen, zum



Zeitpunkt nicht möglich und die jeweils adäquate Zudosierung ein großes Problem. Im Falle der Glutaminlimitierung reagiert die Zelle mit der Mobilisierung anderer verfügbarer Substrate (Asparagin, Aspartat und Glutamat). Bei näherer Betrachtung weiterer Möglichkeiten kann sogar die Umkehrung der Transaminierungsreaktion  $\text{Glutamat} + \text{Pyruvat} \rightarrow \text{Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat}$  beobachtet werden. Abbildung 4.7.3.e zeigt diese Vermutung auf :

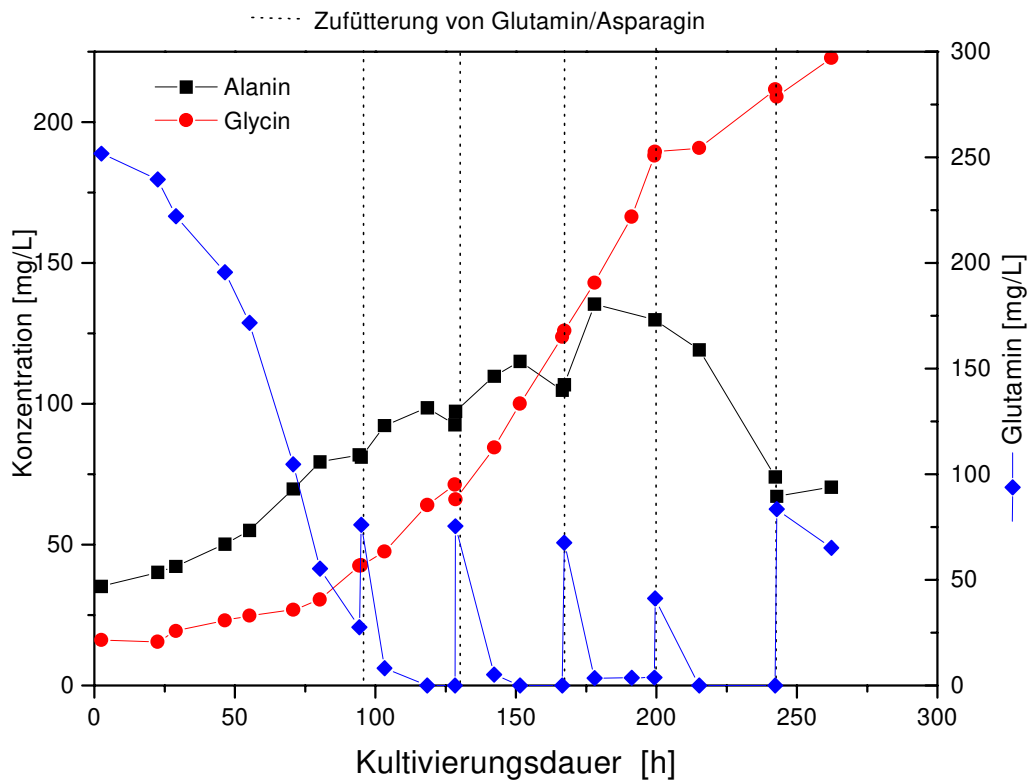


Abbildung 4.7.3.e: Die Glutaminlimitierung bewirkt zeitweilig die Mobilisierung weiterer „Brennstoffe“ über andere Syntheschritte: Dies indiziert der Konzentrationsverlauf des durch Transaminierung mit Glutamat verbundenen Alanin.

Die Produktion von Alanin dient ebenso wie die von Glycin zur Ammoniakentgiftung in der Zelle (siehe theoretischer Teil). Der Verlauf beider Metabolite zeigt einen entsprechenden Anstieg in der exponentiellen Phase. Während der heftigen Glutaminolyse in der Gluconeogenese ändert sich dieser Zusammenhang. Während die Produktion von Glycin bis zur 200. Std. von 43 auf ca. 190 mg/L fast exponentiell steigt, wird Alanin nur wenig produziert (80 → 130 mg/L), bei längerer Glutaminlimitierung sogar wieder verstoffwechselt. Zusammenhängend mit dem Mangel an Glutamat ist eine Transaminierung nur eingeschränkt möglich, die Ammoniakentgiftung wird verstärkt über die Glycinbildung durchgeführt. Der direkte Zusammenhang zwischen Alanin und Glutamat wird in der Verstoffwechslungsphase

des Alanins ab der 200. Std. deutlich. Die Glutamatkonzentration bleibt in dieser Phase konstant (Daten nicht gezeigt). Die Kurvenverläufe dieser Aminosäuren demonstrieren die Flexibilität (Reversibilität der Reaktionen) der Zelle bei Mangelerscheinungen, dessen oberste Priorität nach eingestelltem Wachstum die Versorgung mit ATP darstellt.

#### 4.7.3.2 Makroskopische Äußerung der zellinternen Vorgänge

Die zellinternen Vorgänge konnten auch makroskopisch mittels on-line Sauerstoff- und pH-Sensoren verfolgt werden.

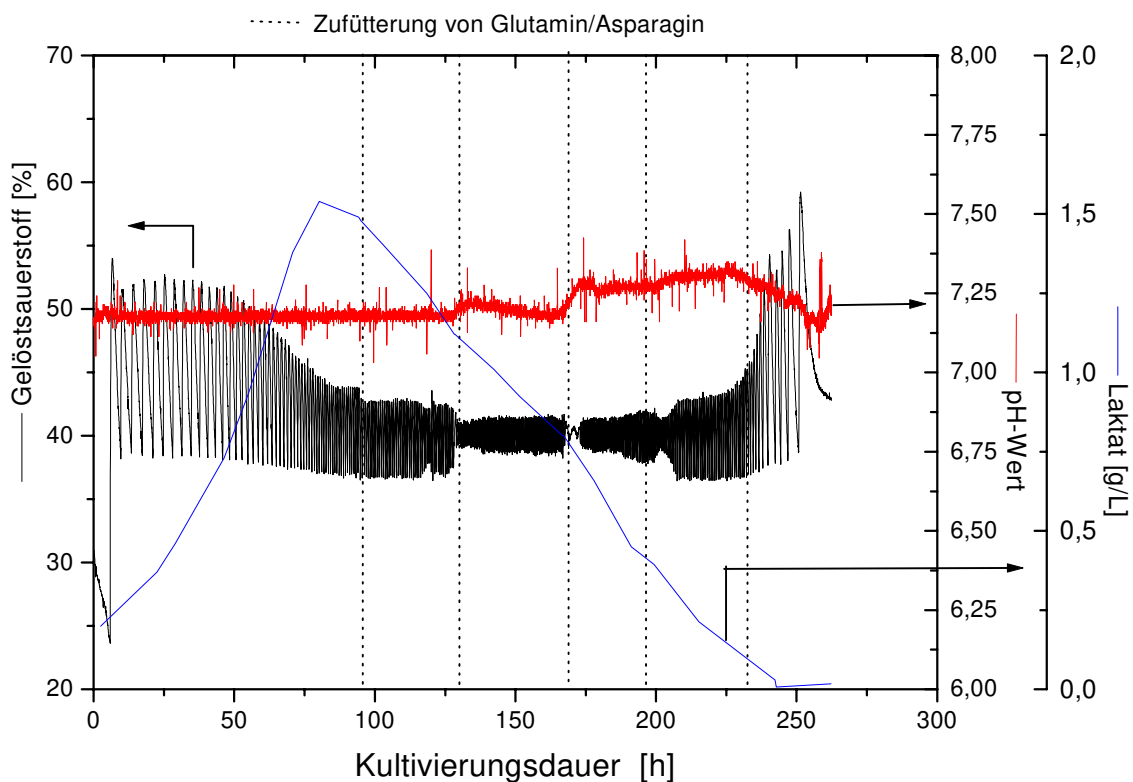


Abbildung 4.7.3.f: Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration und des pH-Wertes während der pulswweisen Fütterung von Aminosäuren.

Die Begasung der Kultivierung wurde mittels Silikon-Schlauchbegasung durchgeführt. Aufgrund der Diffusionsbarriere der Membran unterliegt dieses System einer gewissen Trägheit, die sich durch die Übersteuerung der Konzentrationsamplitude des Gelöstsauerstoffes bemerkbar macht. Der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration zeigt während der exponentiellen Phase eine recht hohe Übersteuerung, die mit zunehmender Zellzahl jedoch abnimmt, und schließlich recht nahe um den Setpoint von 40 % schwingt. Die Fütterung der anaplerotischen Aminosäuren stimuliert eine hohe Atmungsaktivität in den

Mitochondrien, was sich makroskopisch in der kleineren Schwingungsamplitude verfolgen läßt, die jeweils nach einer Fütterung auftritt und andeutet, daß sich der PID-Regler der Steuerungseinheit auf den erhöhten Sauerstoffbedarf der Zellen einstellen muß. Insbesondere die Fütterungen in der 168. und 198. Std. bewirken eine dermaßen gesteigerte Atmungsaktivität, daß eine ununterbrochene Begasung mit reinem Sauerstoff erforderlich ist. In der Absterbephase sind die Einstellungen der PID-Parameter zu hoch und eine wieder einsetzende Übersteuerung des Signals ist zu beobachten.

Die einsetzende Gluconeogenese kann daran erkannt werden, daß der pH-Wert nach 120 Std. wieder leicht steigt, was durch die Metabolisierung der Milchsäure erklärt werden kann. Aus der Literatur ist bekannt, daß der Transport von Laktat an einen Cotransport mit  $H^+$  gebunden ist (siehe theoretischer Teil). Vermutlich kann dies ab der 100. Std. noch von der Pufferkapazität abgefangen werden, was sich aber bei größeren Mengen im Anstieg des pH-Wertes ab der 125. Std. bemerkbar macht.

#### 4.7.3.3 Produktion

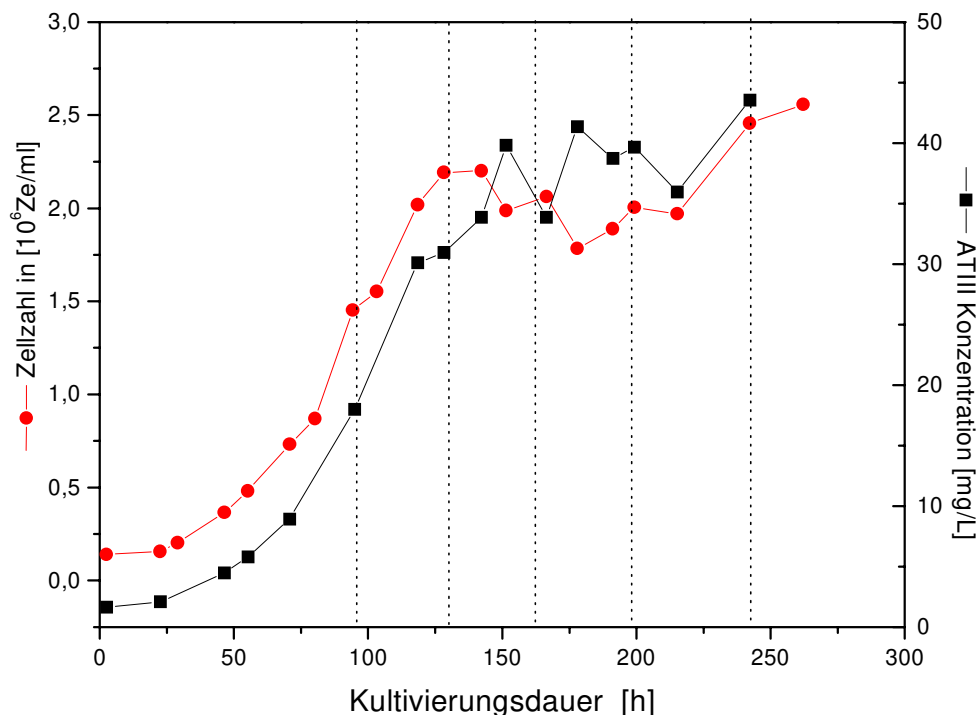


Abbildung 4.7.3.g: Produktion des rekombinanten Glykoproteins unter Glukoselimitierung; gestrichelte Linien geben den Zeitpunkt der Zufütterung an.

Bereits in Kapitel 4.7.2.2 wurde ein Zusammenhang zwischen Zellwachstum und Produktivität besprochen. Dieser scheint sich unter den verlängerten Wachstumseigenschaften zu



bewahrheiten. Insgesamt konnte ein AT-III Titer von 37 mg/L geerntet werden, der im Vergleich zur vorherigen Fermentation um ca. 10-12 mg/L höher liegt. Offensichtlich besteht hier die Verbindung zwischen erhöhtem Produkttiter und der durch die Gluconeogenese induzierten Verlängerung der exponentiellen Wachstumsphase.

#### **4.7.3.4 Zusammenfassung**

Die Fütterung von Aminosäuren der Glutamat-Familie induziert durch die Bereitstellung von ATP das Umschalten von Glykolyse auf Gluconeogenese. So ist auch ohne Glukose weitere Zellteilungsaktivität vorhanden. Die maximale Zellzahl steigt dabei auf über  $2 \cdot 10^6$  Ze/ml, und auch der Produkttiter ist mit 37 mg/L um 35 % höher als vorher.

Laktat wird durch die ständige Zufütterung der Aminosäuren fast vollständig metabolisiert und sorgt indirekt für eine länger anhaltende gute Vitalität der Kultur.

Der Bedarf an der Aminosäure Glutamin ist so immens, daß die pulsweise Nachfütterung von 75 mg/L nur 12 Std. vorhält, und die zeitweilige Limitierung noch immer als maßgeblich für die Wachstumshemmung scheint. Um eine Glutaminverfügbarkeit sicherzustellen, wurde im folgenden für die Detektion des Glutamin ein Fließinjektionssystem entwickelt, das auch zur Steuerung des Prozesses befähigt ist. Das Ziel war die Einhaltung einer niedrigen Glutaminkonzentration innerhalb bestimmter Grenzen (100-150 mg/L).

#### 4.7.4 Optimierung durch kontinuierliche Zufütterung von Glutamin/Asparagin

Die kontinuierliche Zufütterung von Glutamin/Asparagin wurde zunächst manuell reguliert, d.h. mittels einer Schlauchquetschpumpe kontinuierlich die benötigte Menge zugeführt, die sich aus der spezifischen Verbrauchsrate ( $q_{\text{Gln}}$ ) und der Zellzahl ergab.  $q_{\text{Gln}}$  berechnete sich in den vorherigen Versuchen zu  $0,050 \text{ [mg/(10}^6\text{Ze}\cdot\text{d)]}$  in der gluconeogenetischen Phase.

Alle weiteren Parameter blieben konstant, d.h. 100 RPM, 40 %  $p\text{O}_2$ , pH 7,2,  $37^\circ\text{C}$ .

##### 4.7.4.1 Glutaminkonzentrationsprofil

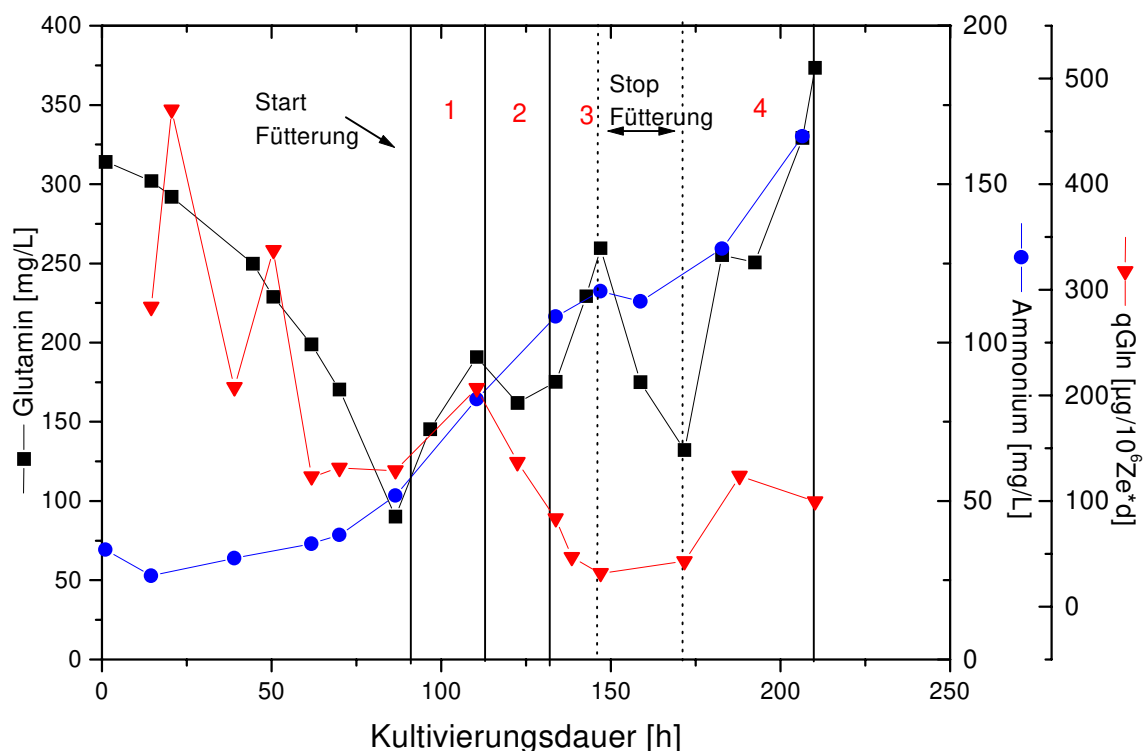


Abbildung 4.7.4.a: Glutamin und Ammoniumkonzentrationsverläufe während der kontinuierlichen Zufütterung von Glutamin/Asparagin ( $0,14\text{mol/L}/0,025\text{mol/L}$ ). Im Intervall 1,3 und 4 beträgt die Zuflußrate =  $430 \text{ [mgGln/(L}\cdot\text{d)]}$ , in Intervall 2 =  $290 \text{ [mg/(L}\cdot\text{d)]}$ .

Ab der 90. Std. wurde mit der kontinuierlichen Zufütterung begonnen, wobei die Zufütterungsrate zunächst auf  $430 \text{ (mg/L}\cdot\text{d)}$  eingestellt wurde. Diese stellte sich aber als zu hoch heraus, da die Konzentration innerhalb kürzester Zeit von 90 auf  $190 \text{ mg/L}$  stieg.

Nach der Reduzierung auf 290 (mg/L·d) zwischen der 110.-133. Std. konnte die Konzentration im Reaktor auf ca. 175 mg/L einreguliert werden. Da dies durch die on-line Messung der zusätzlich mitlaufenden FIA nicht bestätigt wurde und keine Referenzwerte durch die HPLC-Messung vorlagen, wurde die Zufütterungsrate erneut auf den anfänglichen Wert eingestellt. Aufgrund der hier auftretenden Abweichungen zwischen HPLC und FIA wurde auf eine Steuerung der Glutaminkonzentration mittels FIA vorerst verzichtet. Die zu hoch gewählte Zufütterungsrate kann anhand des Anstieg auf 260 mg/L nachvollzogen werden.

Zwischenzeitlich vorliegende Referenzwerte der HPLC bestätigten nunmehr die zu hohe Konzentration, so daß die Fütterung für 24 Std. abgestellt wurde, woraufhin sich ein starker Abfall bis auf 130 mg/L bemerkbar machte. Der zum Schluß auftretende Anstieg in der Konzentration zeigt, daß durch die Absterbephase insgesamt weniger Glutamin metabolisiert wird.

Deutlicher wird dies durch die Einführung der zellspezifischen Verbrauchsrate  $q_{\text{Gln}}$  (Dimension  $[\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ ).  $q_{\text{Gln}}$  beträgt zu Beginn der Kultivierung 190  $[\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ , fällt während der Zufütterung kontinuierlich auf nur noch 35-40  $[\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ . Der Anstieg in der Absterbephase ist durch die geringe Differenzierungsmöglichkeit zwischen toten und lebendigen Zellen gegeben, d.h. durch Tryphanblau als tot charakterisierte Zellen können noch stoffwechselaktiv sein.

Mit Beginn der Glutaminfütterung setzt auch eine massive Ammoniumakkumulation ein. Stieg die Konzentration in der exponentiellen Phase von 26 auf 52 mg/L, so wird aufgrund der hohen Zelldichte eine rapide Zunahme dieses hochgradig toxischen Metaboliten auf 170 mg/L erreicht.

#### 4.7.4.2 Primärstoffwechsel und Biomasse

Die ständige Verfügbarkeit von Glutamin bewirkt eine weitere Zunahme der Biomasse in der exponentiellen Phase. Die Dauer der exponentiellen Phase kann dabei nicht ausgedehnt werden und liegt wie bei Fermentation NGln bei ca. 130 Stunden. Dahingehend ist die Wachstumsrate während der Gluconeogenese mit  $0,57\cdot\text{d}^{-1}$  im Vergleich zu der in der Glykolyse berechneten ( $\mu = 0,832\cdot\text{d}^{-1}$ ) um ca. 30 % gefallen.

Diese war bei Fermentation FGln noch um 57 % von 0,715 auf  $0,308\cdot\text{d}^{-1}$  abgesunken. Die Einteilung der verschiedenen Wachstumsphasen wurde bei beiden Fermentation durch die Limitierung der Glukose vorgenommen. In der maximal erreichten Zellzahl bedeutet das einen Zuwachs von  $1,1\cdot 10^6\text{Ze/ml}$  auf  $3,2\cdot 10^6\text{Zellen pro ml}$ .

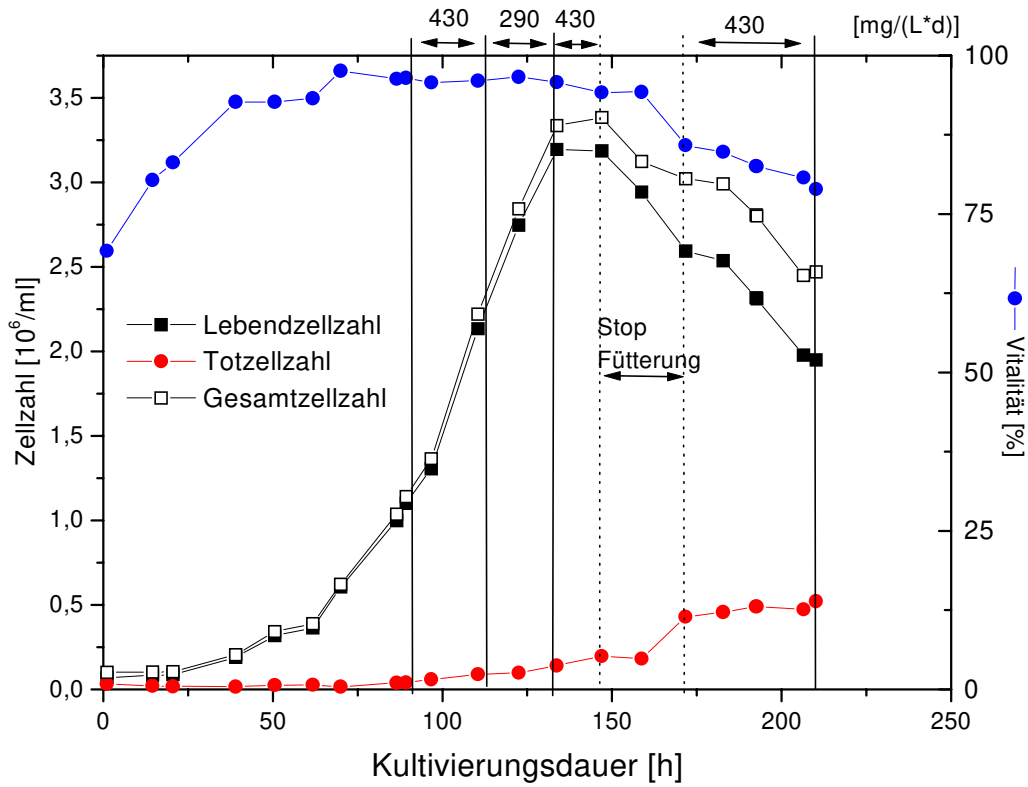


Abbildung 4.7.4.b: Zellzahl und Vitalität bei kontinuierlicher Zufütterung von Glutamin/Asparagin. Die Zufütterungsraten im jeweiligen Intervall sind oberhalb der Abbildung angegeben.

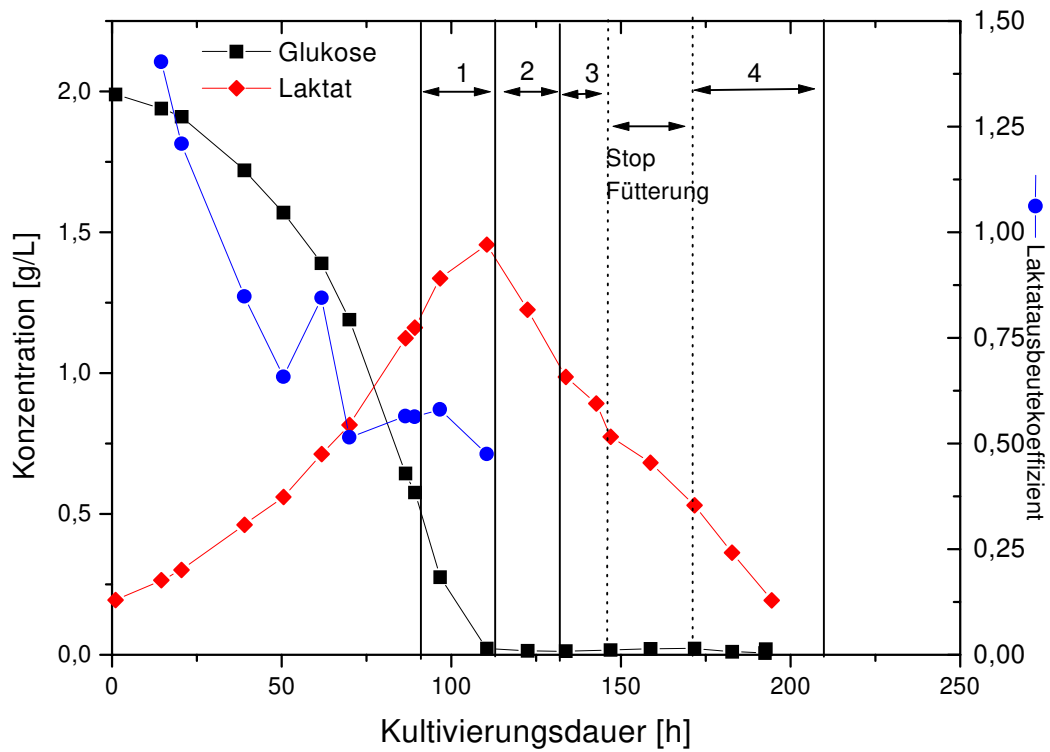


Abbildung 4.7.4.c: Glukose und Laktatverläufe bei der kontinuierlichen Zufütterung von Glutamin. Ziffern kennzeichnen die gleichen Intervalle wie in Abbildung 4.7.4.b.

