



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einflüsse von Prozess-Parametern auf das Wachstum und die Produktion von verschiedenen CHO-Zelllinien

verfasst von

David Keiler

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, August 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 441

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Genetik - Mikrobiologie (Stzw) UniStG

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Angela Witte

Danksagung

Danke an meine Assistenten Judith, Jasmin und Michael für ihre tatkräftige Unterstützung während meiner praktischen Arbeit.

Willi & Andi für Ihre Hilfe während der Laborarbeit.

Renate Kunert, dass sie mich in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat.

Christian für seine vielen Tipps und Hinweise wann immer es mit CHOs zu tun hatte.

Danke an Dogan & Jann die mir zwischen der Arbeit bei der geistigen Ablenkung geholfen haben.

Ebenso möchte ich Matteo danken, der mich immer wieder angetrieben hat weiter zu schreiben.

Mathias, Sandi für ihre tatkräftige Hilfe bei diversesten Fragestellungen rund um die DA.

Besonderen Dank nochmals extra an alle, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie danken und allen, die ich vergessen habe. Es war keine Absicht. ☺

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	CHO-Zellen als Expressionssysteme	1
1.1.1	CHO DUKX-B11	1
1.1.2	CHO DG44.....	1
1.2	Dihydrofolat-Reduktase	2
1.3	Medium	2
1.4	Zusätze	3
1.5	Immunoglobulin M (IgM)	5
2	Materialien und Methoden.....	8
2.1	Puffer und Lösungen	8
2.2	Analyse der verschiedenen Kulturen	9
2.3	Verwendete Zelllinien	10
2.4	Messung der Antikörperproduktion	12
2.4.1	Vorbereitung der Platten	12
2.4.2	Verdünnungen.....	12
2.4.3	Auftragung und Inkubation	12
2.4.4	Farbreaktion und ELISA Messung.....	12
2.5	Berechnungen	13
2.6	Fermentationssysteme.....	14
2.6.1	Bioreaktor.....	14
2.6.2	Schüttler	15
3	Ergebnisse	16
3.1	Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen von HT Medienzusatz	16
3.1.1	Wachstum und Viabilität.....	16
3.1.2	Nährstoffe und Abfallprodukte	23
3.2	Medium Umstellung der DG44 IgM-Kulturen	27
3.2.1	Wachstum und Viabilität.....	27
3.2.2	Antikörperproduktion	34
3.3	Vergleich von verschiedenen IgM-produzierenden DUKX-B11 und DG44 Kulturen ..	35
3.3.1	Wachstum und Viabilität.....	35
3.3.2	Nährstoffe und Abfallprodukte	40
3.3.3	Antikörperproduktion	43
4	Diskussion.....	46
4.1	HT Versuche	46

4.1.1	Zielsetzung.....	46
4.1.2	Nährstoffverbrauch und Produktion von Abfallprodukten.....	46
4.1.3	Glukose, Laktat.....	46
4.1.4	Glutamin, Ammoniak	47
4.1.5	Zellzahl, Viabilität und Vergleich der Host Linien.....	48
4.1.6	Vergleich der unterschiedlichen HT Konzentrationen	48
4.2	Adaption an D/H Medium	49
4.2.1	Zielsetzung.....	49
4.2.2	Vergleich der DG44 Kulturen.....	50
4.3	IgM-Zelllinien.....	51
4.3.1	Zielsetzung.....	51
4.3.2	Vergleich der IgM-Zelllinien	51
4.3.3	Kontaminationsproblem	52
5	Referenzen	53
6	Anhang	61
6.1	Zusätzliche Grafiken	61
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	66
6.3	Zusammenfassung.....	67
6.4	Summary	67
6.5	Curriculum Vitae.....	68

1 Einleitung

Den passenden Organismus als Versuchsobjekt zu wählen kann mitunter ein schwieriges Unterfangen sein. Aus den verschiedensten Gründen ist jeder Organismus in seinen Wachstumsbedingungen einzigartig, weswegen Versuchsabläufe nicht ohne weiteres auf andere Organismen übertragen werden können. Deswegen ist es für den Experimentator besonders wichtig gleich festzustellen, mit welchem Organismus er seine Fragestellung am genauesten und schnellsten beantworten kann. CHO Zellen erfreuen sich deshalb, wegen ihrer relativ simplen Haltung, immer größerer Beliebtheit.

1.1 CHO-Zellen als Expressionssysteme

Die erste immortalisierte Zelllinie wurde 1957 von Puck aus Hamster Ovarien isoliert. Nach zehnmonatiger Kultivierung wuchs der Stamm unverändert gut (Puck et al. 1958, Tjio & Puck 1958). Ein Umstand, der bald dazu führen sollte, dass Tjio & Puck eine Prolin-Mangel Mutante unter diesen CHO-Linien fanden. Nach Behandlung mit einem Mutagen entstand daraus der CHO-K1 Stamm (Puck & Kao 1967), der die Grundlage vieler heute etablierter CHO-Linien ist.