Die Verläufe von Glukose und Laktat entsprechen denjenigen der Kultivierung FNGIn. Nachdem Glukose als Primärsubstrat nach ca. 100 Std. verstoffwechselt ist, beginnen die Zellen mit der Metabolisierung des Laktat, welches zwischen der 97. und 124. Std. bei ca. 1,45 g/L ein Maximum durchläuft. Das Maximum entspricht einer Gesamtlaktatausbeute von 73 %, was mit den Ergebnissen anderer Batchversuche identisch ist.

Ob eine Umstellung aller Zellen erst ab der Glukoselimitierung erfolgt, ist zweifelhaft, vielmehr wird eine stufenweise Umstellung in Betracht gezogen, d.h. die Enzyme beider Stoffwechselabbauwege sind regulatorischen Bedingungen unterworfen. Eine Validierung dieser Hypothese wurde in einer weiteren Fermentation unternommen. Dort wurde während der Gluconeogenese eine Glukosefütterung eingeleitet. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.7.5 besprochen.

#### 4.7.4.3 Gesamt-Aminosäurestoffwechsel

Der Aminosäurestoffwechsel ist eng mit dem Wachstum verknüpft, da ein großer Teil in die Synthese neuer Biomasse einfließt, d.h. zum Aufbau neuer Proteine, Lipide, DNA und RNA.

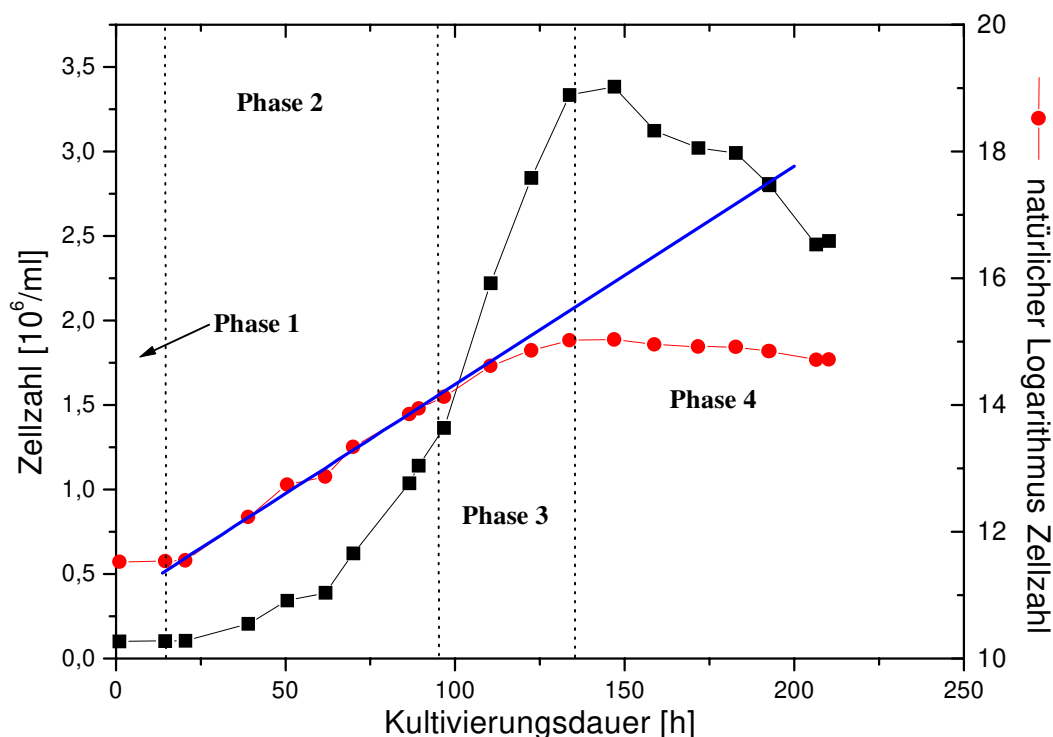


Abbildung 4.7.4.d: Einteilung der Wachstumsphasen, die für die Berechnungsgrundlage der spezifischen Verbrauchs- oder Bildungsraten der Aminosäuren notwendig sind. Phase 1: lag-Phase; Phase 2: exponentielle Wachstumsphase 1 (Glykolyse, Aminosäurestoffwechsel dient primär der Biosynthese; Phase 3: exponentielle Wachstumsphase 2 (wie Phase 2, aber Gluconeogenese); Phase 4: stationäre Wachstumsphase und Absterbephase (Aminosäurestoffwechsel dient der Energiegewinnung).

Bei genauerer Betrachtung der Konzentrationsverläufe liegt unter Wachstumsbedingungen eine andere Charakteristik vor, als in der stationären Phase, wo der Stoffwechsel mehr der Energieproduktion, d.h. der Erhaltung zellulärer Einheiten dient. Die ersten 15 Std. der Kultivierung wurden nicht berücksichtigt, da der spezifische Aminosäureverbrauch in der Adaptionsphase deutlich höher ist als in der Wachstumsphase. Vor dem Wachstum wird hier die Adaptierung und Konditionierung der neuen Umgebung durchgeführt.

Prinzipiell kann die Kultivierung aufgrund des Stoffwechselverhaltens in drei Phasen eingeteilt werden: exponentielle Wachstumsphase 1 und 2, stationäre Phase und Absterbephase, wobei bei letzteren ein nur geringer Unterschied besteht und sie deswegen zusammen betrachtet werden. Die nach der Verstoffwechslung der Glukose geringe Wachstumsgeschwindigkeit tritt durch die gewählte logarithmische Auftragung noch einmal deutlicher zum Vorschein. Der lineare Zusammenhang ist ab der 110. Std. nicht mehr gegeben und weicht mit fortlaufender Zeit immer mehr ab. Nachdem ab der 148. Std. ein quasi-stationärer Zustand erreicht wird, treten im Aminosäurestoffwechsel eingreifende Veränderungen vor. Dieser Unterschied wird durch die in spezifischen Verbrauchs- bzw. Bildungsgraten der Aminosäuren dokumentiert, welche in Tabelle 4.7.4.a zusammengefaßt sind.

Komponente	Glykolyse	Gluconeogenese	stat. Zustand tendenzieller Verlauf
Glutamin	-186,28	-137,7	verstoffwechselt
Serin	-30,88	-8,23	leicht verst.
Tyrosin	-10,82	-6,19	leicht verst.
Threonin	-10,03	-6,88	leicht verst.
Leucin	-30,07	-21,48	leicht verst.
Isoleucin	-16,03	-16,27	leicht verst.
Aspargin	-38,13	-	leicht verst.
Aspartat	-31,27	-8,856	produziert
Valin	-13,95	-9,24	leicht verst.
Lysin	-36,55	-16,56	leicht verst.
Methionin	-6,144	-4,10	leicht verst.
Arginin	-38,68	-21,88	leicht verst.
Glycin	-9,26	9,76	produziert
Tryptophan	-4,73	-4,56	leicht verst.
Cystein	-8,55	-3,03	leicht verst.
Phenylalanin	-10,83	-6,86	erschöpft
Alanin	39,84	38,64	produziert
Glutamat	7,26	-8,41	produziert

Tabelle 4.7.4.a Vergleich der spezifischen Verbrauchs- und Bildungsgraten in verschiedenen Kultivierungsphasen. Einheit Rate:  $[\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ . Positives Vorzeichen deutet auf Produktion, negatives Vorzeichen auf Verstoffwechslung hin.

Die in Tabelle 4.7.4.a präsentierten Raten wurden allesamt mittels „least-square-fit“ aus den experimentellen Daten berechnet. Die Werte verdeutlichen, daß grundsätzlich alle spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten in der Gluconeogenese niedriger liegen als in der Glykolyse. Die Verstoffwechslungsrate  $q_{\text{Gln}}$  z.B. wurde in der exponentiellen Phase zu  $186[\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$  berechnet, wohingegen der Wert in der Gluconeogenese fast 25 % geringer ( $137 [\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ ) ist. Einen Abfall in dieser Größenordnung war bei vielen der Aminosäuren erkennbar (Tyrosin, Threonin, Valin, Methionin, Arginin, Phenylalanin, und Leucin), der noch deutlicher bei Serin, Lysin und Cystein ausfiel (bis zu 75%). Die spezifischen Aufnahmeraten von Isoleucin, und Alanin blieben konstant, während bei Glutamat und Glycin sogar eine Umkehrung von Produktion nach Verbrauch, bzw. anders herum transient war. Dieser Zusammenhang wird im weiteren diskutiert.

Der Grund für den Abfall im spezifischen Verbrauch mag mit der generellen Verfügbarkeit eines jeden Substrates zusammenhängen, die sich im Laufe dieses Kultivierungsmodus verschlechtert, d.h. der Konzentrationsgradient zwischen Cytosol und extrazellulärem Raum wird kleiner. So war schon im Glukosestoffwechsel festgestellt worden, daß bei niedriger Eingangskonzentration eine bessere Ausbeute bezüglich der Biomasse und weit weniger Laktat gebildet wird. Ein analoges Verhalten würde auch die verminderte Verstoffwechslung der Aminosäuren erklären.

Andererseits ist auch ein „Feedback“ einer gewissen Komponente denkbar, die den „Motor“ des Stoffwechsels darstellt, und dessen geringerer Durchsatz sich auf alle anderen negativ auswirkt. Sicherlich spielt weiterhin die ständig zunehmende Konzentration toxischer Metabolite eine beeinflussende Rolle, zumal Schrittmacherenzyme leicht inhibiert werden können.

#### **4.7.4.4 Alaninstoffwechsel**

In Kapitel 4.6.2.2 wurde vermutet, daß die Bildung von Alanin zur Entgiftung des Ammoniaks eng mit der Existenz von Glutamat verbunden sei. Dort war bei Glutamatmangel die verstärkte Detoxifizierung über die Glycinproduktion verlaufen.

Da hier die ständige Fütterung Glutamin auch die Glutamatversorgung sicherstellte war, wurde eine gleichbleibende höhere Alaninproduktion erwartet.

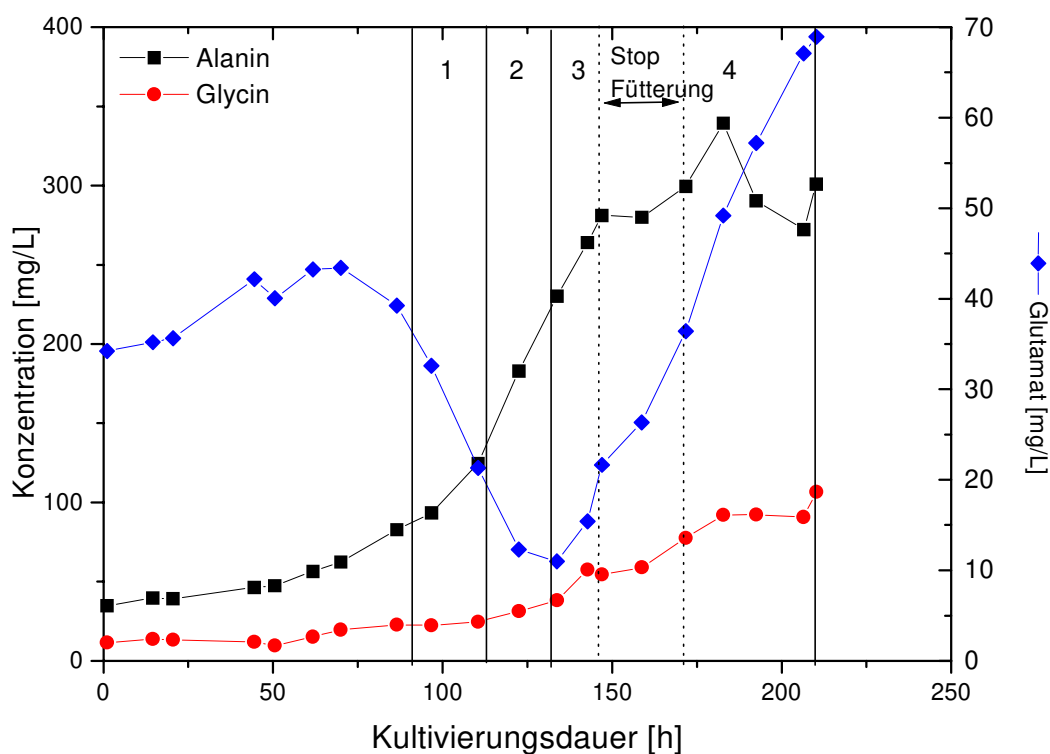


Abbildung 4.7.4.e: Die Alaninproduktion ist abhängig von der Glutamatkonzentration. Dies zeigen die Konzentrationsverläufe der involvierten Metabolite.

Erwartungsgemäß wurde die gleichbleibende spezifische Produktion von Alanin (38-40  $[\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ ), bis zum Erreichen des stationären Zustandes (145. Std.) beobachtet, von dort an blieb die Konzentration beinahe konstant. Unter glutaminlimitierten Bedingungen, wie in Fermentation FNGIn, war keine gleichbleibende Alaninproduktion möglich gewesen.

Im Gegensatz zur Wachstumsphase setzt hier die erneute Glutamatproduktion ein, vielleicht als Anzeichen für eine nicht mehr mögliche Transaminierung von Glutamat zu Alanin. Grundsätzlich scheinen im Falle des stationären Wachstum eingreifende Veränderungen im Stoffwechsel vorzugehen, die in diesem Zusammenhang keine weiteren Erkenntnisse bringen, zumal die Absterbephase keinen weiteren Nutzen für den Prozeß darstellt und man notwendigerweise aus protektorischen Gründen für das Produkt die Fermentation abbrechen müßte.

#### 4.7.4.5 Limitierung des Wachstum durch aromatische Aminosäuren

Für den Wachstumstop ab der 145. Std. könnte die vollständige Verstoffwechslung der aromatischen Aminosäure Phenylalanin verantwortlich sein, von der man weiß, daß sie zu den



essentiellen Aminosäuren gehört. Außer zur Proteinbiosynthese wird sie im Stoffwechsel noch über Tyrosin zu Fumarat abgebaut und kann somit den Citratcyklus auffüllen.

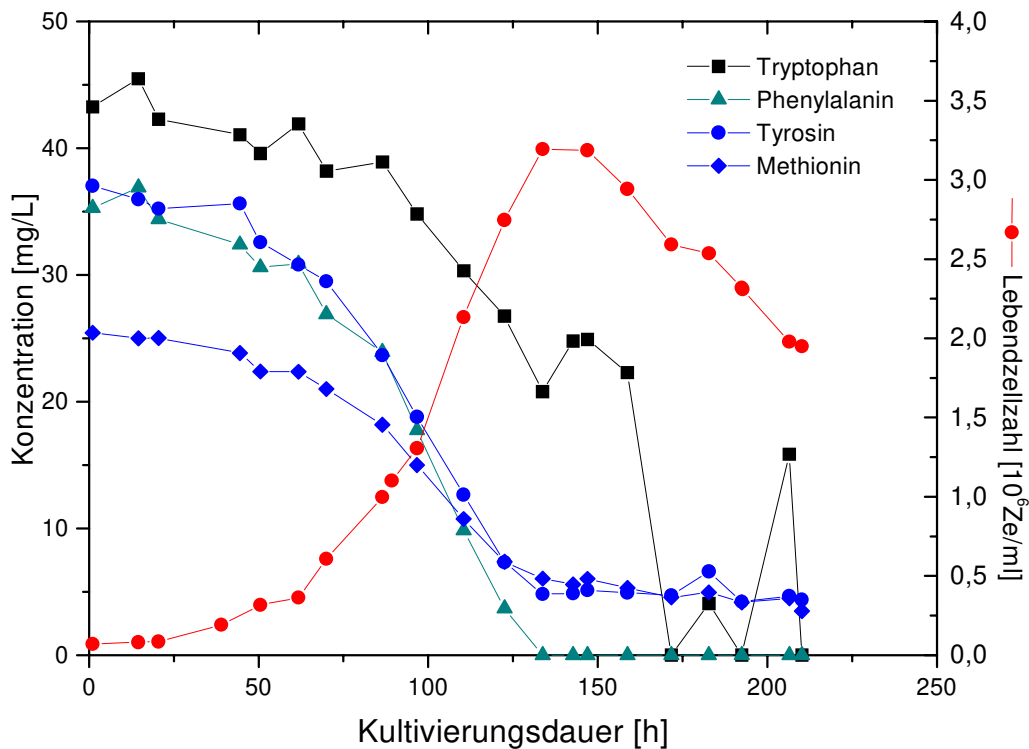


Abbildung 4.7.4.f: Konzentrationsverlauf einiger aromatischer und/oder essentieller Aminosäuren, durch dessen Verbrauch eine Wachstumslimitierung induziert wird.

Insbesondere die Aminosäure Phenylalanin wird innerhalb von 135 Std. vollständig verbraucht. Nach deren Erschöpfung stellt sich kein Zellwachstum mehr ein und auch weitere, vorwiegend für die Proteinbiosynthese benötigte essentielle Aminosäuren, werden nicht weiter metabolisiert (siehe auch Tabelle 4.7.4.a.). Der Einfluß dieser aromatischen Aminosäuren wurde in späteren Versuchen untersucht (siehe Kapitel 4.7.6).

#### 4.7.5 Einfluß der Glukoseeingangskonzentration (FredGlc)

Vorversuche im Spinnermaßstab konnten zeigen, daß die maximal erreichbare Zellzahl nicht unbedingt von der eingesetzten Glukosemenge abhängig ist. Die Tendenz zur massiven Verschwendung dieser Kohlenstoffquelle führt üblicherweise schon bald zur Inhibierung des Wachstums durch das Abbauprodukt Laktat. Es hatte sich bei Betrachtung des Ausbeutekoeffizienten Lac/Gluc schon abgezeichnet, daß mit abnehmender Glukosekonzentration auch der Laktatausbeutekoeffizient sinkt. Bei üblichen Medien ist die

Eingangskonzentration so hoch (3-3,5 g/L bei DMEM modifizierten Medien), daß dieser Effekt bisher nicht beobachtet werden konnte, weil die Laktatverwertung oberhalb 1,5 g/L Glukose konstant ist und in diesem Bereich schon die Wachstumsinhibierung durch Laktat einsetzte. Eine Beurteilung der Laktatverwertung unterhalb 1 g/L war somit nicht mehr möglich. Tatsächlich scheint die Tendenz der Glukoseverschwendung unter 1,5 g/L nicht mehr prädominant zu sein. Die metabolische Flußanalyse zeigt, daß durch den massiven Glukosefluß Glykolyse und Citratcyklus nicht ausbalanciert sind. Erst durch den verminderten Glukosefluß in die Zelle greifen beide Abbauege besser ineinander. Eine Reduzierung der Glukose und damit des Gradienten zwischen Cytoplasma und Medium sollte dies bestätigen. Zu diesem Zweck wurde in der folgenden Kultivierung die Glukoseeingangskonzentration auf 1,5 g/L reduziert. Die zu einem späteren Zeitpunkt der Kultivierung eingeleitete Fütterung von Glukose zielte darauf hin, den Effekt der Substratspezifität in der Gluconeogenese studieren zu können.

#### 4.7.5.1 Wachstumskurve

Die Reduzierung der Glukose führt zu einer auf dem ersten Blick nicht verständlichen Maximierung der Gesamtzellzahl. Es wurde eine maximale Zellzahl von  $4,2 \cdot 10^6$  Ze/ml erreicht. Aber auch die Wachstumsrate war mit  $0,96 \cdot d^{-1}$  deutlich höher als sonst (Abbildung 4.7.5.b). Bisher wurden Wachstumsraten im Bereich von  $0,6-0,7 \cdot d^{-1}$  erreicht.

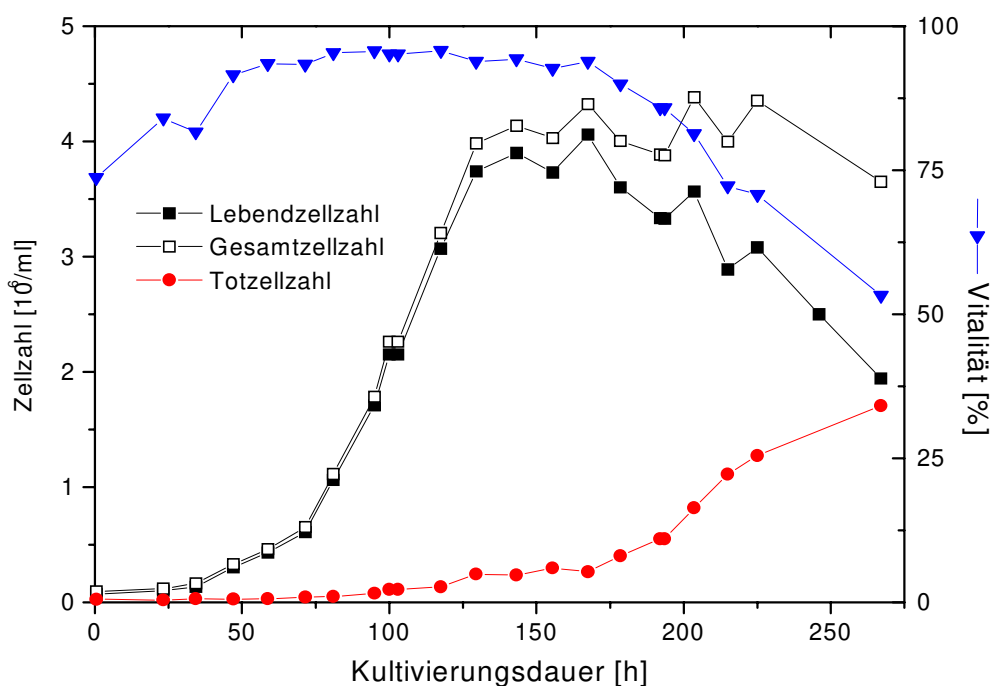


Abbildung 4.7.5.a: Zellzahlentwicklung bei reduzierter Glukoseeingangskonzentration.

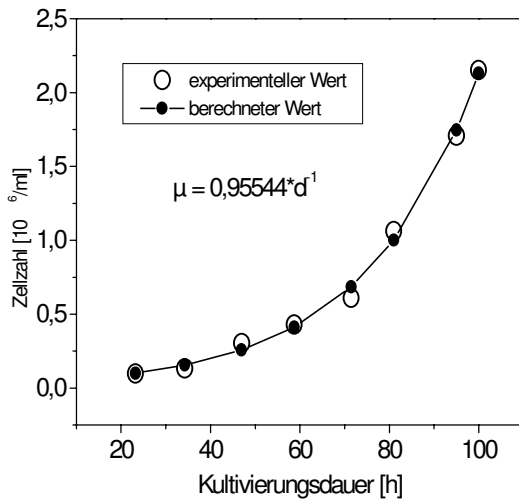


Abbildung 4.7.5.b: Mittels „least-square-fit“ berechnete Wachstumsrate in der exponentiellen Phase.

Die Berechnung der Wachstumsrate war nur im Zeitintervall zwischen 15.-100. Std. möglich, denn wie die exponentielle Darstellung zeigte, war auch hier eine Verminderung der Wachstumsrate in der Gluconeogenese fest stellbar. Diese berechnete sich zu  $\mu = 0,444 \cdot \text{d}^{-1}$  (102.-145. Std.). Die Gesamtzellzahl liegt mit ca.  $4,2 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  von der 145.-225. Std. lange auf einem konstanten Wert. Ein Vitalitätsverlust wird hier erst ab der 165. Std. sichtbar, der im weiteren Verlauf bis auf 53 % sinkt, bevor in der 265. Std. die Kultivierung abgebrochen wurde.

#### 4.7.5.2 Glukose und Laktatmetabolismus

Bei der Betrachtung des Glukosestoffwechsels kann unter diesen Umständen eine Gesamtlaktatausbeute von 56 % berechnet werden. Diesbezüglich werden aus 1,5 g/L Glukose nur 0,84 g/L Laktat produziert. Bisher war unter geregelten Bedingungen ein Ausbeutekoeffizient von 0,75 errechnet worden, unter ungeregelten Bedingungen im kontinuierlichen Betrieb ein durchschnittlicher Wert von 0,95, im Batch-Betrieb sogar größer eins. Anscheinend ist Laktatverwertung eine Funktion zweier Variabler: Einerseits scheint sie von der Gelöstsauerstoffkonzentration abhängig zu sein, zum anderen aber auch von der Glukoseeingangskonzentration.

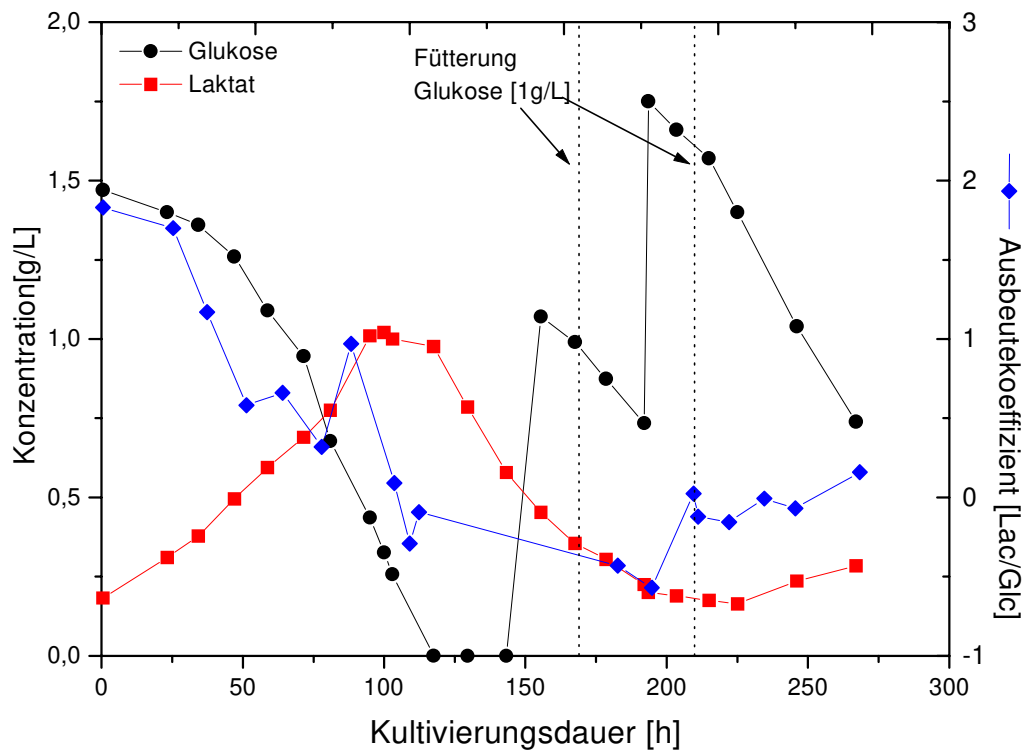


Abbildung 4.7.5.c: Verlauf der Glukose und Laktatkonzentration, sowie des Ausbeutekoeffizienten Laktat/Glukose.

Tatsächlich werden unter sauerstofflimitierten Bedingungen, die sicherlich bei Batch-Versuchen in Spinnerflaschen vorliegen, größere Mengen Laktat produziert als unter sauerstoffgeregelten Bedingungen. In Kapitel 4.3 wurde schon erklärt, daß die Menge des produzierten Laktats abhängig von der Regenerierung des Cofaktors  $\text{NAD}^+$  ist. Die starke Glykolyse transformierter Zellen verbraucht große Mengen  $\text{NAD}^+$ , welches normalerweise in der Atmungskette rückoxidiert wird. Bei sauerstofflimitierten Bedingungen ist keine Regenerierung möglich, die Zelle hilft sich, indem sie Pyruvat anaerob zu Laktat umwandelt, eine zweite Möglichkeit  $\text{NAD}^+$  zu regenerieren.

Da unter den geregelten Bedingungen keine Sauerstofflimitierung vorliegt, erscheint die Hypothese der Herabsetzung des Glukosegradienten zwischen Cytosol und Medium plausibel<sup>[7][88][89]</sup>. Wie in Abbildung 4.7.5.c zu erkennen, ist  $\theta_{\text{Lac/Gluc}}$  in der Lag-Phase wiederum größer als eins. Doch schon bei Unterschreiten einer Glukosekonzentration von 1,0 g/L liegt der Ausbeutekoeffizient bei 0,3-0,5, und kurz vor dem vollständigen Verbrauch wird kaum noch Laktat produziert. Dies mag aber auch mit der einsetzenden Gluconeogenese zusammenhängen, die durch die Verstoffwechslung des Laktats ab der 103. Std. eindeutig charakterisiert ist.

Interessanterweise wurde nach der erneuten Zufütterung von Glukose in der 150. Std. keine Laktatproduktion beobachtet. Erst die Nachfütterung in der 192 Std. bewirkt eine zeitverzögerte, aber einsetzende Laktatproduktion.

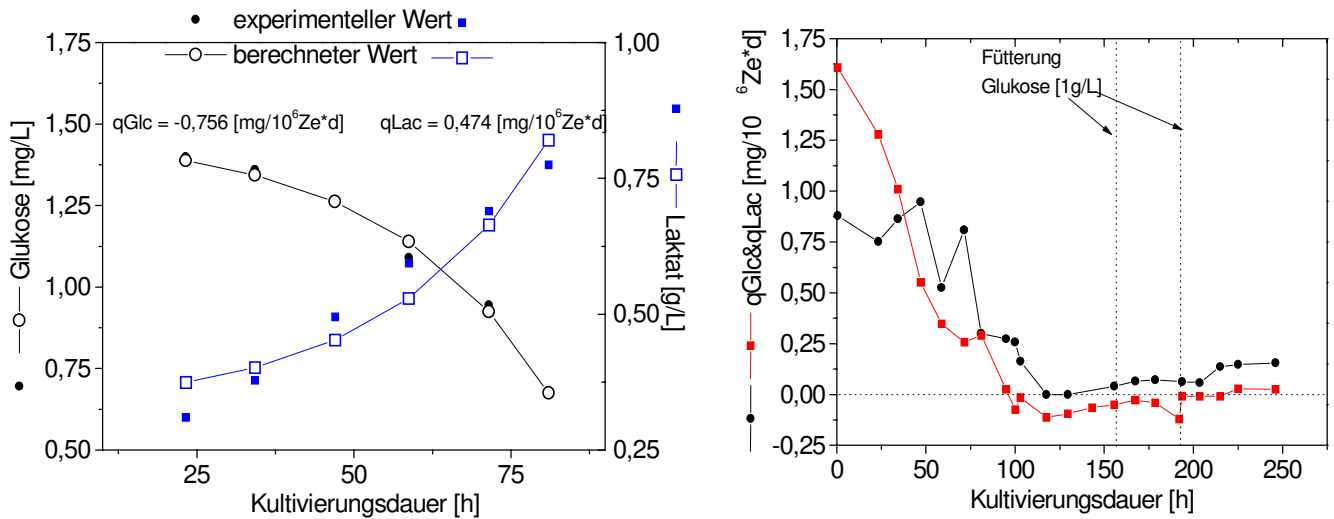


Abbildung 4.7.5.d und e: Spezifische Verbrauchs- bzw. Bildungsdaten für Glukose und Laktat. Links: Berechnung über „least square fit“ im ausgewählten Intervall (23.-81. Std.). Rechts: Berechnung über die experimentellen Daten.

Die Präsentation der spezifischen Verbrauchs- bzw. Bildungsdaten für Glukose und Laktat zeigt folgendes: In der exponentiellen Phase sind sowohl  $q_{Glc}$  als auch daraus resultierend  $q_{Lac}$  verhältnismäßig gering bis zur ca. 81 Stunde. So beträgt  $q_{Glc}$  0,8-0,9  $[\text{mg}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$  im arithmetischen Mittel und 0,756  $[\text{mg}/10^6\text{Ze}\cdot\text{d}]$  über „least square fit“-Lösung. Dahingegen sinkt  $q_{Lac}$  im Verlauf der exponentiellen Phase von 1,2 auf 0,25  $[\text{mg}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ . Dies bestätigt auch die Berechnung über die „least-square-Prozedur ( $q_{Lac} = 0,474 \text{ [mg}/10^6\text{Ze}\cdot\text{d}]$ ), da hier deutliche Abweichungen zwischen Fit-Funktion und experimentellen Daten bestehen. Dies zeigt aber noch einmal, daß die Laktatproduktion bei Reduzierung der Glukose abnimmt. Wie gewohnt ist in der frühexponentiellen Phase die Laktatproduktion höher als der Glukoseverbrauch, was durch den Abbau von Glutamin über den „Malat-Shunt“ möglich ist. In den letzten 24 Std. vor der vollständigen Verstoffwechslung ist trotz Glukoseverbrauch keine Laktatproduktion mehr feststellbar.

In der Gluconeogenese beträgt die spezifische Laktatverbrauchsrate ca. 0,1  $[\text{mg}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ , welche um den Faktor 4 kleiner ist als die spezifische Glukoseverbrauchsrate bis zur 81. Std., aber nur um 50 % niedriger liegt als  $q_{Glc}$  in der spätexponentiellen Phase. Nach der Fütterung von Glukose in der 143. Std. zeigt sich zwar eine spezifische Glukoseverbrauchsrate von 0,065

[mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)], diese ist aber nur geringfügig höher als qLac mit 0,045 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)]. Der spezifische Laktatverbrauchsrate hingegen ist nach der Glukosefütterung ca. 55 % niedriger als vor der Fütterung.

Diese Tatsache läßt vermuten, daß sowohl Gluconeogenese als auch Glykolyse in der Zelle koexistent sind. Wie groß der Durchfluß durch beide Abbauwege ist, bleibt unklar, zumal die Möglichkeit besteht, daß Laktat, welches in der Glykolyse produziert wird, durch die Gluconeogenese der Zellen wieder verwertet wird, d.h. der makroskopisch meßbare Laktatverbrauch eine Nettobilanz aus Produktion und Verbrauch darstellt.

Die allmählich auftretende Nettoproduktion (0,025 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)]) von Laktat nach der zweiten Fütterung in der 191. Std. dokumentiert, daß sich nach und nach eine Aktivitätsverschiebung zugunsten der Enzyme der Glykolyse eingestellt, denn auch der spezifische Glukoseverbrauch nähert sich wieder dem Wert der spätexponentiellen Phase (0,125 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)]).

Die Frage, ob zwei unterschiedliche Zellpopulationen (d.h. eine die sich in der Glykolyse und eine andere, die sich in der Gluconeogenese befindet), oder ein Zelltyp mit beidseitig aktivierten Enzymsystemen vorliegt, kann ohne nähere Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivitäten nicht beantwortet werden. Die Tatsache, daß bei Eukaryonten bisher keine genetische Induktion bestimmter Enzyme festgestellt wurde, d.h. alle Enzyme in aktivierter oder inaktivierter Form präsent sind, spricht für die letztere Theorie und den obigen Diskussionsansatz.

Dies bedeutet dann, daß Schlüsselenzyme reversibel gehemmt werden und nur allmählich im Substratüberschuß wieder in ihrer gewohnten Weise nach der Michaelis-Menten-Kinetik agieren.

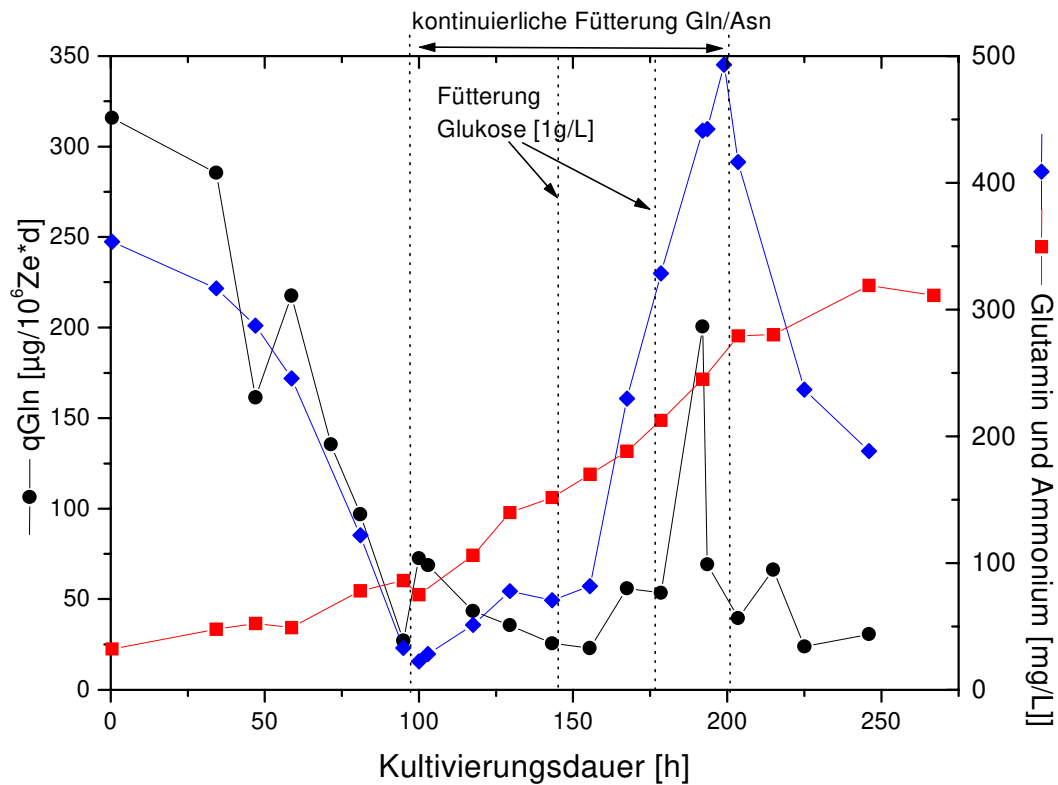


Abbildung 4.7.5.f: Konzentrationsverläufe von Glutamin und Ammonium, sowie die daraus berechnete spezifische Verbrauchsrate qGln. Die Zufütterungsrate wurde folgendermaßen eingestellt: ab 100. Std.  $V= 250 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ , ab 129 Std.  $V= 125 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ , und ab 155 Std.  $V= 420 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ .

In der exponentiellen Phase wurde für Glutamin eine durchschnittliche Verbrauchsrate von  $206 \text{ } [\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$  berechnet („least square fit“), die durchaus mit anderen Fermentationen übereinstimmt. Dort konnte ein durchschnittlicher Wert von  $0,19\text{-}0,20 \text{ } [\text{mg}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$  bestätigt werden. Für die Beurteilung und Verifizierung der Ergebnisse bezüglich der spezifischen Glukoseverbrauchsrate kann somit ausgeschlossen werden, daß aufgrund einer Stoffwechselstörung ein grundsätzlich anderes Zellverhalten vorliegt. Der wenig erhöhte Verbrauch könnte sogar dafür sprechen, daß aufgrund der verminderten ATP-Produktion über die Glykolyse ein Ausgleich über den Citratcyklus geschaffen wird.

In der Fütterungsphase, die ab der 100. Std. einsetzt, fällt qGln von  $0,1$  bis auf  $0,035 \text{ } [\text{mg}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})]$ , was auch bei Fermentation FCtrGln der Fall war.

Die wiederum inkorrekten Daten der Glutamin FIA wirkten sich in einer fehlerhaft eingestellten Glutaminzufütterungsrate aus. Die Anfangszulauftrate von  $250 \text{ } [\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})]$  ab der 100 Std. erwies sich nach 24 Std. als zu hoch, da auch die on-line-Werte den Anstieg auf  $75 \text{ mg/L}$  dokumentierten. Daraufhin wurde die Zufütterungsrate auf  $125 \text{ } [\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})]$  abgesenkt. Dies äußerte sich in den off-line Werten sehr positiv, da eine Konzentration von  $80 \text{ mg/L}$  über

25 Std. konstant gehalten werden konnte. Da on-line kein Glutamin mehr nachweisbar war und mangels einer simultanen Referenzanalytik ein Überprüfung nicht erfolgen konnte, wurde die Fütterungsrate wiederum erhöht.

Die Zufütterungsrate 420 [mg/(L·d)] erwies sich jedoch als deutlich zu hoch, so daß der Konzentration bis zur 200 Std. auf fast 500 mg/L stieg. Die Überdosierung der Konzentration zeigt jedoch, daß durch den induzierten Substratdruck die spezifische Glutaminverbrauchsrate wieder auf 80-90 [ $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$ ] ansteigt. Als Folge der unkontrollierten Glutaminzufuhr steigt auch die Ammoniumkonzentration drastisch an. Konnte man bis zum Ende der exponentiellen Phase einen Anstieg von 30 auf 85 mg/L messen, so kommt es in der Zufütterungsphase zu einer Akkumulation bis auf 280 mg/L (20 mmol/L), welche den toxischen Schwellenwert von 8-10 mmol (Schläger und Schumpp,1989)<sup>[90]</sup> deutlich übertrifft. Die Vitalität der Kultivierung sinkt ab der 179. Std. fortlaufend, zu dieser Zeit beträgt die Ammoniumkonzentration 215 mg/L (12 mmol/L). Auch dieser Wert ist noch oberhalb des postulierten Wertes. Es ist unklar, ob die Abnahme der Vitalität eine Folge des toxischen Ammoniumgehaltes darstellt, oder auf einen Substratmangel der essentiellen Aminosäuren zurückzuführen ist. Eine Akkumulation des Ammoniaks läßt sich durch die in dieser Phase notwendige Glutaminolyse nicht vermeiden. Andererseits ermöglicht diese Fütterungstechnik eine Kultivierung mit hoher Vitalität von bis zu 180 Stunden.

Unter dem Aspekt der Biomasse- und Produktsteigerung scheint die Frage der toxischen Ammoniumkonzentration ohnehin nicht angebracht, da sich die Kultivierung ab der 145. Std. in der stationären Phase befindet, zu diesem Zeitpunkt beträgt der Ammoniumgehalt 150 mg/L (8,3 mmol). Weit wichtiger ist die Frage nach der Wachstumsinhibierung durch Ammonium, die Rössler (1995)<sup>[49]</sup> bei dieser Zelllinie ab 6 mmol/L feststellen konnte und gut mit dem Einsetzen der stationären Phase übereinstimmt. In Übereinstimmung mit der Literatur ist die inhibierende Wirkungsweise des Ammonium sehr komplex<sup>[91][92]</sup> und für viele Zelllinien sehr unterschiedlich<sup>[93]-[95]</sup>. Neuerdings scheint bewiesen, daß insbesondere der durch Ammonium beeinflusste UDP-GNAc-Pool für die Variabilität der Glykoproteinstruktur verantwortlich ist<sup>[96][97]</sup>. Dies ist auch für die Produktion des rekombinanten Produktes von Bedeutung<sup>[5]</sup>.

#### 4.7.5.3 Aminosäurestoffwechsel

Ähnlich wie bei Kultivierung FCtrGln kann eine vollständige Verstoffwechslung weiterer essentieller Aminosäuren ab der 125. Std. beobachtet werden. Will man den Wachstumsstop begründen, muß man diesen Einfluß an erster Stelle nennen.



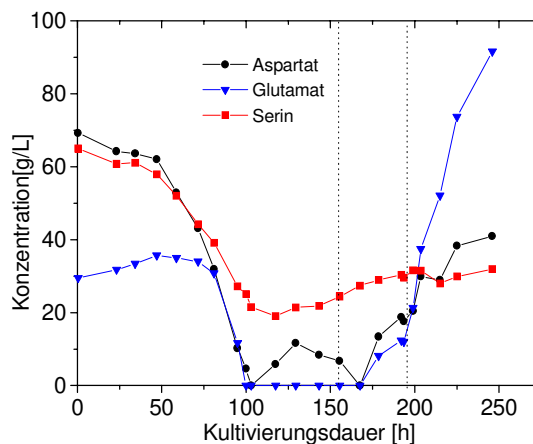
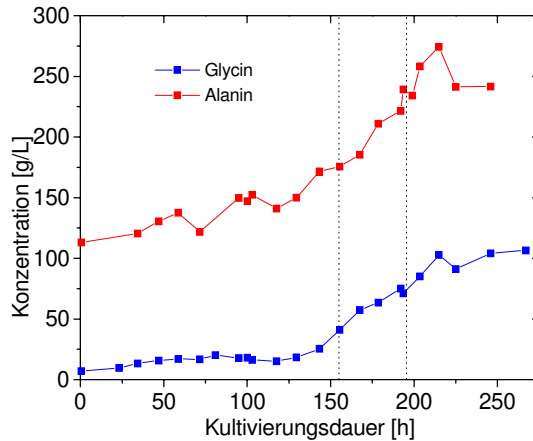
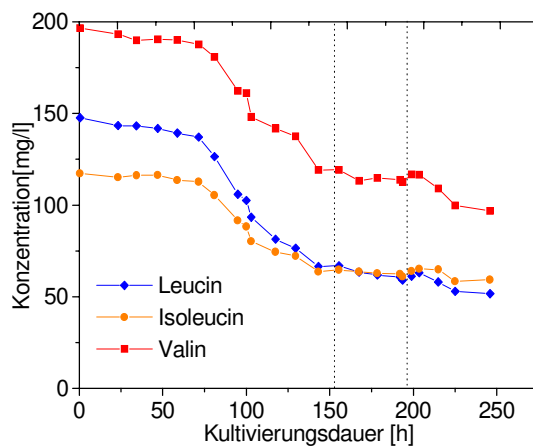
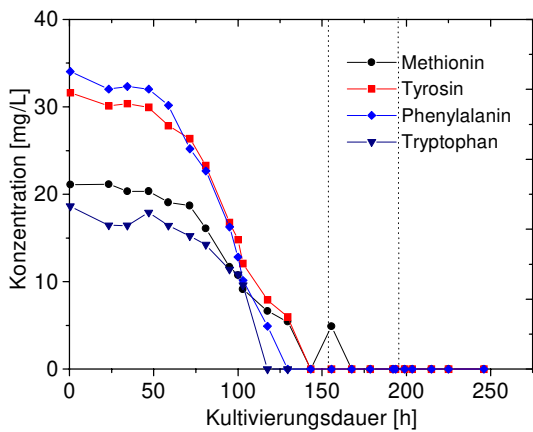


Abbildung 4.7.5.g: Bild oben: Verlauf der essentiellen Aminosäuren Methionin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Bild 2 von oben: Verlauf der Aminosäuren, die in höherer Konzentration vorliegen. Bild 3 von oben: Verhalten der Aminosäuren, die mit dem katabolen und anabolen Stoffwechsel verknüpft sind: Glutamat, Aspartat und Serin. Bild 4 von oben: Alanin und Glycin

In chronologischer Abfolge werden ab der 125. Std. die Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin und Methionin vollständig metabolisiert. Der Zeitpunkt fällt mit der Wachstumsstagnation der Zellen zusammen. Der spezifische Verbrauch ist in der Glykolyse am höchsten und fällt dann während der Gluconeogenese. Nach der Verstoffwechslung der essentiellen Aminosäuren nimmt die Konzentration derjenigen Aminosäuren, die verstärkt in der Biosynthese benötigt werden, nur noch geringfügig ab (Bild 2 von oben) und ist ein weiteres Indiz für den Wachstumsstopp ab der 145. Stunde. Es scheint auch hier unvermeidlich die genannten Aminosäuren zu füttern oder in höherer Anfangskonzentration zu supplementieren. Im weiteren Verlauf dieser Optimierungsstrategie wird auch der Einfluß der Nachfütterung dieser Aminosäuren untersucht.

Grundsätzlich andersartig verhalten sich die Aminosäuren, die den Citratcyklus direkt anaplerotisch bei  $\alpha$ -Ketoglutarat bzw. bei Oxalacetat auffüllen oder die Aufgabe haben, den Ammoniak zu binden, der in hohem Grade durch die Glutaminolyse freigesetzt wird.

Glutamat und Aspartat werden zu Beginn der Kultivierung gewohnt verstoffwechselt. Danach

kann Glutamat von der 100.-150. Std. nicht mehr detektiert werden, obwohl Glutamin ständig verfügbar ist. Ab der 175. Std. steigt die Glutamatkonzentration jedoch wieder bis auf 65 mg/L an. Der Vergleich mit Fermentation FCtrGln zeigt jedoch ein analoges Verhalten, dort konnte auch zu Beginn der Fütterungsphase Glutamat nachgewiesen werden. Es zeigt sich jedoch, daß die spezifische Verbrauchsrate von Glutamin dort mit 0,125 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)] doppelt so hoch war, somit also auch mehr Glutamat durch Glutaminolyse generiert wird, als für die Biosynthese, Transaminierung und Desaminierung zu  $\alpha$ -Ketoglutarat benötigt wird, welches dann ausgeschleust wird. Der letztendliche Anstieg zeigt noch einmal die Auswirkung der nicht mehr vorhandenen Biosynthese ab der 150. Stunde.

Glycin und Alanin werden über den gesamten Fütterungsbereich produziert und binden den in der Glutaminolyse frei werdenden Ammoniak. Die Tatsache, daß auch Serin bei Beginn der Gluconeogenese wieder produziert wird, könnte damit zusammenhängen, daß durch die Reversibilität der Laktatdehydrogenase, die die Umsetzung von Laktat zu Pyruvat katalysiert, ein Pyruvat-Pool entsteht, der es ermöglicht, auch Serin zurückzubilden.

#### 4.7.5.4 Organische Säuren

Die Fütterung der Glukose in der Gluconeogenese zieht auch bei der Betrachtung der organischen Säuren, die das Spiegelbild des Citratcyklus symbolisieren, Konsequenzen mit sich.