1.1.1 CHO DUKX-B11

Synonyme für diese Zelllinie sind: DXB11, DUKX, DUKXB11 oder DUK-XB11. Entwickelt wurde dieser Stamm durch sequentielle Inaktivierung der beiden *dhfr*-Allele von Urlaub & Chasin (1980) aus der CHO-K1 (ATCC CCL-61) Zelllinie. Gandor et al. (1995) zeigten jedoch, dass zumindest eines der zwei Allele nicht irreversibel inaktiviert wurde. Das eine Allel entstand aus einem Basenaustausch-Mutagen (Ethyl-Methan-Sulfonat), das zweite resultierte aus Gamma-Bestrahlung. Die Ergebnisse von Sinacore et al. (1996) zeigten, dass es zu einer Wiederherstellung der *dhfr*-Funktion kommen kann. Dies passiert in dem mit Ethyl-Methan-Sulfonat behandelten Allel, vor allem dann, wenn die Zellen unter Stress stehen. Ein mögliches Szenario ist z.B. bei der Adaption an serumfreies Medium (Sinacore et al. 1996).

1.1.2 CHO DG44

Dieser Stamm entstand 1983 im Zuge der Forschung von Urlaub und Kollegen (1983) aus der Methotrexat- resistenten Zelllinie CHO Pro-3 Mtx RIII, welche eine strukturelle Veränderung in der Dihydrofolat-Reduktase aufweist (Flintoff et al. 1976). Um die Selektion durch *dhfr* und MTX zu steigern, sind in DG44 beide Allele durch Gamma-

Bestrahlung vollständig inaktiviert (Urlaub et al. 1983, 1986). DG44 findet gegenüber DUKX-B11 bevorzugt Verwendung, da DUKX-B11 häufiger dazu neigt, eine DHFR Aktivität in serumfreien Medium zu etablieren (Lee et al. 2010).

1.2 Dihydrofolat-Reduktase

Dihydrofolat-Reduktase dient einzig dem Zweck, Folsäure (Folat) in eine biologisch aktive Form zu bringen (McKee 2002). In zwei Schritten wird aus Folat, unter NADPH^+ Verbrauch durch DHFR, Tetrahydrofolat (THF) hergestellt. THF dient als C_1 -Überträger auf Stickstoffmoleküle an die N_5 - und N_{10} -Atome. Es werden Formylgruppen für die Purinsynthese übertragen, sowie Methylengruppen für die dTMP-Herstellung und Methylgruppen für die Methionin-Bildung. Während dieser Übertragung entsteht Dihydrofolat, welches wiederum in THF umgebaut wird. THF wird nicht nur verarbeitet sondern ist zusätzlich ein Cofaktor für die Pyrimidin- und Purinsynthese (Dettmer et al. 2005).

1.3 Medium

Die Wahl des richtigen Mediums ist eine der ersten Entscheidungen die getroffen werden müssen. Zur Auswahl stehen verschiedenste Medien unterschiedlichster Preisklassen, mit und ohne Serumzugabe. Zur Kostenoptimierung und um mögliche Infektionsquellen zu vermeiden, wurde serumfrei gearbeitet. Die Universität für Bodenkultur legt, nach Möglichkeit, besonderen Wert auf Arbeiten ohne jegliche tierische Zusätze.

Das ursprüngliche Minimum Essential Media (MEM) wurde 1955 von Harry Eagle aus dem ersten Basalmedium erstellt, das ebenso von Eagle entwickelt wurde (Eagle 1955). DMEM ist eine Adaptierung dieses Minimalmediums von Dulbecco. Es enthält, im Gegensatz zu dem Basalmedium, eine viermal so hohe Konzentration an Aminosäuren und Vitaminen. Des Weiteren beinhaltet es zusätzlich nicht-essentielle Aminosäuren (Schmitz 2009).

HAM's F12 wurde 1965 als serumfreies Medium von Richard Ham entwickelt. Es enthält eine erhöhte Konzentration an Aminosäuren und Zinksulfat. Zink ist ein Spurenelement, das von großer Bedeutung in der Struktur und im Erhalt von Zellmembranen ist (Bettger & O'Dell 1981). Außerdem schützt es die CHO-Zelle vor der toxischen Wirkung von Cadmium (Ochi et al. 1988).

Zusätzlich beinhaltet HAM's F12 Linolsäure und Putrescin, eine Omega-6-Fettsäure und ein biogenes Amin (Schmitz 2009). Beide sind wichtig für das Zellwachstum und wirken sich positiv auf die Antikörperproduktion in CHO-Zellen aus (Kim et al. 1998).

1.4 Zusätze

L-Glutamin

Diese Aminosäure (AS) ist zwar nicht essentiell, muss aber im Gegensatz zu allen anderen in zehn- bis einhundertfacher Konzentration vorhanden sein (Newsholme et al. 2013). Wie von der Arbeitsgruppe weiter ausgeführt, ist diese AS besonders wichtig für das Zellwachstum und kann nicht durch Glutaminsäure oder Glucose ersetzt werden. Bei 4°C ist sie nur ein Monat stabil und wird deshalb erst kurz vor der Verwendung des Mediums zugegeben. Glutamin sollte nicht länger als eine Woche verwendet werden (Helgason & Miller 2005).

Pluronic F-68

Pluronic F-68 ist ein nichtionisches Detergenz, welches aus einem Copolymer von Ethylenoxid und Propylenoxid besteht. Es schützt die Zelle nicht nur vor Scherkräften durch das Stärken der Membran (Zhang et al. 1992), ebenso verhindert es das Zerreißen durch Gasblasen und den Transport der Zellen durch Luftblasen in