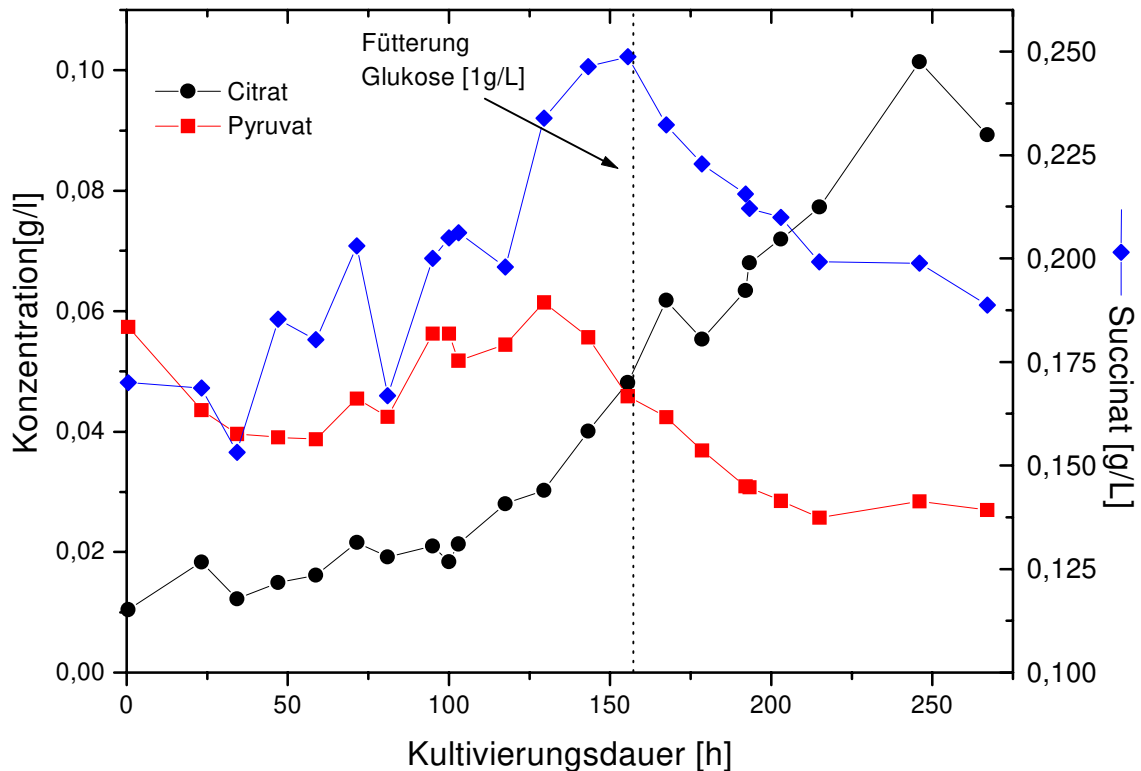


Abbildung 4.7.5.h: Stoffwechselintermediate des Citratcyklus. Die erneute Glukosefütterung führt zu einer Remobilisierung von Succinat.

Allem Anschein nach bewirkt die Fütterung der Glukose in der 155. Std. nicht nur, daß die Succinatausschleusung gestoppt, sondern auch daß Succinat wieder metabolisiert wird. Die Konzentration fällt ab der 155. Std. kontinuierlich von 250 mg/L bis auf 188 mg/L ab. Das gleiche gilt für Pyruvat, dessen Wiederverstoffwechslung jedoch schon während der Gluconeogenese einsetzt. Interessanterweise steigt die Citrat-Konzentration während der gesamten Dauer, deutlich jedoch bei Beginn der Gluconeogenese, kontinuierlich bis auf 100 mg/L an. Bedingt durch die Glukosenachfütterung kann diese Tatsache durch die wieder verstärkte Zufuhr von AcetylCoA in den Citratcyklus nur bei der Verfügbarkeit von Glukose erklärt werden, nicht aber bei der Limitierung ab der 100. Stunde.

#### 4.7.5.5 Produktexprimierung

Der für diese Kultivierung gemessene Produkttiter beträgt 35  $\mu\text{g/ml}$  und liegt geringfügig oberhalb der für die Fermentation FCTrGln gemessenen Konzentration. Es wurde spekuliert, daß die Limitierung der Glukose für die Produktionstop verantwortlich ist. Die Kohlenhydratseiten werden auf der Cytoseite des ER durch Übertragung von aktivierter UDP-Glukose oder UDP-Mannose an Dolichol synthetisiert<sup>[11]</sup>. Die Aktivierung der Zucker benötigt jedoch wieder Energie, die die Zelle in der Gluconeogenese nicht aufbringen kann. Des weiteren ist die Verfügbarkeit der Zucker in dieser Phase eher gering.

Als Ergebnis kann die Zufütterung der Glukose in der 150 Std. keine Produktsteigerung induzieren. Andererseits wird durch den Verlauf wiederum bestätigt, daß Produktivität und Wachstum gekoppelt sind. Begründet wurde dies in den vorangegangenen Versuchen mit der nicht mehr vorhandene Mitoseaktivität wegen der Limitierung einiger essentieller Aminosäuren. Diese Erklärung scheint plausibel, denn auch für die Synthese der Primärstruktur des Glykoproteins werden diese Aminosäuren benötigt.

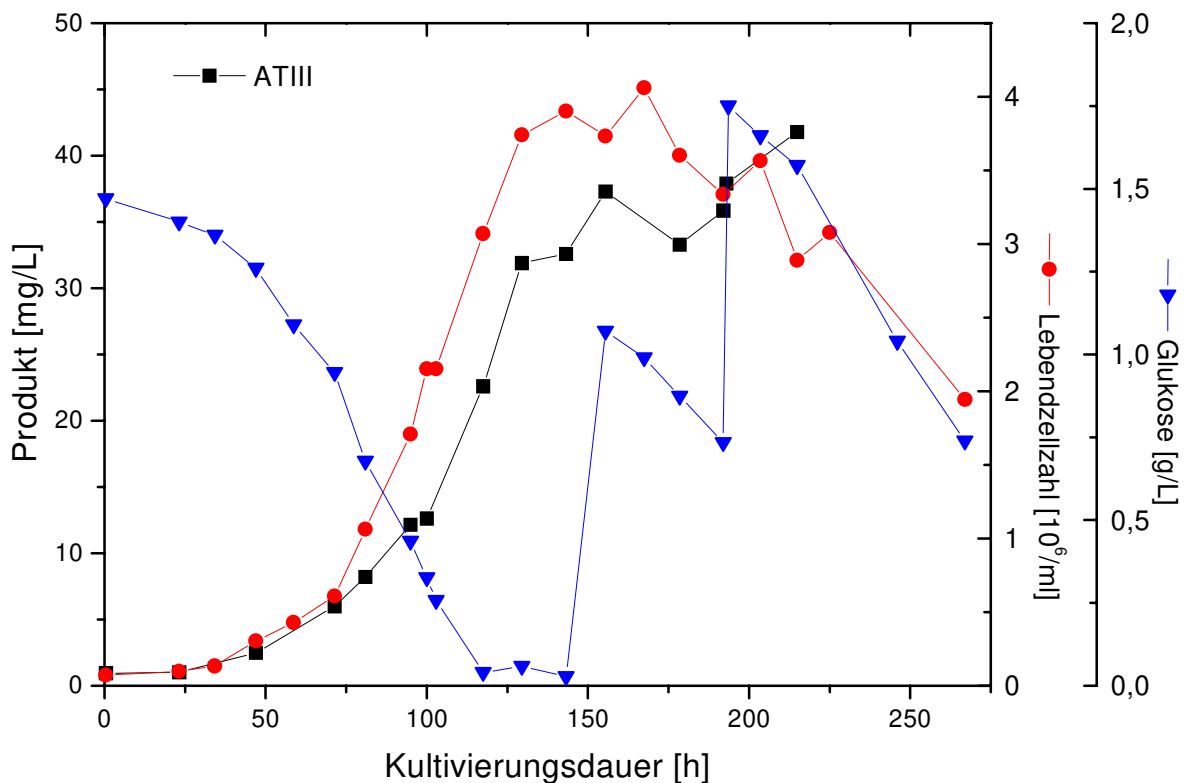


Abbildung 4.7.5.i: Produkttiter einer Fermentation mit Nachfütterung der Glukose in der Gluconeogenese.

#### 4.7.5.6 Zusammenfassung

Die Zufütterung von Glukose in der Gluconeogenese verändert den Stoffwechsel erwartungsgemäß wieder in Richtung Glykolyse. Dieser Prozeß stellt sich nur langsam ein und kann an der nach 50 Std. wiedereinsetzenden Laktatproduktion erkannt werden.

Infolge der Reduzierung der Glukose zu Beginn, stellt sich ein deutlich geringerer Glukoseverbrauch ein, und auch die spezifische Laktatproduktion wird minimiert. Als Konsequenz einer Laktatausbeute von nur 56 % übersteigt die Laktatkonzentration nie einen Wert höher als 1 g/L. Dies macht sich auch in der Wachstumsrate mit  $0,97 \cdot d^{-1}$  bemerkbar, die bisher noch nie erreicht wurde. Auch die Zellzahl kann mit ca.  $4,2 \cdot 10^6$  Zellen/ml maximiert werden, wohingegen der Produkttiter nur geringfügig höher liegt, was aber vermutlich in der Limitierung weiterer essentieller Aminosäuren begründet liegt.

#### 4.7.6 Zufütterung weiterer essentieller Aminosäuren (FaromAs)

Eine Limitierung der essentiellen Aminosäuren Phenylalanin, Methionin, Tyrosin und Tryptophan kann bei Erreichen einer Gesamtzellzahl von  $4,0 \cdot 10^6$  Ze/ml nicht verhindert werden. Unter diesen Umständen mußte auch eine Fütterung dieser Aminosäuren in den Prozeß implementiert werden. Aus Gründen der unzulänglichen Löslichkeit dieser Bestandteile in Reinstwasser (1 mmol/L) und der daraus resultierenden Verdünnungsgefahr, war nur eine Lösung in 0,1m Salzsäure möglich, um die gewünschte Stammlösung von 12 mmol/L Cystein, 20 mmol/L Phenylalanin, 20 mmol/L Methionin sowie 7 mmol/L Tryptophan zu erreichen. Nach Sterilfiltration über hydrolysebeständige Polysulfonmembran (Gelman Science) war eine Zufütterung nur unter dem Aspekt der hoch sauren Salzsäure bedenklich. Diese Befürchtung bewahrheitete sich jedoch nicht, da die Pufferkapazität des Mediums einem pH-Shift entgegenwirken konnte.

Alle weiteren Einstellungen wurden analog zu vorherigen Kultivierung gewählt: 100 Rpm, 37°C, pH 7,2, 10 % pO<sub>2</sub>, sowie kontinuierliche Zufütterung eines Glutamin (0,1mol/L) Aspargin (0,025 mol/L) Mix.

## 4.7.6.1 Zellwachstum

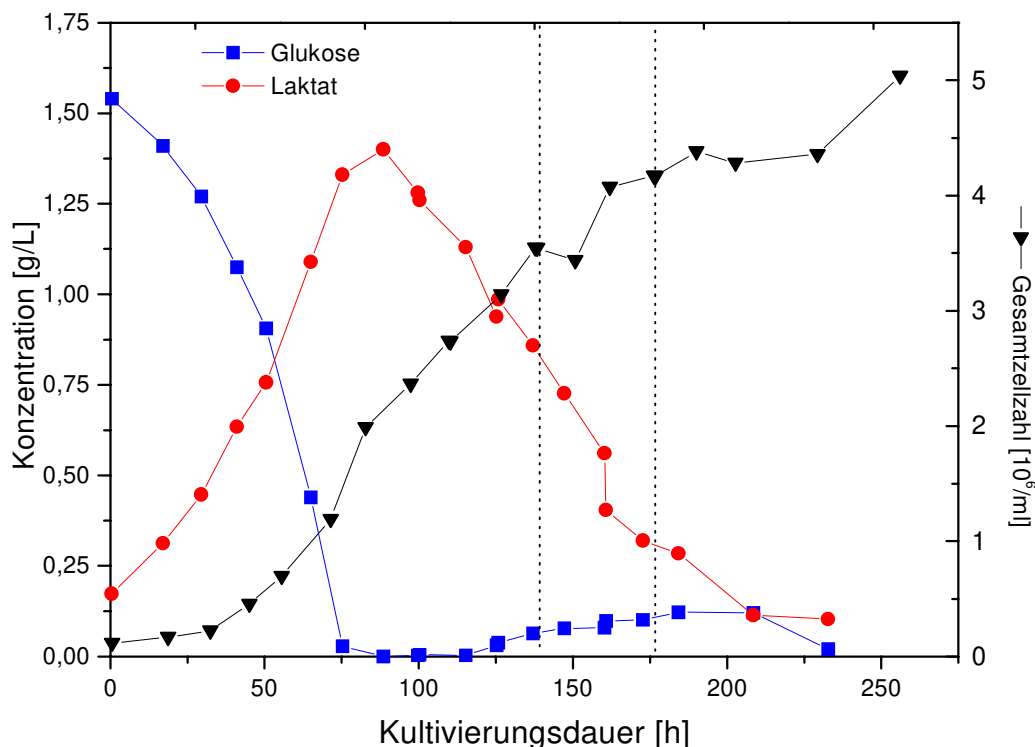


Abbildung 4.7.6.a Konzentrationsverläufe der primären Stoffwechselmetabolite, sowie der Verlauf der Biomasse. Gestrichelte Linien indizieren den Zeitpunkt der Fütterung einer 50 ml Stammlösung der essentiellen Aminosäuren Methionin, Phenylalanin, Cystein und Tryptophan.

Die obige Graphik drückt die erfolgreiche Implementierung dieses Fütterungsvorganges in den Prozeß aus. Die Kultivierung wächst, ausgehend von einer Animpfdichte von  $10^5 \text{Ze/ml}$  innerhalb 75 Std. auf  $2 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$ . Es errechnete sich die extrem hohe Wachstumsrate von  $1,087 \cdot \text{d}^{-1}$ , was eine weitere Steigerung zur vorherigen Kultivierung darstellt. Durch Probleme der Sauerstoffregelung war eine 15-stündige Limitierung von der 75.-90. Std. nicht zu vermeiden, was sich leider negativ auf die Vitalität auswirkte. Dennoch stellte sich ein gewohntes Wachstum unter gluconeogenetischen Bedingungen ein ( $\mu=0,221 \cdot \text{d}^{-1}$ ). Diese Wachstumsphase konnte durch die Nachfütterung der Aminosäuren bis zu 100 Stunden ausgedehnt werden und auch nach diesem Zeitpunkt wächst die Kultivierung noch leicht bis zum Abbruch der Fermentation weiter. Es wird eine Gesamtzellzahl von  $5,5 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$  erreicht.

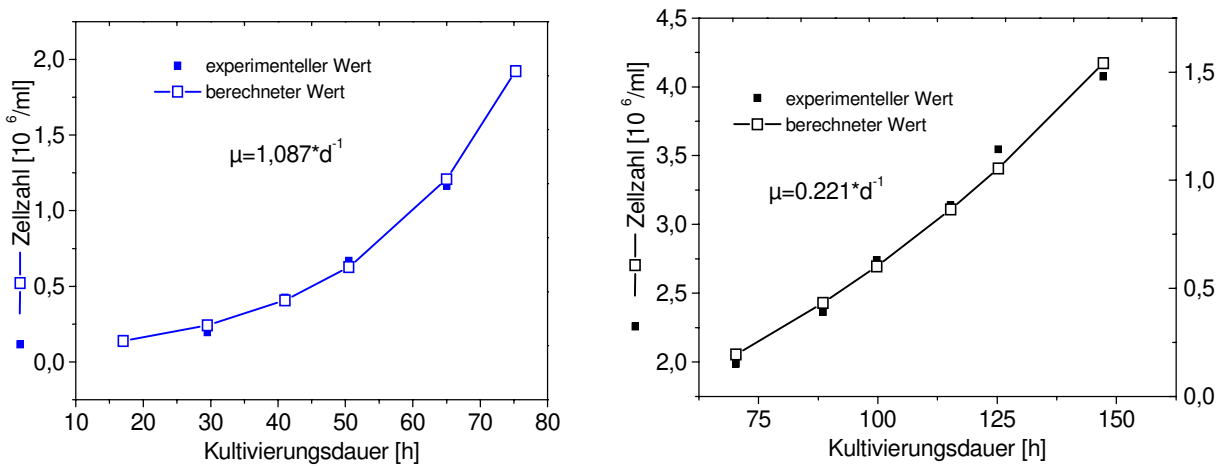


Abbildung 4.7.6.b Ermittlung der Wachstumsraten über die „Least Square Methode“. Links für die exponentielle Phase in der Glykolyse. Rechts das Zellwachstum während der Laktatverstoffwechslung.

#### 4.7.6.2 Primärstoffwechselverhalten

Die Laktatproduktion entspricht derjenigen bei Fermentation FrepGlc, d.h. sie ist dem hier wiederum gedrosseltem Glukoseverbrauch angepaßt. Auch hier wurde mit einer Eingangskonzentration von nur 1,5 mg/L Glukose begonnen.

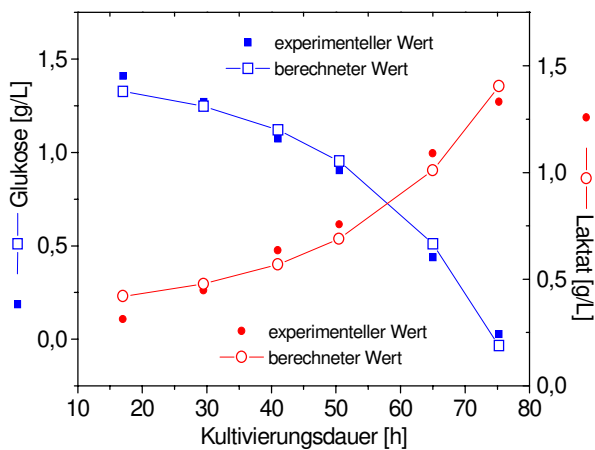


Abbildung 4.7.6.c: Experimenteller und über „least-square-fit“ berechneter Glukose- und Laktatverbrauch.

Der Glukoseverlauf kann hervorragend angeglichen werden, so daß eine spezifische Verbrauchsrate von 0,824 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)] errechnet wird.

Die gleiche Prozedur führt bei der Bestimmung von qLac zu einem nicht so befriedigenden Ergebnis. Man erkennt wiederum deutliche Abweichungen der experimentellen und berechneten Punkte. Dies bedeutet, daß die spezifische Laktatproduktion ebenso wenig eine

Konstante darstellt wie während der Kultivierung FrepGlc. Die spezifische Laktatproduktion berechnet sich zu  $0,599 \text{ [mg/(10}^6\text{Ze}\cdot\text{d)]}$ , die Laktatausbeute zu 71%.

Die Darstellung der arithmetisch berechneten Verbrauchsrate verdeutlicht dies noch mal. Hier ist der Verlauf von  $q_{\text{Lac}}$  und  $q_{\text{Glc}}$  während der gesamten Kultivierungsdauer dargestellt:

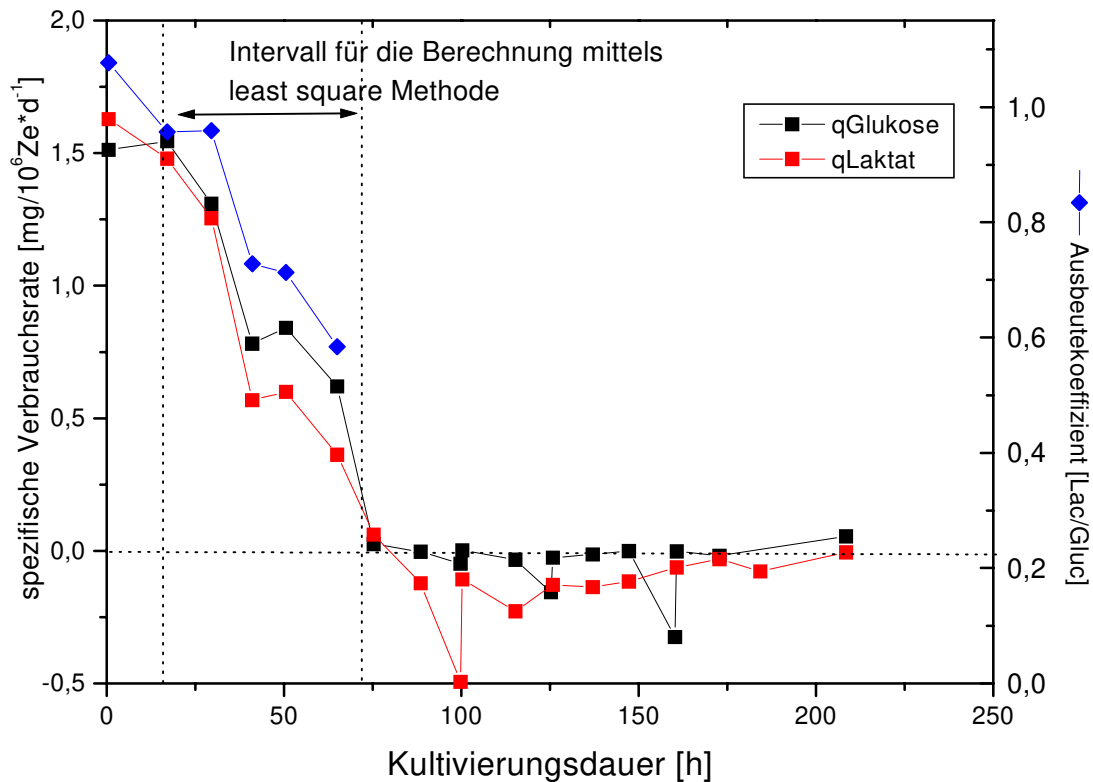


Abbildung 4.7.6.d: Berechnung der spezifischen Verbrauchsrate über das arithmetische Mittel der experimentellen Meßwerte.

Die über das arithmetische Mittel berechneten Verbrauchsrate zeigen folgende Gemeinsamkeiten in der Batch Phase:

In der Adaptionphase sind die spezifischen Raten deutlich höher als während der exponentiellen Phase. Hierbei ist die spezifische Laktatproduktionsrate wegen des zusätzlichen Anteils über den Malat-Shunt numerisch höher.

Die Berechnung der spezifischen Verbrauchsrate über die least-square-Methode kann nur dann erfolgen, wenn sichergestellt ist, daß alle Bedingungen über den Zeitraum konstant sind. So können experimentelle Meßfehler herausgemittelt werden. Es ist somit von Fall zu Fall zu unterscheiden, welche Methode man appliziert. Unter geregelten Bedingungen ist die Verwendung der least-square-Methode die wohl Empfehlenswerteste.



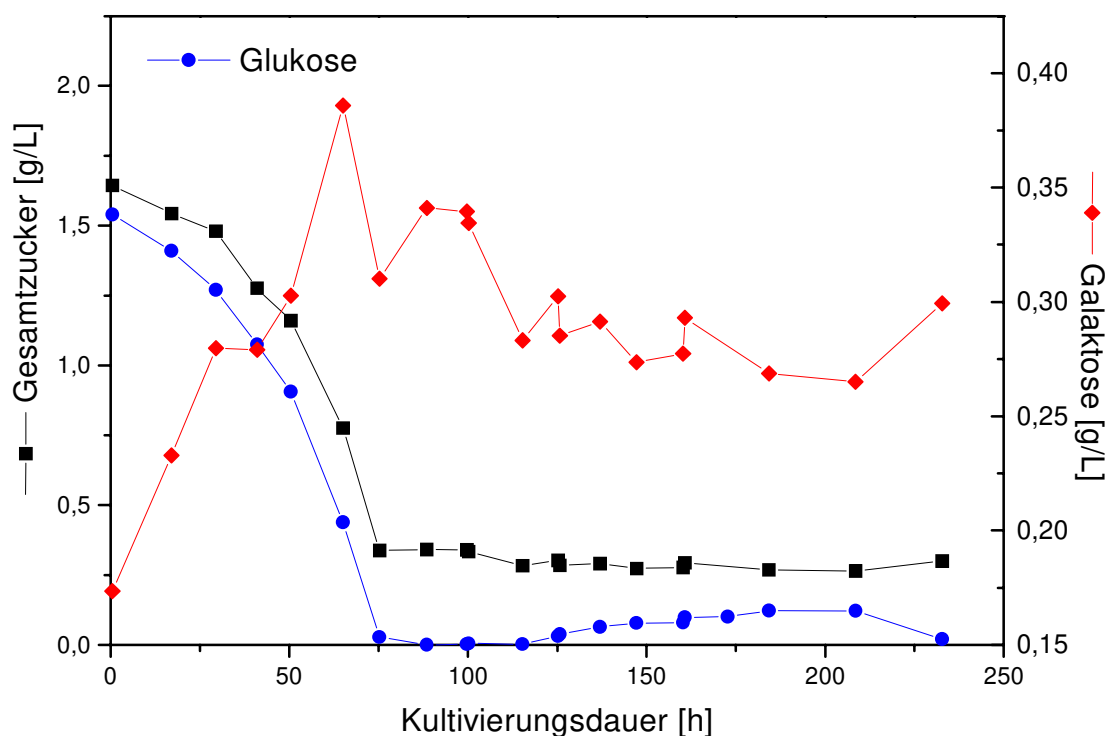


Abbildung 4.7.6.f: Verlauf der Zuckerkonzentration während der Glykolyse und Gluconeogenese.

Die Messung der Gesamtzuckerkonzentration erfolgte über die pHBAH-Methode reduzierender Zucker<sup>[52]</sup>. Der Verlauf während der ersten 75 Stunden entspricht dem Verbrauch durch die exponentiell steigende Biomasse. Bis zur 125. Std. ist keine Glukose mehr im Medium nachweisbar. Ab der 125. Std. werden wieder geringe Mengen Glukose von den Zellen ausgeschleust. Ab der 90. Std. hatte sich die Zelle im Stoffwechsel auf Gluconeogenese umgestellt. Der Verlauf der Gesamtzuckerkonzentration zeigt nach der Limitierung der Glukose eine Restkonzentration von 0,34 g/L an, die als Galaktose indentifiziert wird. Galaktose wird während der intensiven Verstoffwechslung von Glukose deutlich synthetisiert. Der Aufbau von Galaktose aus Glukose ist in der Literatur wohl bekannt<sup>[11]-[13]</sup> und wird durch die UDP-Glukose- $\alpha$ -D-Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase katalysiert. Erst bei der Depletion von Glukose wird keine weitere Synthese beobachtet. Die Umkehrung der Reaktion, d.h. der Abbau von Galaktose in die Glykolyse ist nicht feststellbar.

### 4.7.6.3 Aminosäurestoffwechsel

Wie schon vorher praktiziert, wurde bei einer verbleibenden Restkonzentration von 100 mg/L Glutamin mit der kontinuierlichen Zufütterung dieser Komponente begonnen. Der Zufütterungsmix bestand auch in diesem Fall aus 0,1 mol/L Gln und 0,025 mmol/L Asn. Dieses Verhältnis wurde aufgrund der während der metabolischen Flußanalyse berechneten Verbrauchsdaten gewählt (qGln: 41,65 nmol/10<sup>6</sup>Ze-h zu qAsn: 10,14 nmol/10<sup>6</sup>Ze-h). Das Verstoffwechslungsverhältnis dieser beiden Aminosäuren zeigt sich auch während verschiedener Stoffwechselphasen als existent.

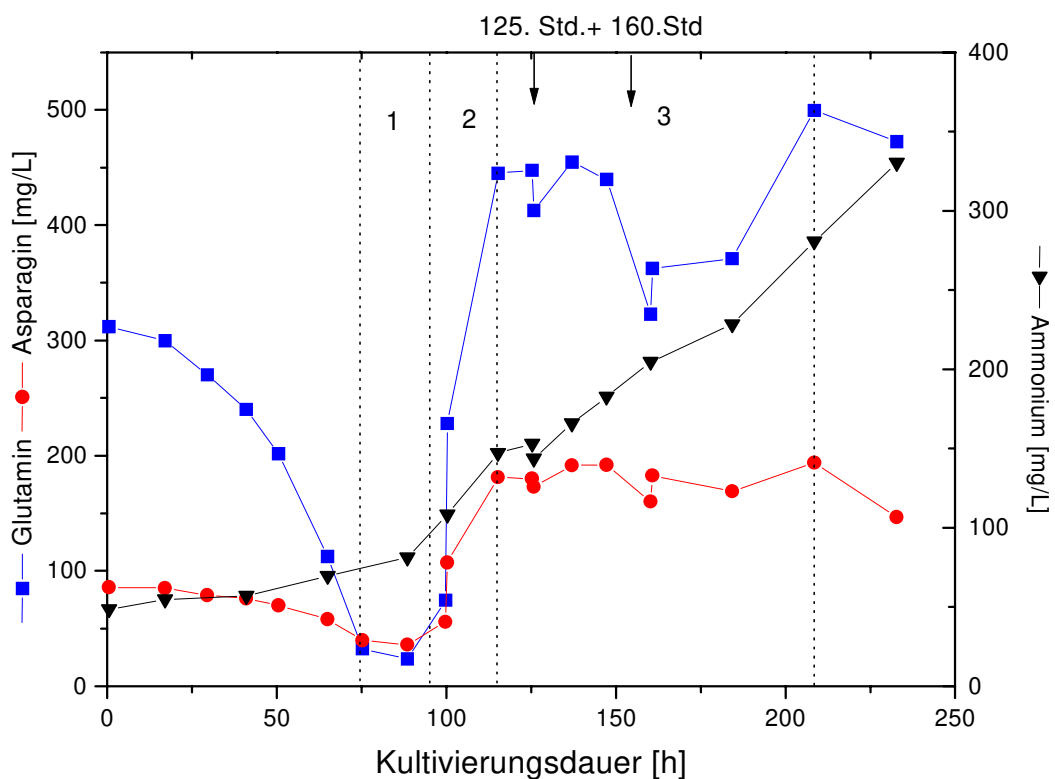


Abbildung 4.7.6.g: Konzentrationsverläufe von Asparagin und Glutamin während der kontinuierlichen Zufütterung ab der 75 Stunde. Intervalle indizieren eine konstante Zufütterungsrate. Intervall 1: 170 [mg/(L·d)], Intervall 2: 420 [mg/(L·d)] und Intervall 3: 210 [mg/(L·d)]. Pfeile markieren Zeitpunkte der Zufütterung der aromatischen Aminosäuren in der 125. und 160. Stunde.

Eine Steigerung der Zufütterungsrate auf 410 [mg/(L·d)] nach der 99. Std. wurde aus Gründen der FIA-on-line-Werte unternommen, stellte sich aber schon 15 Std. später als überdosiert heraus. So wurde anhand der Zellkonzentration und der erfahrungsgemäß in der Gluconeogenese beobachteten spezifischen Verbrauchsrate von 50 [µg/(10<sup>6</sup>Ze·d)] eine

Zufütterungsrate von 210 (mg/L·d) berechnet. Diese manuell kontrollierte Zufütterungsrate zeigte sich als angemessen und wurde schon in vorherigen Fermentation erfolgreich eingesetzt. Die zwischenzeitliche Erhöhung der Zufütterungsrate auf 420 [mg/(L·d)] bewirkte einen Anstieg der Konzentration auf 450 mg/L Glutamin und 180 mg/L Asparagin. Für Asparagin konnte ab diesem Zeitpunkt eine konstante Konzentration im Bereich von 180-190 mg/L eingestellt werden. Erst der Fütterungsstop in der 210 Std. führte zu einem Absinken in der Konzentration.

Auch der Verlauf der Glutaminkonzentration zeigt, daß im Bereich der 115.-150. Std. die Zufütterungsgeschwindigkeit angemessen ist. Der zwischenzeitliche Abfall auf 360 mg/L läßt einen erhöhten Bedarf dieser Aminosäure in diesem Zeitraum vermuten. Dies korreliert mit dem simultanen Anstieg der Biomasse, der durch die Fütterung der essentiellen Aminosäuren 24 Std. früher induziert wurde. Wenn man davon ausgeht, daß die Fütterung dieser Aminosäuren die erneute Mitoseaktivität bewirkt hat, dann ist dies sicherlich nicht sofort erkennbar, sondern um die Verdopplungszeit der Zelle (20-24 Std.) verschoben.

Abbildung 4.7.6.h zeigt weiterhin den massiven Anstieg von Ammonium in der Fütterungsphase. Die Konzentration steigt ab der 88. Std. von 81 bis auf 330 mg/L.

Die Vermutung, daß infolge des hohen Glutamingehalts dessen thermischer Zerfall für die Ammoniumakkumulation verantwortlich ist, wird durch die HPICE Messung des Zerfallsproduktes 2-oxo-Pyrolidincarbonsäure widerlegt. Es zeigt sich nämlich, daß die Konzentration der Säure zwar von 100 auf 238 mg/L steigt, der prozentuale Anteil des aus der Zerfallsreaktion stammenden Ammoniums (anteilig an der Gesamtammoniumkonzentration) unerwartet von 28 auf 10 % abnimmt (definitonsgemäß: Anteil des Ammonium aus der thermischen Zerfallsreaktion an der Gesamtammoniumkonzentration =  $\phi$ ). Der thermische Zerfall verläuft nach einer Reaktion 1. Ordnung, d.h. er ist direkt proportional zur Konzentration des Glutamins. Diesem Gesetz entsprechend muß auch der Anteil des Zerfallsprodukt je nach vorherrschender Glutaminkonzentration ab- bzw. zunehmen.

Dies kann durch den Verlauf in der exponentiellen Batch-Phase bestätigt werden. Dahingegen nimmt  $\phi$  in der Fütterungsphase trotz des hohen Glutamingehalts weiter von 14 auf 10 % ab.

Durch diese Betrachtungsweise bestätigt sich, daß der Hauptanteil des Ammoniums aus der unvermeidbaren Glutaminolyse stammt, die sich unter der mittlerweile dort eingestellten Zellkonzentration erheblich bemerkbar macht.

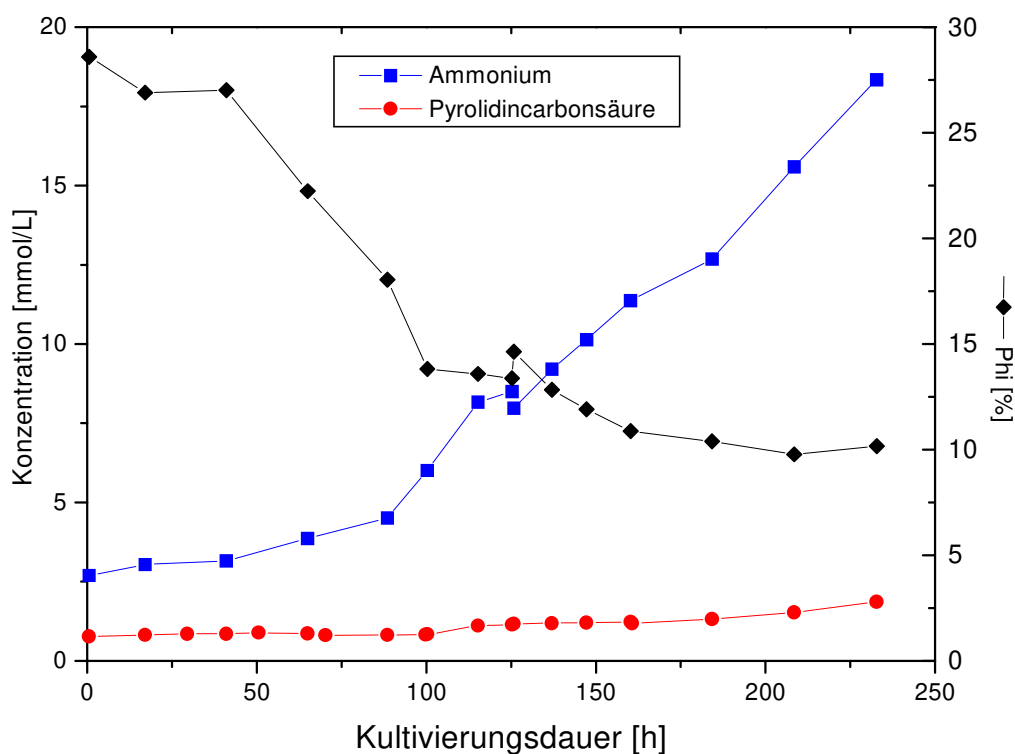


Abbildung 4.7.6.h: Metabolitproduktion im Rahmen der Glutaminolyse. Phi ( $\varphi$ ) = Anteil des Ammoniums aus der thermischen Zerfallsreaktion an der Gesamtammoniumkonzentration.

#### 4.7.6.4 Konzentrationsverläufe der gefütterten essentiellen Aminosäuren

Im Verlauf der Kultivierung wurden in der 125. und 165. Std. weitere essentielle Aminosäuren gefüttert. Dabei waren Phenylalanin, Methionin, Cystein und Tryptophan im Fütterungsmix nach der bereits beschriebenen Präparierung vorhanden. Diese Aminosäuren werden vorwiegend für die Biosynthese benötigt, was erklärt, warum eine Limitierung dieser Bestandteile zur Einstellung der Mitoseaktivität führt. Ein Aufbau dieser Aminosäuren aus vorhanden Komponenten ist nicht möglich.

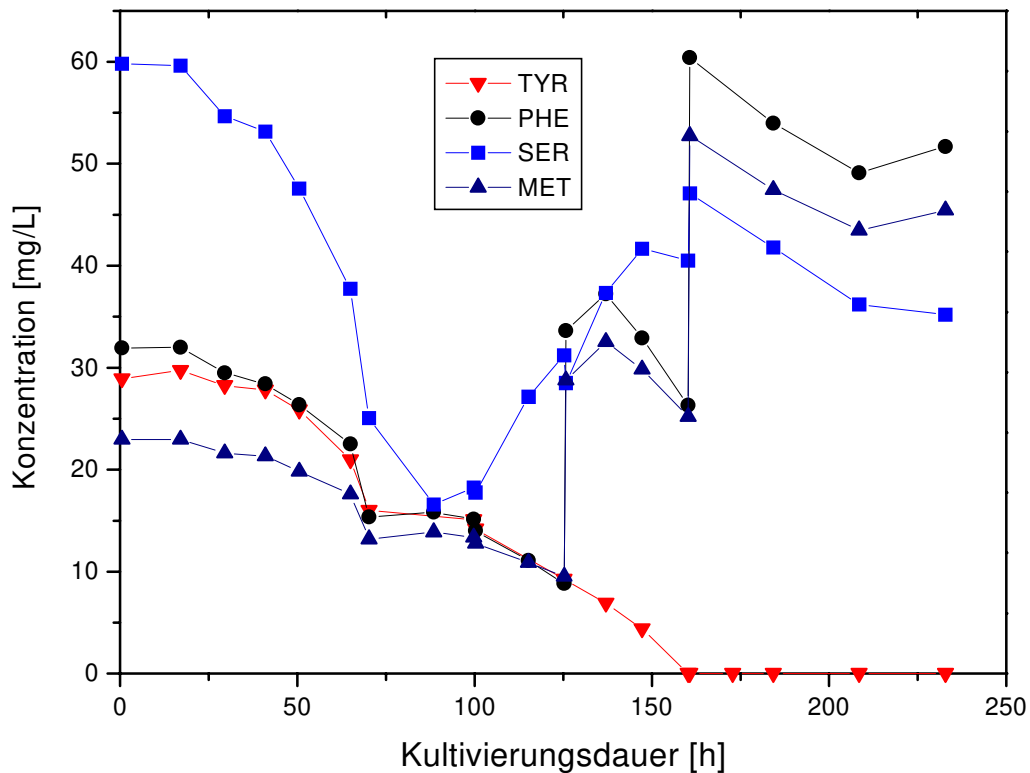


Abbildung 4.7.6.k: Konzentrationsverläufe weiterer essentieller Aminosäuren (Phenylalanin, Methionin, Tyrosin und Serin). Zusätzlich wurde noch Tryptophan gefüttert (Daten nicht gezeigt).

Durch den sprunghaften Anstieg in der 125. und 160. Std. wird der Fütterungszeitpunkt derjenigen Säuren dokumentiert, die im Fütterungsmix enthalten waren. Wie die obige Graphik deutlich macht, scheint die Menge aller zugefütterten Aminosäuren auszureichen, doch schon nach 155 Std. wirkt eine weitere, nicht zugefütterte Aminosäure, nämlich Tyrosin limitierend. Es wurde erhofft, daß durch die Zugabe von Phenylalanin der Bedarf an Tyrosin gedeckt werden konnte. Im Stoffwechsel wird Phenylalanin bekanntlich durch die Phenylalanin-4-Monooxygenase zu Tyrosin umgewandelt. Dieser Schritt scheint zu funktionieren, ist aber wohl langsamer als für die Biosynthese erforderlich, denn ab der 160. Std. ist keine deutliche Zunahme der Biomasse mehr erkennbar, was sich durch die Schwankungen in der Zellzahl jedoch nicht postulieren läßt.

Eine Modifikation des Fütterungsmix kann diese Limitierung sicherlich beheben.

#### 4.7.6.5 Produktion

Infolge der verbesserten Wachstumseigenschaften kann auch ein erhöhter Produkttiter des Antithrombins gemessen werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit und die

Produktkonzentration verlaufen synchron, d.h. während der anfänglichen 75 Std. ist eine exponentielle Steigerung der Produktkonzentration sichtbar. Die daran anschließende verminderte Wachstumsgeschwindigkeit in der Gluconeogenese hat ihre Konsequenz in der daran angepaßten Produktivität. Insgesamt wird eine ATIII Gesamtkonzentration von 46 mg/L erreicht, was eine deutliche Optimierung bezüglich der Kultivierungen ohne Aminosäure-Supplementierung bedeutet. Es wird bis zur 200. Std. eine ATIII-Akkumulation beobachtet. Der Abfall zum Schluß der Kultivierung könnte aufgrund der freigesetzten Proteasen durch die Lyse der Zellen begründet sein. Die Einführung der spezifischen Produktionsrate bestätigt nachhaltig die Vermutung, daß nur Produktion stattfindet, wenn Mitoseaktivität besteht.

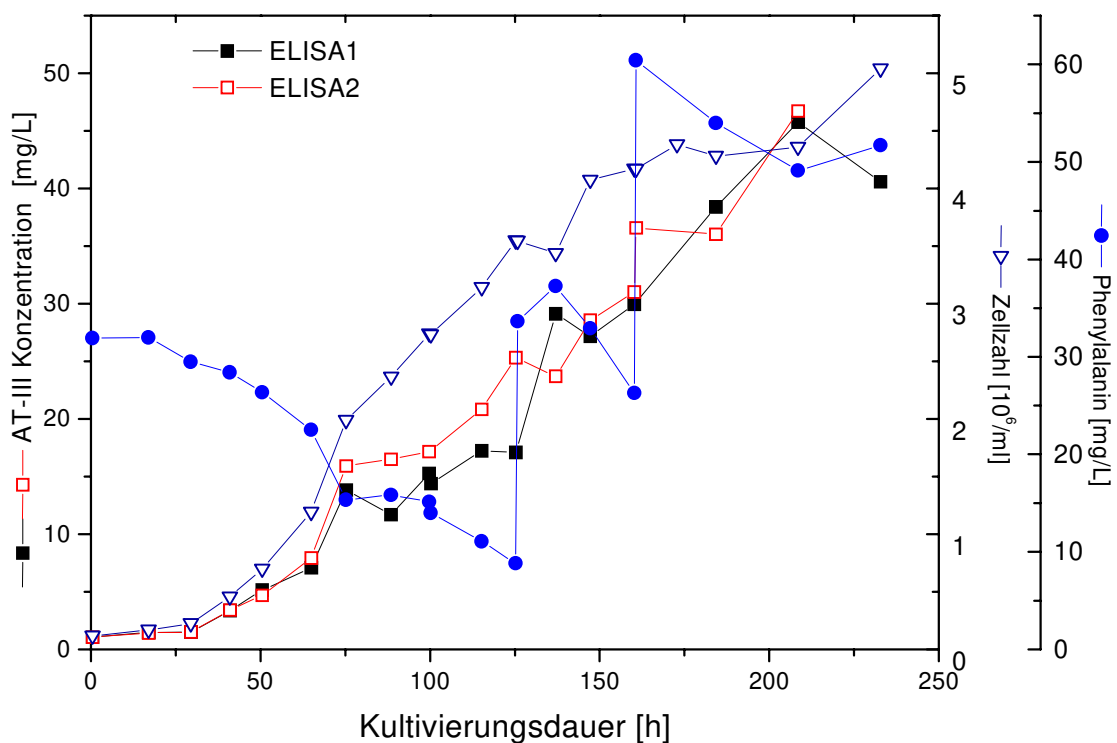


Abbildung 4.7.6.h: Produktkonzentrationsverlauf in Abhängigkeit des Zellwachstums und der Aminosäurequellen.

Vergleicht man die ATIII-Produktionsrate in der exponentiellen glykolytischen Phase ( $q_{ATIII}$ :  $7,36 \mu g/(10^6 Ze \cdot d)$ ) und in der Gluconeogenese ( $q_{ATIII}$ :  $1,655 \mu g/(10^6 Ze \cdot d)$ ), so zeigt sich eine eindeutige Einbuße in der Produktivität ab. Führt man dahingegen den Koeffizienten  $\theta_{ATIII/Biomasse}$  (Dimension  $[\mu g/10^6 Zellen]$ ) ein, wird eine recht gute Übereinstimmung gefunden. Der Ausbeutekoeffizient  $\theta_{ATIII/Biomasse}$  beträgt in der Glykolyse 7,95 und in der

Gluconeogenese sogar 10,1. Diese Verhältnisse beweisen, daß nur bei Zuwachs der Biomasse neues Produkt entstehen kann.

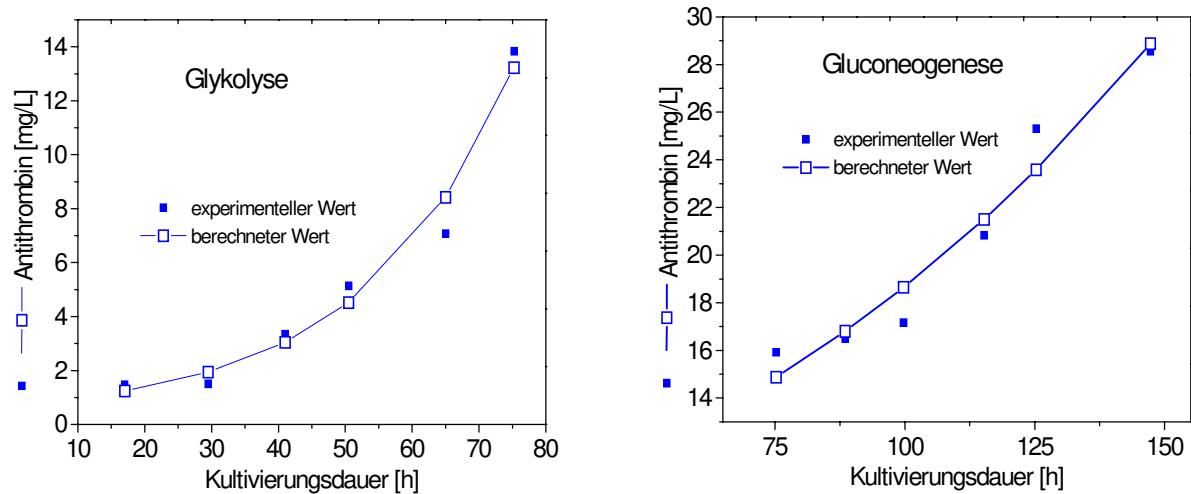


Abbildung 4.7.6.i: Produktivität des Glykoproteines: Links während der Glykolyse; Rechts während der Gluconeogenese.

#### 4.7.6.6 Zusammenfassung

Die Fütterung weiterer essentieller Aminosäuren vor dem Zeitpunkt ihrer Depletion bewirkt die Aufrechterhaltung des Zellwachstums bis zur 200. Stunde. Dadurch wird eine Gesamtzellzahl von  $5 \cdot 10^6$  Zellen erreicht. Analog dazu nimmt auch die Produktkonzentration langsam aber stetig zu, so daß letztendlich 46 mg/L AT-III erreicht werden, was den vermuteten Zusammenhang zwischen Wachstum und Produktion bestätigt. Trotz Fütterung der bisher bekannten limitierenden Aminosäuren kommt es erneut zur vollständigen Verstoffwechslung einer weiteren Aminosäure, in diesem Fall von Tyrosin.

Offenbar stößt die Optimierung der Fütterungsstrategien im weiteren Verlauf und bei einer Zelldichte von ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml an ihre Grenzen.

## 4.8 Vergleich der Prozeßparameter bei der Optimierung von Fed-Batch-Strategien

Um die Effizienz der Optimierungsschritte der unterschiedlichen Fed-Batch-Kultivierungen deutlich zu beurteilen, werden Prozeßbasisparameter wie maximale Zellzahl, Ausbeutekoeffizienten, Wachstumsrate usw. hier verglichen und diskutiert.

Folgende Fermentationen werden für den Vergleich herangezogen:

**FGluc:** Kultivierung mit pulsweiser Zufütterung von kleinen Glukoseportionen.

**FGlc&Gln (=FGln):** alternierende und pulsweise Zufütterung eines Aminosäurecocktail (Asn, Asp, Gln, Glu) und Glukose.

**FnGln:** pulsweise Zufütterung von Aminosäureportionen ohne Glukosefütterung.

**FctrGln:** kontinuierliche Zufütterung von Glutamin und Asparagin ohne Glukosefütterung.

**FredGlc:** kontinuierliche Zufütterung von Glutamin und Asparagin unter reduzierter Glukoseeingangskonzentration.

**FaromAs:** analog FrepGlc mit zusätzlicher pulsweiser Zufütterung von Phenylalanin, Cystein, Methionin und Tryptophan.



		FGlc	FGlc&Gl	FnGln Glykol.	Gluconeo.	FctrGln Glkkol.	Gluconeo.	FredGlc Glykol.	Gluconeo.	FaromAs Glykol.	Gluconeo.
Parameter	Dimension										
max Zellzahl	[10 <sup>6</sup> Ze/ml]	1,9	1,31	2,2		3,35		4,11		5,04	
ATIII-Titer	[mg/L]	27,85	23,31	33,87		34,67		36,45		46,3	
$\mu_{\text{mittel}}$	[d <sup>-1</sup> ]	0,614	0,542	0,715	0,308	0,832	0,57	0,97	0,444	1,072	0,221
Dauer der exp. Phase	[h]	240	118	128		133		145		230	
S <sub>0</sub> Glukose	[g/L]	1,7	2,1	1,7		2,0		1,47		1,5	
q <sub>Glukose</sub>	[mg/(10 <sup>6</sup> Ze·d)]	-1,240	-2,060	-1,550	0	-1,067	0	-0,756	0	-0,825	0
q <sub>Laktat</sub>	[mg/(10 <sup>6</sup> Ze·d)]	0,992	1,794	1,181	-0,147	0,778	-0,137	0,474	-0,100	0,599	-0,106
q <sub>Glutamin</sub>	[mg/(10 <sup>6</sup> Ze·d)]	-0,198	-0,207	-0,176	-0,061	-0,186	-0,138	-0,206	-0,057	-0,1605	-0,061
q <sub>ATIII</sub>	[ $\mu$ g/(10 <sup>6</sup> Ze·d)]	12,28	17,41	7,38		10,12		6,67		7,36	1,655
$\theta_{\text{X/Glukose}}$	[g/g]	0,173	0,1179	0,466		0,587		0,98		1,15	
$\theta_{\text{X/Glutamin}}$	[g/g]	1,18	1,19	3,07		1,46		1,14		1,69	
$\theta_{\text{ATIII/X}}$	[ $\mu$ g/g]	66,01	63,63	34,61	48,72	20,91	35,8	14,91	29,64	20,44	29,58
$\theta_{\text{Laktat/Glukose}}$	[g/g]	0,7	0,87	0,76		0,66		0,56		0,725	
$\theta_{\text{ATIII/Glukose}}$	[mg/g]	12,98	7,505	20,04		17,47		24,29		30,34	
$\theta_{\text{ATIII/Glutamin}}$	[mg/g]	88,96	75,77	132,3		43,31		56,26		44,18	
$\theta_{\text{RaumZeit}}$	[mg/(L·d)]	4,87	4,11	5,59		5,49		5,75		5,27	

Tabelle 4.8.1: Prozeßkenngrößen verschiedener Fed-Batch-Fermentationen unter Anwendung verschiedener Fütterungsmodi.

Die Prozeßkenngrößen der unterschiedlichen Fermentationen wurden nur während der Wachstumsperiode berechnet, d.h. die Angabe der exponentiellen Phase in Tabelle 4.8.1 indiziert gleichzeitig die Dauer des Berechnungsintervalls. Unter Berücksichtigung der tatsächlichen Fermentationszeit werden insbesondere Koeffizienten wie  $\theta_{X/Glc}$  und  $\theta_{X/Gln}$  verfälscht, da nicht nur der Anteil des in die Biomasse einfließenden Substrats berücksichtigt wird, sondern verstärkt der Teil, der in die Zellerhaltung einfließt.

Im Laufe der Prozeßoptimierung ist der Trend der Zellzahlmaximierung zu erkennen. Die Reihenfolge der in Tabelle 4.8.1 präsentierten Fermentationen entspricht der Abfolge der unternommenen Optimierungsschritte.

Fermentation FGlc&Gln zeigt bezüglich der Optimierung auf bei vielen Parametern ungünstige Werte. Die Berechnung der Verbrauchsdaten ergab, daß  $q_{Glc}$  und  $q_{Lac}$  mehr als doppelt so hoch liegen, was einmal mehr den exzessiven Substratverbrauch dokumentiert, stimmen aber überein mit den Daten aus der Literatur<sup>[98]</sup>. Der Umsatzkoeffizient  $\theta_{X/Glc}$  zeigt mit 0,118 [g/g] einen äußerst geringen Eintrag der Glukose in die Biomasse, dies bestätigt auch der Laktatausbeutekoeffizient. Hier wurde ein im Überblick aller Fermentationen maximaler Wert errechnet ( $\theta_{Laktat/Glukose} = 0,87$ ). Dies mag hauptsächlich an der hohen Glukoseeingangskonzentration liegen, die auf 2,11 g/L eingestellt wurde und um mehr als 0,6 g/L höher lag, als bei den zum Schluß durchgeführten Experimenten. Dieser immense Substratdruck von außerhalb veranlaßt die Zelle aus Gründen der Coenzymregenerierung zum größten Teil Laktat zu produzieren und den Fluß am Pentosephosphatweg vorbei zu führen. Die anfängliche Annahme, daß eine höhere Glukoseeingangskonzentration mehr Biomasse bedeutet, trifft hier sicherlich nicht zu.

Im Verlaufe der Glukoseeingangsreduzierung auf ca. 1,7 g/L bei FCTrGln und FnGln bestätigt sich diese Vermutung durch die Beobachtung niedriger Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten (ca. 1,550, bzw. 1,180 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)], niedriger Laktatausbeutekoeffizienten (0,75) sowie hoher Biomasseausbeutekoeffizienten ( $\theta_{Laktat/Glukose} = 0,47-0,58$ ).

Bei weiterer Reduzierung auf ca. 1,5 g/L (ReFrepGlc und FaromAS), wird diese Tendenz noch eindeutiger.  $q_{Glc}$  und  $q_{Lac}$  betragen nur noch ca. 0,800, bzw. 0,550 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)], die Laktatausbeutekoeffizienten sind mit  $\theta_{Laktat/Glukose} = 0,56-0,7$  äußerst niedrig und der Biomasseausbeutekoeffizient zeigt mit  $\theta_{X/Glc} = 0,98-1,15$  eine äußerst positive Ausnutzung der Glukose. Es erscheint bei der Berechnung des Ausbeutekoeffizienten  $\theta_{X/Glc}$  zulässig, auch die Biomasse mit einzubeziehen, die in der Gluconeogenese unter Laktatverstoffwechslung produziert wurde, da Laktat unter diesen Bedingungen kein Endprodukt, sondern ein Intermediat darstellt.

Dadurch ergeben sich numerische Werte von ca. 1, die eine fast zehnfache Steigerung zum Experiment mit 2 g/L Anfangskonzentration darstellen. Die dort angewandte kombinierte Glukose- und Glutaminzufütterung bewirkte einen Wachstumsstillstand nach 118. Stunden, so daß eine Berechnung des Biomasseausbeutekoeffizienten nur bis zu diesem Zeitpunkt einen Sinn ergibt. Die nachher durchgeführten Substratfütterungen sind somit überflüssig.

Die Dauer der exponentiellen Wachstumsphase ist sehr unterschiedlich. Während bei kombinierter Glukose und Glutaminzufütterung Mitoseaktivität nur bis zur 118. Std. beobachtet werden kann, hat die Sicherstellung der Aminosäurenversorgung eine immer längere Wachstumsphase unter gleichzeitiger Laktatwiederverwertung zur Folge. Ermöglicht die pulsweise Zufütterung von Gln/Asn eine Verlängerung bis zur 128. Std., so gewährleistet die kontinuierliche Zufütterung dieser Aminosäuren ein Wachstum bis zur 145. Stunde. Die zum Schluß der Optimierung einbezogene Versorgung mit weiteren essentiellen Aminosäuren ermöglicht ein Zellwachstum bis zum Schluß der Kultivierung (Zunahme der Gesamtzellzahl bis zur 230. Std.), die Vitalität sinkt jedoch ab. Eine Ausnahme bildet hier die Fermentation unter ausschließlicher Glukosenachfütterung. Dort kann durch die Limitierung von Glutamin keine Zunahme der Lebendzellzahl ab der 113. Stunde mehr beobachtet werden. Der Verlauf der Gesamtzellzahl bestätigt allerdings eine Mitoseaktivität bis zur 240. Stunde.

Die spezifische Glutaminverbrauchsrate liegt in allen Fällen während der glykolytischen Verstoffwechslung von Glukose bei 0,185-0,2 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)], und auch der Wert in der Gluconeogenese liegt mit 0,055-0,060 [mg/(10<sup>6</sup>Ze·d)] weitgehend in einem engen Intervall.

Die zellspezifische Produktivität, sowie die Produktausbeutekoeffizienten wurden analog zum Biomasseausbeutekoeffizienten nur innerhalb des Wachstumsintervall berechnet. Die ausschließliche Produktivität in der Wachstumsphase erübrigte weitere Überlegungen hinsichtlich des Berechnungszeitraums. Dabei fällt tendenziell auf, daß bei geringerer Wachstumsgeschwindigkeit die spezifische ATIII Produktivität größer ist. So beträgt z.B. qATIII in der exponentiellen Phase von FGln&Glc ( $\mu=0,542\cdot d^{-1}$ ) 17 [ $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$ ], wohingegen bei FaromAs ( $\mu=1,072\cdot d^{-1}$ ) eine spezifische Produktionsrate von 7,36 [ $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$ ] berechnet werden konnte. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß nur wachsende Zellen produzieren können, wird der Ausbeutekoeffizient  $\theta_{\text{ATIII}/X}$  eingeführt. Auch hier zeigen sich deutliche Unterschiede. Unter langsamem Wachstum beträgt  $\theta_{\text{ATIII}/X}$  66  $\mu\text{g}/\text{g}$ , während bei hoher Wachstumsrate ein Koeffizient von 15  $\mu\text{g}/\text{g}$  berechnet wird. Dies verdeutlicht erneut, daß in der glykolytischen Phase, in der die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich höher liegt, sich ein niedrigerer Ausbeutekoeffizient  $\theta_{\text{ATIII}/X}$

ergibt, als in der gluconeogenetischen Phase (FredGlc: Glykolyse:  $\theta_{ATIII/X} = 15 \mu\text{g/g}$ , Gluconeogenese:  $\theta_{ATIII/X} = 29,6\mu\text{g/g}$ ).

Damit kann folgende Hypothese aufgestellt werden: Je langsamer die Zelle wächst, desto mehr produziert sie. Dies könnte zwar ebenso bedeuten, daß die Zellen schneller wachsen, weil sie, bedingt durch eine Plasmidinstabilität, weniger produzieren. Diese Vermutung muß aber negiert werden, da in den Vorkulturen mit einem Selektionsmarker gearbeitet wurde, der eine Plasmidstabilität garantieren sollte. Andererseits deckt sich die Hypothese mit den Erfahrungen bei verminderter Kultivierungstemperatur, wo durch deren Herabsetzung eine Verlangsamung des Zellwachstums, aber eine Erhöhung der spezifischen Produktivität beobachtet werden konnte<sup>[99][100]</sup>. Im übrigen wird eine genetische Instabilität, d.h. Plasmidverlust bei CHO-Zellen in der Literatur kaum beschrieben.

Eine genauere Beurteilung dieser Beobachtungen ist nicht möglich, da zu wenig Informationen über die Vorgänge im Expressions-, sowie Regulationssystem vorhanden sind.

Die Konzentrationsbestimmung des Produktes konnte aber zeigen, daß der Produkttiter mit steigender Biomasse kontinuierlich zunimmt, d.h. die Steigerung der Biomasse ebnet auch den Weg zur Produktmaximierung. Die Tatsache, daß kein linearer Zusammenhang zwischen Biomasse und Produkt besteht, mag mit den sich ständig ändernden Bedingungen in Fed-Batch-Kultivierungen zusammenhängen. So wird bei Fermentation FGlc&Gln eine maximale Zellzahl von  $1,31 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$  und ein Produkttiter von  $23,31 \text{ mg/L}$  erreicht. Im Vergleich zu FredGlc wird nur  $1/3$  der Zellzahl erreicht, aber  $2/3$  der Produktmenge.

Die Berechnung der Raumzeitausbeute zeigt allerdings, daß die Effektivität der Produktion bei den Fermentationen, in denen eine Gluconeogenese auftritt, deutlich besser ist als ohne.  $\theta_{\text{RaumZeit}}$  beträgt hier durchschnittlich  $5,5 \text{ [mg/(L \cdot d)]}$ , wohingegen man bei den Fermentationen mit Glukosenachfütterungen nur ca.  $4,11\text{-}4,9 \text{ [mg/(L \cdot d)]}$  erreicht.

#### 4.8.1 Zusammenfassung

Die Optimierungsstrategie läßt sich folgendermaßen beurteilen:

Der Verzicht auf eine Glukosefütterung zugunsten einer intelligenten Aminosäurefütterung führt zu einer klassischen Diauxie, in der die Zelle ihr eigenes Endprodukt Laktat wieder als Nährstoffquelle verwenden kann, solange die Energieproduktion für die energieaufwendige Gluconeogenese über den Citratcyklus sichergestellt ist. Dies wird durch eine ständige Zufuhr von Asparagin und

Glutamin gewährleistet. Diese Aminosäuren füllen den Citratcyklus bei  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat anaplerotisch auf.

Die Verstoffwechslung des Laktats kann so bis zum Schluß aufrecht erhalten werden und ermöglicht eine hohe Vitalität der Kultivierung bis zum Ende. Der Wachstumsstop, der trotz hinreichender Energieversorgung und Nährstoffangebot ab der 130-140 Std. auftritt, wurde als Folge der Erschöpfung weiterer essentieller Aminosäuren erkannt und konnte durch deren Zugabe behoben werden (siehe FaromAS).

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in der gluconeogenetischen Wachstumsphase ist durch die nicht ausreichende Verfügbarkeit von Grundbausteinen über die Gluconeogenese limitiert, sie konnte aber im Verlauf der Prozeßoptimierung verbessert werden. Das Zellwachstum unter Laktatverstoffwechslung kann als Schlüssel zur Optimierung angesehen werden. Die Sicherstellung der Verfügbarkeit der anaplerotischen Aminosäuren durch kontinuierliche Zufütterung, sowie die Reduzierung der Laktatmaximalkonzentration stellten sich als geeignete Mittel zur Verbesserung der Wachstumsgeschwindigkeit heraus. Dabei war es im Fall der Laktatkonzentration einerseits wichtig, einen kritischen Schwellenwert, der das Wachstum inhibiert, nicht zu überschreiten, andererseits mußte diese als Kohlenstoffquelle in der Gluconeogenese verfügbar sein. Dies gelang durch die Reduzierung der Eingangskonzentration von Glukose auf 1,5 g/L. Hierdurch wurde keine höhere Laktatkonzentration als 1 g/L generiert, was zum einen die Wachstumsbedingungen in der primären exponentiellen Phase verbesserte, aber auch den Kohlenstoffbedarf bis zum Schluß deckte. Die völlige Inhibierung des Zellwachstums durch Laktat wurde bisher bei dieser CHO Zelllinie ab 2-2,5 g/L beobachtet. Es scheint aber sicher, daß Laktat auch in niedrigeren Konzentrationen ein Zellgift darstellt und das Wachstum verlangsamt. Tabelle 4.8.1 zeigt, daß die Wachstumsraten der glukosegefütterten Fermentationen deutlich niedriger liegen als bei den Fermentationen mit Aminosäurefütterung, was mit den gemessenen Laktatkonzentrationen korreliert, die im Überblick noch einmal in folgender Graphik zusammen gefaßt sind.

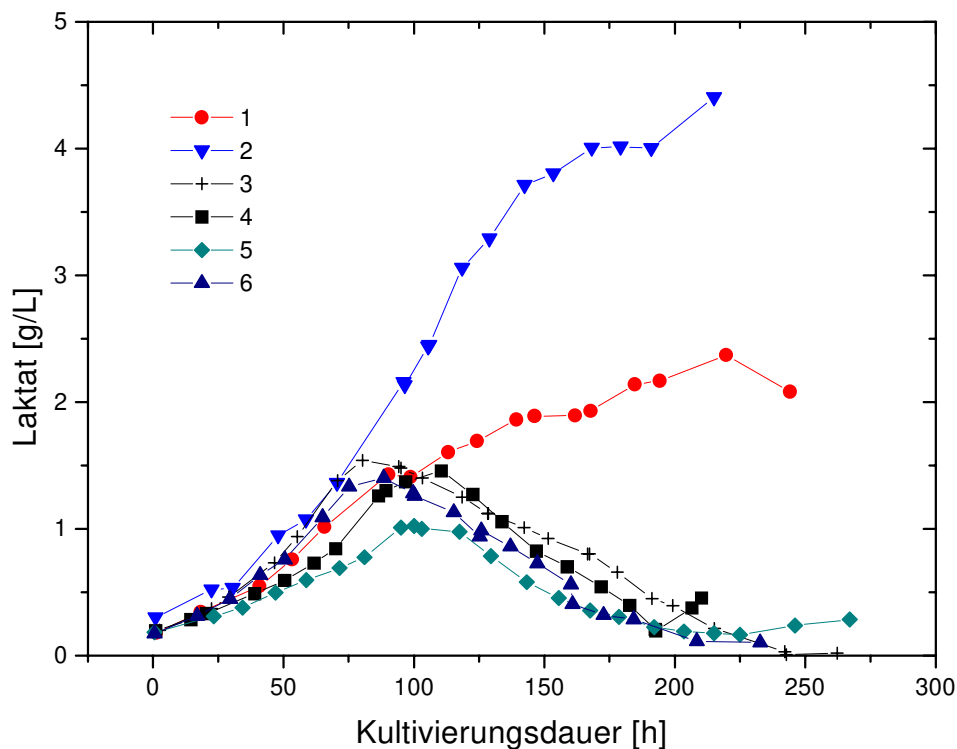


Abbildung 4.8.1: Laktatkonzentrationsverläufe bei verschiedenen Fütterungsmethoden. (1)= Fütterung nur Glukose, (2)= Fütterung Glukose und Aminosäurcocktail, (3)= pulsweise Fütterung von Glutamin/Asparagin, (4)= kontinuierliche Zufütterung von Glutamin und Asparagin, (5) wie (4) mit reduzierter Glukoseeingangskonzentration, (6) wie (5) mit zusätzlicher AS Fütterung.

Abbildung 4.8.1 verdeutlicht noch einmal das Diauxieverhalten der Zellen in Kultivierungen ohne Glukosenachfütterung. Augenscheinlich wird auch die Tatsache, daß eine kontinuierliche Zufütterung der Aminosäuren eine schnellere und vollständige Abbaufähigkeit des Laktats bewirkt, wohingegen bei pulsweiser Nachfütterung nur 1/3 des produzierten Laktats wieder verstoffwechselt werden kann.

Der hier etablierte Ansatz zur Optimierung einer Fed-Batch-Kultivierung zeigt als Ergänzung zur derzeitigen Literatur<sup>[101]-[106]</sup>, daß die Umfunktionierung des Zellmetabolismus eine weitere Möglichkeit darstellt, einen Prozeß zu optimieren. Dazu ist eine genaue Kenntnis der zellphysiologischen Eigenschaften erforderlich.

## 4.9 Wachstum und Stoffwechsel während der Kultivierung mit Glutamat als Glutaminersatz

Der Einsatz von Glutamin scheint bei vielen Zelllinien essentiell. Glutamin fungiert als Amidendonator bei der Nukleotidsynthese. Der Aufbau von Glutamin aus Glutaminsäure verläuft über die Glutaminsynthetase, ein durch viele negative Rückkopplungs-Modulatoren komplex regulierbares Enzym. Häufig bedeutet deshalb eine Limitierung dieser Aminosäure den Wachstumsstop. Neuerdings versucht man über Transfektion des Glutaminsynthetase- Expressionssystem (z.B. pCMGS.gtp)<sup>[107][108]</sup> auf Glutamin als Substrat im Zellkulturmedium zu verzichten, zumal durch die in Zellkulturen dominierende Reaktion der Glutaminolyse toxisches Ammoniak freigesetzt wird. Zu diesem Zweck wurden Spinnerkultivierungen durchgeführt, in der die Aminosäure Glutamin durch das Desaminierungsprodukt Glutamat ersetzt wurde. Als Referenz diente eine Kultivierung unter Standardbedingungen aus gleicher Vorkultur.

Der Vergleich der Parameter unter beiden Bedingungen erfolgt tabellarisch:

Parameter	Dimension	Sp+Glu	Sp+Gln	$\Delta$
max Zellzahl	[ $10^6$ Ze/ml]	1,16	2,13	-45,5%
ATIII-Titer	[mg/L]	16,4	16,07	+2%
$\mu_{\text{mittel}}$	[d <sup>-1</sup> ]	0,671	0,747	-10%
T lim. Glukose	[h]	88	66	+25%
q <sub>Glukose</sub>	[mg/( $10^6$ Ze·d)]	-1,164	-1,508	-23%
q <sub>Laktat</sub>	[mg/( $10^6$ Ze·d)]	1,113	1,522	-27%
$\theta_{\text{Lac/Glc}}$	[g/g]	0,96	1,1	-13%
q <sub>Glutamat</sub>	[mg/( $10^6$ Ze·d)]	-16,24		-92%
q <sub>Glutamin</sub>			-197,94	
q <sub>NH4</sub>	[mg/( $10^6$ Ze·d)]	4,83	20,94	-77%
$\theta_{\text{NH4/Gln(u)}}$	[mmol/mmol]	1,5	0,877	+42%
q <sub>Alaenin</sub>	[mg/( $10^6$ Ze·d)]	25,65	57,32	-55%
q <sub>Glycin</sub>	[mg/( $10^6$ Ze·d)]	17,56	8	+120%

Tabelle 4.9.1: Tabellarischer Vergleich der Parameter bei der Kultivierung mit (Sp+Gln) und ohne Glutamin (Sp+Glu).

Es zeigt sich zwar ein besseres Wachstum in der Referenzspinnerflasche, jedoch stellt sich auch bei Sp+Glu ein gutes Zellwachstum ein ( $\mu=0,671 \cdot [d^{-1}]$ ). Die mittlere Wachstumsrate der Referenzkultur beträgt  $0,747 \cdot [d^{-1}]$ , d.h. die Glutaminsynthetase dieser Zelle scheint zu funktionieren.

Im Falle des Wachstums bei Glutamatzusatz erkennt man schon bei der Betrachtung der Glukosekonzentrationsverläufe, den reduzierten Verbrauch der Glukose (Limitierung ab der 88. Std.), wohingegen in der Referenzflasche die Glukose schon nach 66 Std. vollständig verbraucht wird. Die Berechnung der spezifischen Glukoseverbrauchsrate ergibt bei Sp+Gln  $1,508 [mg/(10^6Ze \cdot d)]$ , wohingegen der Verbrauch bei Sp+Glu um ca. 23 % niedriger liegt ( $q_{Glc} = 1,164 [mg/(10^6Ze \cdot d)]$ ). Analog dazu verhält sich die Laktatbildungsrate. Bei Sp+Gln liegt sie mit  $1,522 [mg/(10^6Ze \cdot d)]$  geringfügig höher als die Glukoseverbrauchsrate, bei Sp+Glu mit  $1,113 [mg/(10^6Ze \cdot d)]$  geringfügig niedriger. Alle Raten wurde über „least-square-fitting“ berechnet.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der metabolischen Flußanalyse, ist zu folgern, daß der Substratersatz Glutaminsäure einen geringeren anaplerotischen Fluß bewirkt. Dieser verhindert, daß der Citratcyklus kollabiert. Folglich muß weniger Malat den Citratcyklus über den Malat- $\alpha$ -Ketoglutarat-Antiporter verlassen, so daß gemessen an der eingesetzten Glukose weniger Laktat produziert wird. Dies ist auch der Fall, denn bei der Berechnung des Laktatausbeutekoeffizient bei Sp+Gln zeigt sich, daß  $\theta_{Lac/Glc}$  um 13 % höher liegt als bei Sp+Glu (1,1 statt 0,96). Zum Vergleich: die Glutaminolyse beträgt 13,12 % des glykolytischen Flusses. Es liegt also nahe, daß der Überschuß an C4-Körpern über den Malat-Shunt zu Laktat ausgeschleust wird.

Im Experiment Sp+Glu wurde eine spezifische Glutamatverbrauchsrate von  $16,24 mg/[10^6Ze \cdot d]$  festgestellt, wohingegen die spezifische Verbrauchsrate von Glutamin bei Sp+Gln im gleichen Zeitraum  $197,94 mg/[10^6Ze \cdot d]$  beträgt, d.h. der anaplerotische Fluß ist um 91,8 % erniedrigt.

Als Konsequenz wird, aufgrund der nicht vorhandenen Glutaminolyse, eine vergleichsweise geringe Alaninproduktion erwartet. Alanin bindet den in der Glutaminolyse frei gesetzten Ammoniak.  $q_{Ala}$  betrug bei Kultivierung Sp+Gln  $57,32 mg/[10^6Ze \cdot d]$ , in Kultivierung Sp+Glu jedoch nur  $25,65 mg/[10^6Ze \cdot d]$ , d.h. die Alaninproduktion ist auf 45 % reduziert.

Paredes et al.<sup>[107]</sup> berichteten bei einer mit dem GS-Expressionssystem transfizierten Hybridoma-Zelllinie über eine fast 50 %ige Reduzierung des glykolytischen Flusses im Vergleich zur parentalen Zelllinie. Erklärt wurde dies durch die nicht benötigte Menge an Pyruvat, die üblicherweise für die Transaminierungsreaktion zu Alanin zur Verfügung stehen muß.

Man kann davon ausgehen, daß dies bei Sp+Glu zum Teil auch der Fall ist. Auch hier ist der glykolytische Fluß um 23 % reduziert, jedoch ist die Alaninproduktion nicht vollständig



unterdrückt, weil sowohl beim Abbau diverser Aminosäuren als auch durch die desaminierende Wirkung der Asparaginase Ammoniak anfällt, was durch  $\alpha$ -Ketoglutarat über eine Transaminierung auf Glutamat übertragen wird. Diese Reaktionen sind abhängig von der Verfügbarkeit von  $\alpha$ -Ketoglutarat, welches durch den geringeren Glutamat-Fluß in die Zelle jedoch beschränkt ist. Dies erklärt nicht nur die reduzierte Alanin-Produktion, sondern auch die Drosselung des Verbrauchs vieler Aminosäuren auf 55-60 % im Vergleich zur Referenzkultivierung. Lediglich die Glycinproduktionsrate war mit 17,56 mg/[10<sup>6</sup>Ze·d] mehr als doppelt so hoch wie bei Sp+Gln (8 mg/[10<sup>6</sup>Ze·d]). Sie stellt für die Zelle eine weitere Möglichkeit der Ammoniakentgiftung dar, und konkurriert in diesem Fall mit der Entgiftung über Glutamat. Der Rest wird als freies Ammonium ins Medium ausgeschleust:

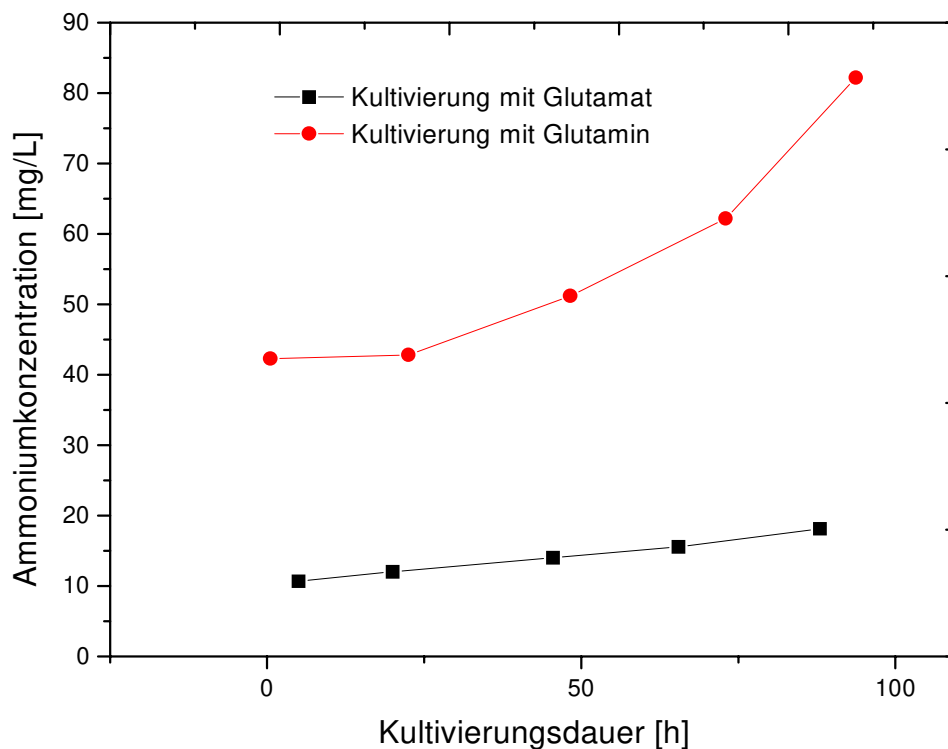


Abbildung 4.9.1: Vergleich der Ammoniumkonzentrationsverläufe bei Sp+Gln und Sp+Glu. Zur eindeutigen Interpretation sind nur Meßwerte während der exponentiellen Wachstumsphase dargestellt.

Die Ammonium-Produktion ist bei der Kultivierung mit Glutamat drastisch gesenkt. Dagegen sind sowohl der absolute Wert (82 mg/L) als auch der Grundwert des Startmediums (42 mg/L) bei Glutaminzusatz deutlich höher. Dies läßt einerseits darauf schließen, daß schon zu Beginn der Kultivierung ein großer Teil des Glutamins thermisch zerfallen ist. Desweiteren werden durch die heftige Glutaminolyse große Mengen des Zellgiftes freigesetzt. Durch die Ersatzmaßnahme konnte die spezifische Ammoniumbildungsrate  $q_{\text{NH}_4}$  um 77 % von 20,94 auf 4,83 [mg/(10<sup>6</sup>Ze-d)] reduziert werden. Bei der Berechnung des Ausbeutekoeffizienten  $\theta_{\text{NH}_4/\text{Gln}}$  ergibt sich ein Wert von 0,877, was bedeutet, daß ein gewisser Anteil des Ammoniums durch Transaminierung oder Glycinproduktion abgefangen wird. Die Frage nach dem exakten Mechanismus für die Einschleusung von Glutamat in die Mitochondrien bleibt ungeklärt, d.h. ob über Transaminierung oder über die Glutamatdehydrogenasereaktion. Sicherlich entsteht der überwiegende Teil des Ammonium über die Glutaminasereaktion im Cytosol. Einen genauere Aufschluß könnte ein Experiment mittels Einsatz von <sup>13</sup>C-markiertem Glutamin geben<sup>[109]</sup>. Dies ist im Falle der Berechnung von  $\theta_{\text{NH}_4/\text{Glu}}$  anders. Hier indiziert ein Wert von 1,5 den Mangel von Glutamat für die Transaminierungsreaktionen. Offenbar verläuft der Abbau im wesentlichen über die Glutamatdehydrogenase. Ein Wert für  $\theta_{\text{NH}_4/\text{Gln}} > 1$  zeigt weiter, daß auch andere Desaminierungsreaktionen stattfinden müssen (Asparaginase).

#### 4.9.1 Schlußfolgerungen

Die Kultivierung mit Glutamat als Glutaminersatz bewirkt folgende Veränderungen im Wachstums und Stoffwechselverhalten: Es zeigt sich eine Verlangsamung des Zellwachstum, die durch die Geschwindigkeitsbeschränkung in der Aufnahme von Glutamat für die Energiesynthese erklärt werden kann. Sicherlich spielt auch die hier weiterhin vermutete geschwindigkeitsbestimmende Funktion der Glutaminsynthetase eine Rolle. Trotz niedriger Zellzahl wird eine im Vergleich zum Versuch mit Glutamin gleichbleibende Produktmenge generiert, was als äußerst positiv eingestuft wird. Des weiteren kann eine Reduzierung (ca. 70%) des toxischen Metaboliten Ammonium erreicht werden.

Nachteilig wirkte sich eine verstärkte Aggregationsbildung aus, die insbesondere die Bestimmung einer exakten Zellzahl erschwerte. Vermutet wird hier eine Art Mediatorfunktion des geladenen Glutamats. Die Zusammenhänge können jedoch durchaus komplexerer Natur sein.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz verschiedener Prozeßführungen zur Charakterisierung der Stoffwechselaktivität dieser Zelllinie zeigte eine große Flexibilität des Metabolismus. Die Zelle versteht es äußerst effizient ihren Energiebedarf durch Metabolisierung verschiedener Substrate sicherzustellen. Eingangs konnte das Ziel, das Stoffwechselverhalten so präzise wie möglich zu beschreiben, durch die Anwendung einer neuen Technik, der „metabolischen Flußanalyse“ realisiert werden. Diese Technik beruht auf einem stöchiometrischen Modell, welches die Hautabbauwege im Stoffwechsel unter Berücksichtigung der experimentell gemessenen Verbrauchs- und Produktionsraten bilanziert. Der Stoffwechsel im Batch-Modus unter den Standardbedingungen pH 7,2, pO<sub>2</sub> 40%, bei 100 Rpm im Rührkesselreaktor wurde als Ausgangspunkt definiert. Dieser Modus stellt im allgemeinen die gängigste Kultivierungsart zur Produktion von rekombinanten Proteinen mittels tierischer Zellkulturen dar. So zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen ein immens hoher glykolytischer Fluß der Zellen manifestiert wird, der sich unter unregulierten Bedingungen, d.h. insbesondere bei Sauerstofflimitierung weiter erhöht. Dahingegen wird im Unterschied zu anderen Zelllinien bei geregelter Sauerstoffzufuhr eine verbesserte aerobe Verwertung im Citratcyklus sichtbar (28 % des Gesamtglukoseflusses), der mit den verbesserten Transporteigenschaften von cytosolischen zu mitochondrialem NADH erklärt wird. Im Citratcyklus wird insbesondere bei Malat eine komplexer Verzweigungspunkt postuliert. Vor allem scheint die Malatdehydrogenase geschwindigkeitsbestimmend für den Umsatz im Zyklus zu sein. Malat konnte zu keinem Zeitpunkt im Kultivierungsüberstand nachgewiesen werden, wobei die Vorstufen Citrat und Succinat insbesondere in der Gluconeogenese deutlich akkumulierten.

Über NMR spektroskopische Methoden wurde weiterhin bewiesen, daß ein von den Kultivierungsbedingungen abhängiger Anteil von Malat aus den Mitochondrien ausgeschleust wird und über den Malat-Shunt zur Laktatproduktion beiträgt. Die Bestimmung des Markierungsgrades im Laktat ergab, daß bei Verwendung vollständig <sup>13</sup>C-markierter Glukose deutliche Anteile von ungelabelten oder teilweise gelabelten Molekülen detektiert wurden, die vorwiegend aus dem verstoffwechselten Glutamin entstammen. Dies lag in Übereinstimmung mit der postulierten Flußverteilung des Modells. Tendenziell wird bei Sauerstofflimitierung ein größerer Fluß des Malat-Shunts postuliert. Diese Beobachtung korreliert auch damit, daß bei Kultivierungen in Spinnerflaschen Laktatausbeutekoeffizienten oberhalb 1 berechnet werden, während in Bioreaktoren Werte von 0,7-0,75 eine effiziente oxidative Decarboxylierung indizieren.

Die als „Metabolic Engineering“ bekannte Umgestaltung der intrazellulären Flußverteilung wurde hier auf Basis einer verbesserten Mediumgestaltung der Hauptsubstrate Glukose und Glutamin, bzw. geschickter Zufütterungstechniken im Fed-Batch-Modus umgesetzt. So zeigten sich bei kontinuierlichen Chemostatversuchen deutlich veränderte Metabolisierungsraten der Hauptsubstrate, wenn die Zulaufkonzentrationen von Glukose und Glutamin sukzessive gesenkt wurden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß bei einer Austauschrate von  $0,57 \cdot d^{-1}$  im Gleichgewicht eine Menge von 0,45 g/L Glukose und 125 mg/L Glutamin ausreichend sind, um eine Zellkonzentration von ca.  $1,0 \cdot 10^6 Ze/ml$  zu versorgen. Dies entspricht einer Reduzierung für Glukose bis auf 25 % der Eingangskonzentration, für Glutamin jedoch nur um 50 % der ursprünglichen Konzentration und demonstriert die Ausnahmestellung dieser Aminosäure. Die Erniedrigung der Glutaminkonzentration auf 62,5 mg/L hatte einen Einbruch in der Zellkonzentration bis auf ca.  $0,85 \cdot 10^6 Ze/ml$  zur Folge.

Die spezifischen Verbrauchsdaten konnten für  $q_{Glc}$  von 1,5-1,8 bis auf 0,4-0,5 [ $mg/(10^6 Ze \cdot d)$ ] gesenkt werden. Für  $q_{Gln}$  wurde anfangs ein Wert von 0,080-0,100 [ $mg/(10^6 Ze \cdot d)$ ] berechnet, der im Verlaufe der Glukosereduzierung bis auf 0,175 [ $mg/(10^6 Ze \cdot d)$ ] anstieg und den höheren Bedarf dieser Aminosäure zum Zweck der Energieerhaltung indiziert.

Die Verbrauchsrate während der Glutaminreduzierung betrug letztendlich 0,060 [ $mg/(10^6 Ze \cdot d)$ ]. Es zeigte sich aber wie schon erwähnt, daß die Substratversorgung hier nicht mehr sichergestellt war.

Während der Glutaminreduzierung war generell eine Umstellung im Aminosäurestoffwechsel zu erkennen, was anhand der Verstoffwechslungs- und Bildungsdaten der Aminosäuren Alanin, Glycin, Glutamat, sowie Asparagin und Aspartat dokumentiert werden kann und die regulative Eigenschaft von Glutamin für den Citratzyklus hervorhebt.

Der Versuch Glutamin durch Glutamat als Substrat zu ersetzen gestaltete sich erfolgreich, und wird als Beweis angeführt, daß im Gegensatz zu anderen Zelllinien die Aktivität der Glutaminsynthetase vorhanden ist. Die Wachstumsgeschwindigkeit war um ca. 10 % gesenkt. Es konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung von Glutamat als anaplerotische Aminosäure für den Citratzyklus, sich auch die Glykolyserate um 23 % senken ließ ( $q_{Glc}$ : 1,160 statt 1,5 [ $mg/(10^6 Ze \cdot d)$ ]). Glutamat wird im Gegensatz zu Glutamin mit einer Rate von 0,016 [ $mg/(10^6 Ze \cdot d)$ ] verstoffwechselt ( $q_{Gln}$  0,197 [ $mg/(10^6 Ze \cdot d)$ ]), was in dem verminderten aktiven Transport dieser Komponente in die Zelle begründet liegt. Die Produktivität der Zellen wurde davon nicht beeinflußt. Im Gegenteil, trotz der geringeren Zellzahl wurde eine analoge Produktmenge gewonnen. Damit bestätigte sich eine vorher aufgestellte Hypothese: Bei geringerer Wachstumsgeschwindigkeit wird eine höhere spezifische Produktionsrate festgestellt, die absolute Produktmenge ist jedoch über die Biomasse definiert.

Die Anwendung einer Fed-Batch-Prozeßführung zeigte sich aufgrund optimaler Raum-Zeit-Ausbeuten (5-5,75 [mg/(L·d)]) als am besten geeignetes System für die Optimierung eines Produktionsprozeß. Durch Etablierung einer geeigneten Fütterungsstrategie gelang es hier erstmalig eine Umstellung im Zellstoffwechsel von Glykolyse zu Gluconeogenese zu induzieren. Mit Gluconeogenese ist hier die Wiederverwendung des Stoffwechselmetaboliten Laktat gemeint. Laktat wird von jeher als primärer Inhibitor in Zellkulturen angesehen.

Die Umstellung im Stoffwechsel konnte dadurch erreicht werden, daß auf eine weitere Glukosefütterung verzichtet wurde, da dies eine weitere Laktatproduktion der Zellen anregte. Dies hatte zur Folge, daß innerhalb kürzester Zeit eine hohe Akkumulation dieses Metaboliten ein rapides Zellsterben verursachte.

Aufgrund einiger irreversibler Reaktionen im glykolytischen Abbauweg ist der gluconeogenetische Weg im hohen Maße energieaufwendig. Durch die Fütterung der anaplerotischen Aminosäuren Glutamin und Asparagin wurde eine verstärkte Energiegewinnung über den Citratcyklus angeregt und ermöglichte die bislang bei Zellkulturen nicht beobachtete vollständige Laktatwiederverwertung.

Die Laktatkonzentration durchläuft ein Maximum zum Zeitpunkt der Glukoselimitierung, deren numerischer Wert abhängig von der Eingangsglukosekonzentration ist. Grundsätzlich zeigte sich eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit bei reduzierter Eingangskonzentration der Glukose. So beträgt  $\mu=0,542 \cdot d^{-1}$  bei  $S_0Glc=2,11$ , wohingegen  $\mu=0,97 \cdot d^{-1}$  bei  $S_0Glc=1,47$  um 44 % höher liegt. Die gedrosselte Laktatproduktion führt zur einer geringeren Wachstumsinhibierung durch Laktat. In der gluconeogenetischen Phase war es bei ständiger Brennstoffversorgung durch die zugefütterten Aminosäuren möglich, den toxischen Einfluß des Laktats abzuschwächen und längere Zeit ohne Vitalitätsverlust (90 % Vitalität nach 180 Std. Kultivierungsdauer) im Fed-Batch-Modus zu arbeiten. Die Sicherstellung der Brennstoffe war nach anfänglicher pulsweiser Zufütterung nur noch durch kontinuierliche Zufütterung zu gewährleisten, was den immensen Bedarf an diesen Aminosäuren unter glukoselimitierten Bedingungen verdeutlicht. Die manuell eingestellte Zufütterungsrate betrug 210 (mg/L·d) für Glutamin und 48 (mg/L·d) für Asparagin und ergab sich aus den spezifischen Verbrauchsraten in dieser Phase und der aktuellen Zellzahl. Zur on-line Detektion von Glutamin wurde ein Fließinjektionssystem (FIA) entwickelt. Das Prinzip beruht auf der kolorimetrischen Detektion des bei der Glutaminasereaktion freiwerdenden Ammoniums. Die Etablierung einer gesteuerten Zufütterung auf Grundlage des FIA-Systems scheiterte an der unter Kultivierungsbedingungen fehlenden Langzeitstabilität des Analysesystems. Die Weiterentwicklung und Etablierung dieser Methode scheint aus prozeßtechnischen Gründen sinnvoll und könnte ein

zukunftsweisendes Werkzeug für die Prozeßkontrolle darstellen. Im off-line-Betrieb war die Detektion von Glutamin mittels dieser Methode reproduzierbar möglich.

Die permanente Bereitstellung der Substratquellen Asparagin und Glutamin führt zu einer ausgedehnten Wachstumsperiode und einer Steigerung der Biomasse bis auf  $4,0 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$ , was hinsichtlich glukosegefütterter Kultivierungen eine Optimierung von annähernd 300 % bedeutet. Die Wachstumsdauer ließ sich durch Etablierung der Aminosäurenachfütterung bis auf 150 Std. hinauszögern. Das ab der 150. Std. eingestellte Zellwachstum kann durch die Limitierung weiterer essentieller Aminosäuren wie Phenylalanin, Cystein, Tryptophan und Methionin erklärt werden. Die Supplementierung dieser Aminosäuren im verwendeten Medium reicht nicht aus, um eine Biomasse von mehr als  $3,0 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$  zu generieren. Eine Nachfütterung dieser Komponenten führte zu einer weiteren Biomassesteigerung auf ca.  $5,0 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$ . Dennoch traten nachfolgend weitere Limitierungen anderer essentieller Aminosäuren auf.

Die Nachfütterungskombination von Glukose und Glutamin bewirkte durch die dadurch induzierte exzessive Nährstoffverwertung eine schnelle Anhäufung der toxischen Abbauprodukte Laktat, Succinat und Citrat, was sich äußerst nachteilig in der Wachstumsbereitschaft der Zellen auswirkte. Es konnte gezeigt werden, daß durch einfache Variation der Hauptsubstrate, sowie durch Nachfütterungsschritte, die den Bedürfnissen der Zellen angepaßt sind, eine eingreifende Optimierung des Produktionsprozesses möglich ist. Durch die Etablierung dieser Techniken wurde vorwiegend das Zellwachstum stimuliert, welches aufgrund der offensichtlichen Kopplung an die Produktivität eine effiziente Produktakkumulation zur Folge hatte.

Dennoch ist die Produktion rekombinanter Proteine unter diesen Umständen in Systemen, in denen sich durch ständig ändernde Bedingungen keine Produkthomogenität einstellen kann, sehr kritisch zu betrachten. Es müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die den Einfluß diverser Bedingungen (Anhäufung der Metabolite Ammonium und  $\text{CO}_2$ , Proteaseaktivität etc.) auf die Produktheterogenität charakterisieren (Identität mit dem humanen Protein). Bei vorhandener komplexer Antigenität in der Glykosylierung müssen Kontrollmechanismen durchdacht werden, die dieser Variabilität entgegenwirken. Im Rahmen der Möglichkeit dieser Arbeit war lediglich eine Quantifizierung des rekombinanten Proteins durchzuführen.

Für die prozeßtechnischen Optimierung ist insbesondere die kontrollierte Zufütterung der Substrate eine zu verbessernde Technik. Die Zufütterung muß dem Bedarf der Zellen angepaßt sein, um eine minimale Verschwendung zu ermöglichen. So z.B. wäre eine glukoselimitierte Prozeßführung denkbar, in der durch kontinuierliche Glukosezufütterung, die nur dem Wachstumsbedarf der Zellen

genügen sollte, eine Exkretion von Laktat verhindert werden kann. Analog dazu gelten die Überlegungen der Glutaminversorgung, um die Ammoniumakkumulation zu minimieren.

Im Rahmen einer genetischen Modifizierung der Zelllinie können durchaus Möglichkeiten geschaffen werden, die die Defizite der Regulation in der Glykolyse ausgleichen. So gibt es bereits Ansätze, in denen der Einsatz von Antisense-RNA die Transskription der betreffenden Enzyme wie Enolase oder Glukose-Transporter beeinflusst. Ob eine Regulation, oder im ungünstigen Fall, eine Inhibierung stattfindet, muß untersucht werden. Diese Methode wäre wie die zusätzliche Modifizierung durch Plasmid-DNA eine universelle Möglichkeit den Zellmetabolismus nach bestimmten Anforderungen zu optimieren.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Mitrahi: Biologicals produced from animal cells in culture- an overview. *Biotechnol. Adv.*, 1988, Vol. 6, Pp.207-220.
- [2] Spier, R.: *Animal Cell Technology: an overview. Journal of chemical Technology and Biotechnology.* 1982, Vol.32: 204.
- [3] Goeddly, D.V., Hleind, D.G, Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yamasura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Riggs, A.D.: Expression of chemically synthesized gene for human Insulin in *E. coli*. *Proc. Acad. Sci. USA*, 1976, Vol.76, Pp. 106-110.
- [4] Borys, M.C., Linter D., Patoutzakis,E.T.: Ammonia effects the glycosylation pattern of recombinant mouse placental lactogen I by chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner.
- [5] The 15<sup>th</sup> ESACT meeting: *Animal Cell Technology: New developments-New applications.* 1997, Programme Abstract.
- [6] Eagle H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 1955, Vol. 122, Pp. 501-504.
- [7]Morgan, M.J., Falk, P.: Carbohydrate metabolism in cultured animal cells. *Bioscience Reports*, 1981,Vol.1, Pp. 669-686.
- [8] Mourey L., Samana J.P., Delarue M., Choay J., Lormeau, J.C., Petitou, M., Moras: Antithrombin-III: Structural and functional aspects, *Biochimie* 1990, Vol. 72., Pp. 599-608.
- [9] Franzen L.E., Svenson, S.: Structural studies on carbohydrate portion of human antithrombin III. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, Vol. 5090-5093.
- [10] Zettlmeissl G., Conradt, H.S., Nimtze, M. Karges,: Characterization of recombinant human antithrombin III synthesized in chinese hamster ovary. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, Vol. 265.
- [11] Alberts, B., Bray ,D., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D.: *Molecular Biology of the Cell* 1994, Garland Publishing, New York.
- [12] Lehninger, Albert L.: *Prinzipien der Biochemie.* de Gruyter, 1986.
- [13] Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie.* Thieme Verlag Stuttgart/NewYork,14. Auflage 1994.
- [14] Bonarius, Hatzimanikatis, Meesters, de Gooijer, Schmid and Tramper: Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 50, Pp 299-318 (1996).



- [15] Shien, R.C. Goldhaber, J.I. , Stuart, J.S., Weiss, J.N.: Lactate transport in mammalian ventricle. General properties and relation to  $K^+$  fluxes. *Circ. Res.*, 1994, Vol.74, Pp. 829-838.
- [16] Greenhouse, W.V. and Lehninger, A.L.: Occurance of the malate-aspartate-shuttle in various tumor types. *Cancer Res.*, 1976, Vol. 36, Pp. 1392-1396.
- [17] Lopes-Alcaron, L., Eboli, M., de Liberali, E., Palombini, G. and Galeotti, T.: Evidence for the oxidation of glycolytic NADH, by the malate-aspartate-shuttle in Ehrlich ascite tumor cells. *Biochemistry & Biophysics* 1979, Vol. 192 Pp., 391-395.
- [18] Hopfer, U.: Digestion and absorption of basic nutritional constituents. In: Devlin T.M.: *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. Wiley-liss, New York, 4. Edition, 1997. Pp.1055-1086.
- [19] Produktbroschüre Ovest International: Protein Derivied Peptide Mixtures can effectively replace free amino acids in cell culture media. 1997 Quest International, The Netherlands.
- [20] Cameron, D. D., and Tong, I.T.: *Cellular and metabolic engineering: An overview*. 1993 Applied Biochemistry and Biotechnology.
- [21]Bailey, J.E.: Towards a science of metabolic engineering. *Science*, 1991,Vol. 252, Pp. 1668-1675.
- [22] Stephanopoulos, G. and Vallino, J.J.: Network rigidity and metabolic engineering, metabolite overproduction. *Science* 252, Pp.1675-1681.
- [23] Stephanopoulos, G. and Sinskey, A.J.: *Metabolic engineering: Issues and Methodologies*. Trends in Biotechnology 1993.
- [24] Loreck, D.J., Galarraga, J., van der Veen, J., Phang, J., Smith, B.H., Cummins, C.J.: Regulation of the pentose phosphate pathway in human astrozytes and gliomas. 1987, *Metabol. Brain Dis*, Vol.2, Pp. 31-46
- [25] Portrais, J-C., Schuster, R., Merle, M., Canioni, P.: Metabolic flux determination in C6 glioma cells using carbon 13 distribution upon  $[1-^{13}C]$  glucose incubation. 1993, *Eurp. Journal of biochemistry*, Vol. 217, Pp. 457-468.
- [26] Mancuso, A., Sharfstein, S., Tucker, T., Clark, D. and Blanch, H.: Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma, with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, Vol. 44, Pp.563-585.
- [27] Sharfstein, S., Tucker, S.N., Mancuso, Blanch., H.W., Clark, D.S.: Quantitative in vivo nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, Vol. 43, Pp.1059-1074.
- [28] Marx, A., de Graaf, A., Wichert. W., Eggeling, L. und Sahm, H.: Determiration of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, Vol. 49, Pp.111-129
- [29] Zupke, C., Stephanopolous, G.: Intrazellular flux analysis in hybridomas using mass balances and in vitro  $^{13}C$  NMR. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 45, 1995, Pp. 292-303.

- [30] Valino, J.J. and Stephanopolous, G.: Metabolic flux distribution in *C. glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, Vol.41, Pp. 633-646.
- [31] Liangzi Xie, and daniel I.C. Wang: Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, Vol. 43, Pp.1164-1174.
- [32] Fell, D.A. and Small, J.R.: Fat Synthesis in Adipose Tissue: An examination of stoichiometric constraints. *Biochemical Journal*, 1986, Vol. 238, pp. 781-786.
- [33] Varna, A. and Palson, B. O.: Metabolic Flux Balancing: Basic concepts, scientific and practical use. *Biotechnology* 1994 Vol. 12, Pp. 994-998.
- [34] Savinell, J.M. and Palson, B.O.: Network analysis of intermediary metabolism using linear optimisation. I: Development of mathematical formalism. *Journal of Theoretical Biology*, 1992 Vol. 154, Pp. 421-454.
- [35] Savinell, J.M. and Palson, B.O.: Optimal selection of metabolic fluxes for in vivo measurements. II. Application to *E. coli* and hybridoma metabolism. *Journal of Theoretical Biology*, 1992 Vol. 155, Pp. 415-242.
- [36] Paredes, C., Cairo, J.J., Sanfeliu, A., Cardenas F. and Godia, F.: Estimation of the intracellular fluxes for a hybridoma cell line by material balances. Validation by NMR.  
In Press
- [37] Renner, W.A., Lee, K.H., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. and Eppenberger, H.M.: Recombinant Cyclin E expression activates proliferation and obviates surface attachment of chinese hamster ovary (CHO) cells in protein free medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, Vol. 47, Pp.478-482.
- [38] Mohamed Al-Rubai and David Lloyd: The Cell Cycle. *The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. John Wiley&Sons scheduled publication April 1998.
- [39] Gu, M.B. Todd, P., and Kompola, D.S.: *Biotechnology and Bioengineering*, (1993) Vol. 42, Pp. 1113-1123
- [40] Watson, J., Tooze, J., Kurtz, D.: *Rekombinierte DNA*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft. 3. Auflage 1989.
- [41] Urlaub, G., Chasin, L.A., Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dehydrofolatereductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, Vol. 159, Pp. 4216-4220.
- [42] Zettlmeissl, G., Ragg, H. and Karges, H.E.: Expression of biologically active human antithrombin III in chinese hamster ovary. *Cell Culture Development Group of Behringwerke AG*, Postfach 1140 Marburg, Germany. 1987, *Bio/Technology*, Vol. 5, Pp.720-725.
- [43] Yamauch, T. and Tanebe, T.: Production of human antithrombin III in a serum free culture of CHO cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1992 Vol. 56;4, Pp. 600-604.
- [44] Zettlmeissl, M., Wirth, M., Hauser, H., and Küpper, H.A.: Efficient expression systems for human antithrombin-III in baby hamster kidney cells.

- [45] Schimke, R.T.: Gene amplification in cultured animal cells. *Cell*, 1984, Vol. 37, Pp. 705-713.
- [46] Firmenmitteilung Boehringer Ingelheim, Bioproducts.
- [47] W. Kuhlmann: Optimisation of a membrane oxygenation system for all cell culture in stirred tank reactors. *Develop. Biol. Standard.* 1987, Vol. 66. Pp. 263-268.
- [48] Weidemann, Ralf: Optimierung der Produktion von Antithrombin III mit adhären, rekombinanten Säugerzellen im Rührkesselreaktor, Dissertation Uni-Hannover Januar 1995.
- [49] Rössler, Burkhard: Prozeßcharakterisierung und Optimierung bei der Kultivierung von rekombinanten Säugerzellen unter Einsatz von On-line-Meßsystemen, Dissertation, Oktober 1995.
- [50] Fenge, Christel: Untersuchungen zur Auslegung von Perfusions-Bioreaktoren zur Kultivierung von Suspensionszellen, Dissertation Uni-Hannover, Juli 1991.
- [51] Yellow Springs Instrument Co., Inc. Yellow Springs, Ohio, 45387. Yellow Springs Model 2700, Instruction Manual.
- [52] Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 1959, Vol. 31., Pp. 426-428.
- [53] Ruzicka, J., Hansen, E.H.: The first decade of flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 179, 1986.
- [54] Ruzicka, J.: The second coming of flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 1992, Vol. 261.
- [55] Schügerl, K.: *Analytische Methoden in der Biotechnologie*. Vieweg Verlag, 1991.
- [56] Hartmeyer, W.: *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Springer Verlag, Berlin, 1986.
- [57] Jürgens, Heike: Entwicklung und Einsatz der Enzymkartuschentechnik in der Fließinjektionsanalyse. Dissertation, Universität Hannover, 1993.
- [58] Rebing, Shi: Zum Einsatz der Fließinjektionsanalyse in Verbindung mit immobilisierten Enzymen für Schadstoff- und Lebensmittelanalytik. Dissertation, Universität Clausthal, 1995.
- [59] Blankenstein, Gert: Enzym-Sensor-FIA zur Online-Prozeßkontrolle mittels Oxidasen Dissertation, Universität Düsseldorf, 1993.
- [60] van der Pool, J.: On-line Monitoring and Control of Animal-Cell-Cultures, Dissertation, Landbouwniversiteit Wageningen, November 1996, The Netherlands.
- [61] Blankenstein, Preschoff, Spohn: Determination of L-glutamate and L-glutamine by flow-injection analysis and chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 71, Pp. 231-237 (1993)
- [62] Villarta, Cunningham, Guilbault: Amperometric enzyme electrodes for the determination of L-glutamate. *Talanta*, 38, No. 1, 49-55 (1991)

- [63] White, Turner, Bilitewski, Schmid, Bradley: Lactate, glutamate and glutamine biosensors on rhodinated carbon electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 295, 243-251 (1994).
- [64] Campmajò, Carles et al.: Determination of ammonium and L-glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow injection analysis. *Cytotechnology*, 14: 177-182 (1994)
- [65] Deutsches Institut für Normung: Bestimmung von Ammonium nach Fließanalysenverfahren, DIN 38 406. Normenausschuß Wasserwesen, 1993
- [66] Thordsen, Oliver: Entwicklung neuartiger Gassensoren zur Anwendung in der Biotechnologie. Dissertation, Universität Hannover, 1994
- [67] Rieseberg, Marco: On-line Bestimmung von L-Glutamin in Zellkulturüberständen. Diplomarbeit Universität Hannover, 1997.
- [68] Hagedorn Jörg: Laufende Dissertation, Universität Hannover.
- [69] Isermann, Rolf: Digitale Regelsysteme, 2. Auflage Springer Verlag.
- [70] Liangzi Xie, and Daniel I.C. Wang: Material balance studies on animal cell metabolism using a stoichiometrically based reaction network. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, Vol. 52, Pp. 579-590.
- [71] Press. W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T.: Numerical recipes in Fortran. 2<sup>nd</sup> Edition Cambridge University Press, 1992.
- [72] Paredes, Carles: Laufende Dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona.
- [73] Lübben, H., Paredes, C., Cairo, J.: Comparison of metabolic fluxes between a hybridoma and a CHO celline; Posterpräsentation 14<sup>th</sup> ESACT Meeting (May 1996)
- [74] Creighton., T.E.: Proteines: Structures and molecular principles, Freeman New York
- [75] Reitzner, L.J. Wice, B.M., Kennel, D.: The pentose cycle. *J. Biol. Chem.* 1980, Vol. 255, Pp. 5616-5626.
- [76] Mc. Keehan, W. L.: Glutaminolysis in animal cells. In: Carbohydrate metabolism in cultured cells (Morgan, M.J., ed.) Plenum Press, New York, 1986, Pp. 111-150.
- [77] Reitzner, L.J., Wice, B.M. and Kennel D.: Evidence that glutamine not sugar is the major energy source for cultured HeLa cells. *Journal of Biology Chemistry*. 1979, Vol. 254, Pp. 2669-2676.
- [78] Zielke H.R., Zielke C.L., Ozand P.T.: Glutamine a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed. Proc.*, 1984, Vol.43, Pp.121-124.
- [79] Coleman, P.S., Lavietes, B.B.: Membrane cholesterol tumorigenesis, and the biochemical phenotype of neoplasia. *CRC Critic. Rev. Biochem.* 1981, Vol. 11, Pp. 341-393.
- [80] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 3. überarbeitete Auflage 1987, Thieme Verlag Stuttgart New York.

- [81] Hülscher, M., Onken, U.: Mechanical damage of suspended animal cells in directly sparged bioreactors. In: Spier, Griffiths, and MacDonald: Production of biologicals from animal cells in culture. Butterworth, Stoneham, .MA. 1992, Pp. 195-201.
- [82] Miller, G.W., Wilke C.R., and Blanch H.W.: Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions to continous culture : 1. Glucose pulse and step changes. Biotechnology and Bioengineering, 1989, Vol. 33 Pp. 477-486.
- [83] Miller, G.W., Wilke C.R., and Blanch H.W.: Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions to continous culture : 2.. Glutamine pulse and step changes. Biotechnology and Bioengineering, 1989, Vol. 33 Pp. 487-499.
- [84] Miller, G.W., Clark, D.S. and Blanch, H. W.: Cell retention-chemostat studies of hybridoma growth and metabolism in continous suspension culture on serum free media. Biotechnology and Bioengineering, 1993, Vol. 42, Pp. 185-195.
- [85] Lin, A.A., Nguyen, T., Miller, W.M.: A rapid method for counting cell nuclei using a particle sizer/counter. Biotechnology Techniques, 1991, Vol. 5, Pp. 153-156.
- [86] Liangzi, Xie and Daniel I.C. Wang: Energy Metabolism and ATP Balance in Animal Cell Cultivation using a stoichiometrically based reaction network. Biotechnology and Bioengineering, 1996, Vol. 52, Pp. 591-601
- [87] Liangzi, Xie and Daniel I.C. Wang: Metabolism using a stoichiometrically based reaction network. Biotechnology and Bioengineering, 1996, Vol. 52, Pp. 579-590.
- [88] Carruthers, A.: Sugar transport in animal cells: the passive hexose transfer system. 1984, Prog. Biophys. Mol. Biol., Vol. 43, Pp. 33-69.
- [89] Germinario, R.J. Lakshami, T.J.M., Thirion: Kinetic characteristics and regulation of hexose transports in galaktokinase-negative chinese hamster fibroblasts cell line. 1989, J. Cell Physiol., Vol. 138, Pp. 300-304.
- [90] Schlaeger. E.-W. and Schumpp, B.: Studies on mammalian cell growth in suspension Culture. In : Advances in Animal Cell Biology, and Technology for Bioprocesses. Butterworth, Sevenoaks 1989, Pp. 386-396.
- [91] Martinelle, K. and Häggerström, L.: Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across the membranes. Journal of Biotechnology, 1993, Vol.30, Pp. 339-350.
- [92] Ryell, T. Valley, U. and Wagner, R.: Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. Biotechnology and Bioengineering, 1994, Vol. 44, Pp.184-193.
- [93] McQueen, A., Bailey, E.J.: Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. Biotechnology and Bioengineering, 1990, Vol. 35, Pp. 1067-1077.

- [94] Negrotti, M., Murray, K., Reidy, T.J., Krok, K., Seaver, S.S.: Effect of glutamine and ammonia on hybridoma cell proliferation and antibody production. Proceedings of the second engineering foundation conference on animal cell culture. Santa Barbara, CA, P.65.
- [95] Hansen H.A., Emborg, C. Influence of ammonium on growth, metabolism, and productivity of a continuous suspension chinese hamster ovary culture. Biotechnology Prog., 1994, Vol. 10, Pp. 121-124.
- [96] Dyken, J.J. and Sambatis, A.: Ammonium selectively inhibits the regulated pathway of protein secretion in two endocrine cell lines. Enzyme Microbial Technology: 1994, Vol. 16, Pp. 90-98.
- [97] Cayli, A., Wagner, R.: How ammonium dominates the metabolism of in vitro cultured mammalian cells. Proceedings of 15<sup>th</sup> ESCACT Meeting, 1997.
- [98] Schmid, G., Johannsen, R.: Metabolic quotients for recombinant CHO and BHK cell lines producing human antithrombin III. Biotechnology Letters, 1990, Vol. 12, Pp. 317-322.
- [99] Rössler, B. Lübben, H. and Kretzmer, G.: Temperature: A simple parameter for process optimisation in fed-batch cultures of recombinant chinese hamster ovary cells. Enzyme and microbial technology, Vol. 18, Pp. 423-427, Elsevier.
- [100] Lübben, Holger: Einfluß der Temperatur auf das Wachstums-, und Produktionsverhalten rekombinanter CHO Zellen. Diplomarbeit, 1994, Universität Hannover.
- [101] Liangzi, Xie, and Daniel I.C. Wang: Fed batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. Biotechnology and Bioengineering, 1994, Vol. 43, Pp.1175-1189.
- [102] Noe, W., Schorn, P., Bux, R., Berthold W.: Fed batch strategies for mammalian cell cultures.
- [103] Kurokawa, H., Park, Y.S., Iijima, S., Koboyashi, T.: Growth characteristics in fed-batch-culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. Biotechnology and Bioengineering, 1994, Vol. 44, Pp. 95-103.
- [104] Otzturk, S.S., Palson, B.O.: Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. Biotechnology Progress, 1991, Vol. 7, Pp. 481-494.
- [105] Otzturk, S.S., Palson, B.O.: Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 1. Analysis of data from controlled batch reactors. Biotechnology Progress, 1991, Vol. 7, Pp. 471-480.
- [106] Glacken, M.W., Fleischaker, R.J. and Sinskey, A.J.: Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. Biotechnology and Bioengineering, 1986, Vol. 28, Pp. 1376-1389.
- [107] Paredes, C., Cairo, J.J., Bebbington C.R., Sola, C. and Godia, F.: Effect of the expression of glutamine synthetase gene on the intracellular metabolic fluxes of a hybridoma cell line. In Press

- [108] Bebbington, C.R., Renner, G., Thompson, S., King, D., Abrams, D. and Yarranton, G.T.: High level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Bio/Technology* 1990, Vol. 10. Pp. 169-175.
- [109] Drews, M., Doverskog, M., Öhman, L., Jakobsson, U., Kuchel, P., Häggström, L.: A study on the nitrogen metabolism in cultured SF-9 insect cells using  $^{15}\text{N}$ -labeled substances and inverse heteronuclear  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy. 15 ESACT Meetings Proceeding, 1997, Tours.
- [110] Harry Holms: Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia Coli*, 1996, FEMS Microbiology Reviews Vol.19, Pp.85-116.
- [111] Glacken, M.W.: Catabolic control of mammalian cell culture. *Biotechnology* 1988, Vol. 6, Pp. 1041-1050.
- [112] Newland., M. Greenfield P.F. and Reid, S.: Hybridoma growth limitations: The role of energy metabolism and ammonia production. *Cytotechnology*, 1990, Vol. 3, Pp. 215-229.
- [113] Dalili, M., Sayles, G. and Ollis, D.: Glutamine-limited batch hybridoma, growth and antibody production: Experiment and model. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, Vol. 36, Pp. 74-82.

## 7. Anhang

### 7.1 Symbole und Abkürzungen

Stoffwechsel :

AcCoA	AcetylCoenzymA
$\alpha$ KG	$\alpha$ -Ketoglutarat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
m	Prefix für mitochondrialer Metabolit
Cit	Citrat
CoA	Coenzym A
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Glc6P	Glukose-6-Phosphat
Mal	Malat
M	molar
$N^5N^{10}$ MetylFH <sub>4</sub>	$N^5N^{10}$ -Methyltetrahydrofolsäure
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Oxal	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PPP	Pentose Phosphat Weg
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
R5P	Ribose5-Phosphat
SuccCoA	SuccinylCoenzym A
TCA	Tricarbonsäurezyklus

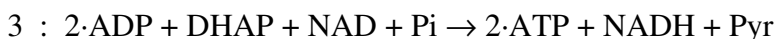
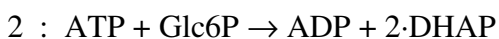
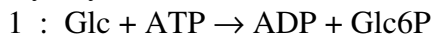
Abb.	Abbildung
AT-III	Antithrombin III
CAFCA	Computer Assisted Flow Control & Analysis.
CHO	Chinese hamster ovary
d	Verdünnungsrate
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay
FIA	Flies-Injektions-Analyse
FMOC	9-Floueryl-methyloxy-carbonylchlorid
GOD	Glukoseoxidase
h	Stunde
HPICE	High Performance Ion Chromatography Exclusion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K <sub>s</sub>	Monodkonstante



$k_d$	Zerfallskonstante
LOD	Laktatoxidase
$\mu$	Wachstumsrate
min	Minuten
MDCK	Madin Darbin-Canine-Kidney
MFA	Metabolische Flußanalyse
MTX	Methothrexat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuklear Overhauser Effekt
OPA-MCE	Ortho-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol
OPD	OrthoPhenylendiamin
$pO_2$	Gelöftsauerstoffkonzentration
$q$	spezifische Verbrauchs- bzw. Bildungsrate
rpm	Umdrehungen pro minute
$\varphi$	Verhältnis Ammonium aus chemischer Zerfallsreaktion an Gesamtammoniumkonzentration
$\theta, Y$	Ausbeutekoeffizient
X	Biomasse
U	Units
$\dot{V}$	Durchflußrate
$V_R$	Reaktorvolumen
Ze	Zellzahl

## 7.2 Reaktionen des stöchiometrischen Netzwerk

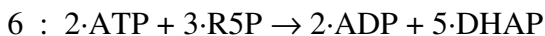
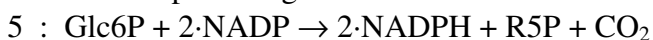
Glykolyse:



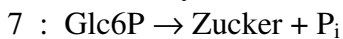
Laktat Bildung:



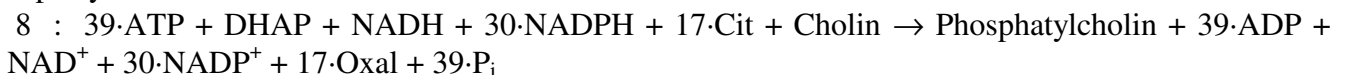
Pentose-Phosphat-Weg



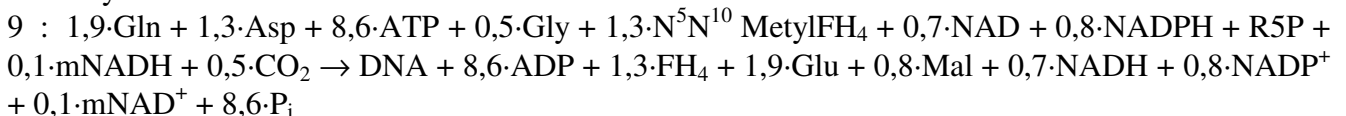
Zellmaterial Synthese:



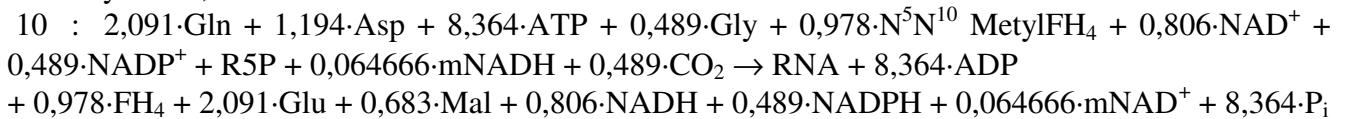
Lipidsynthese:



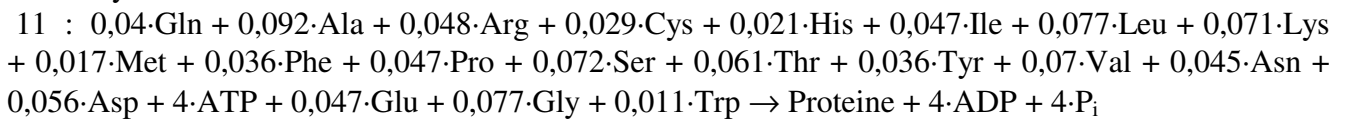
DNA Synthese:



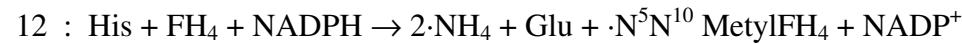
## RNA-Synthese:



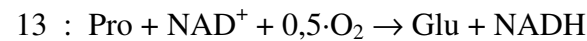
## Proteinsynthese:



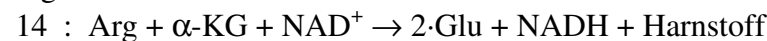
## Histidin Abbau:



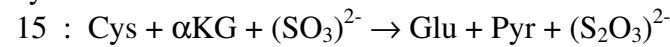
## Prolin Abbau:



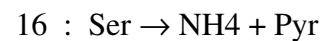
## Arginin Abbau:



## Cystein Abbau:



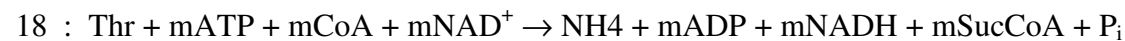
## Serin Abbau:



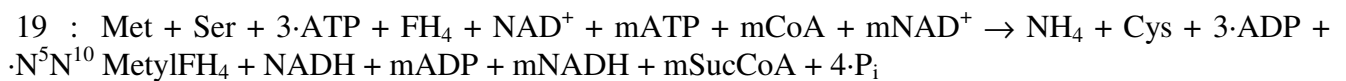
## Glycin Synthese:



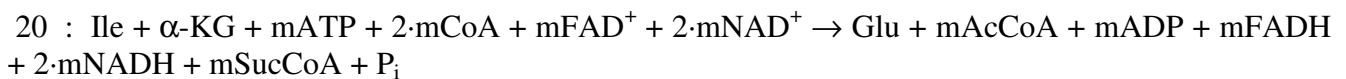
## Threonin Abbau:



## Methionin Abbau:



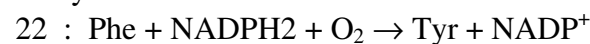
## Isoleucin Abbau:



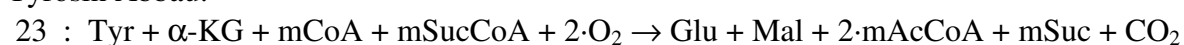
## Valin Abbau:



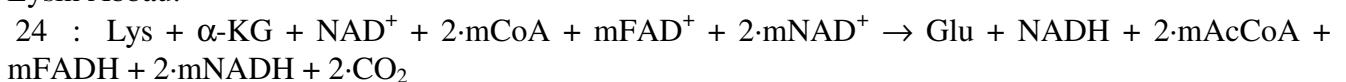
## Phenylalanin Abbau:



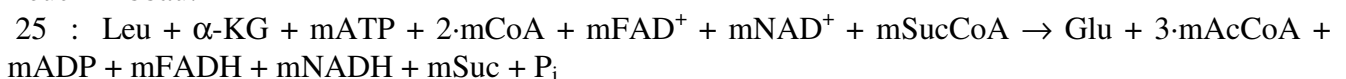
## Tyrosin Abbau:



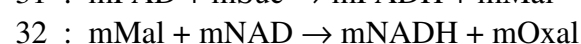
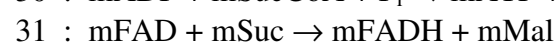
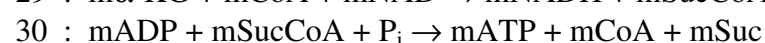
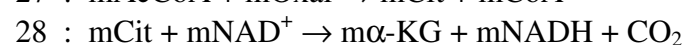
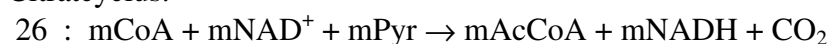
## Lysin Abbau:



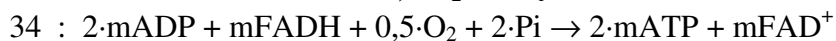
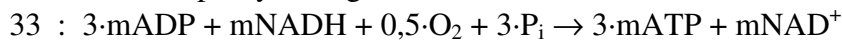
## Leucin Abbau:



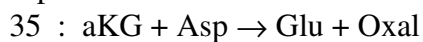
## Citratcyclus:



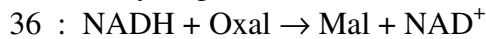
Oxidative Phosphorylierung :



Aspartat Abbau:



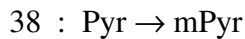
Malat Dehydrogenase:



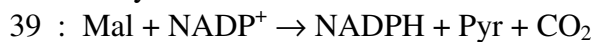
Glutamat Transporter:



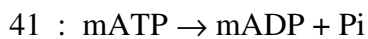
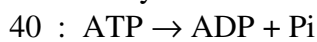
Pyruvat Transporter:



Malic Enzym



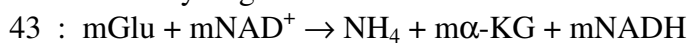
Leerlauf-Zyklus für ATP und mATP:



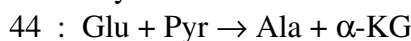
ATP-ADP Antiporter:



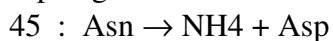
Glutamat Dehydrogenase



Alanin Synthese:



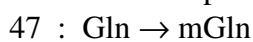
Asparagin Abbau:



Interkonversion von FH<sub>4</sub>:



Glutamin Transporter:



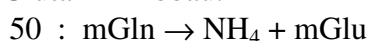
Malat-Shuttle:



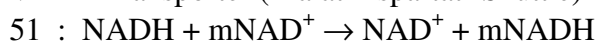
Malat-Citrat Transporter:



Glutamin Abbau.



NADH Transporter (Malat-Aspartat- Shuttle)



Dicarboxylat Transporter:



### 7.3 Photographien



Abbildung 7.1: Fermentationsanlage für den Fed-Batch-Prozeßmodus mit On-line Glutamin-FIA und Zubehör.

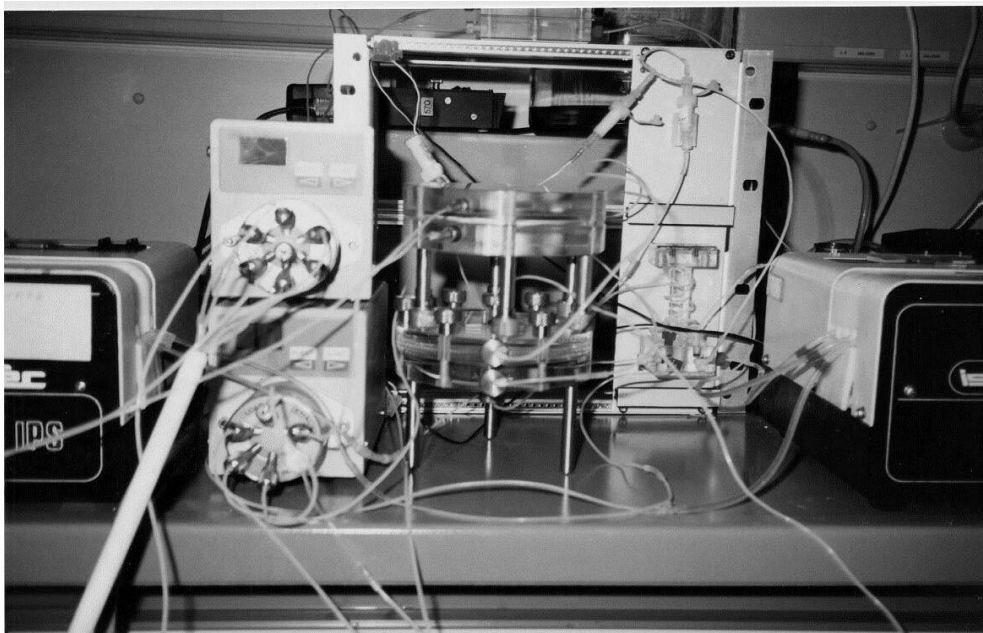


Abbildung 7.2: Aufbau der Glutamin On-line-FIA: Referenzkartuschensystem, Doppelaustauschdiffusionskammer, Selektoren, Injektoren, Pumpen und Durchflußphotometer.

## Lebenslauf

Holger Lübben

24.10.1967	Geburt in Aurich
Juli 1974 - Juni 1978	Grundschule Aurich
Juli 1978 - August 1987	Gymnasium Aurich
August 1987	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1987-Dezember 1988	Grundwehrdienst in ABC Abwehrbatallion Emden
Oktober 1988	Studienbeginn an der Universität Hannover
Februar 1991	Mündliche Vordiplomprüfung
November 1993	Mündliche Diplomprüfung
Dezember 1993 - Juni 1994	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr.h.c.K.Schügerl Thema: Einfluß der Temperatur auf das Wachstums- und Produktionsverhalten rekombinanter CHO Zellen.
September 1994	Beginn der Dissertation als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover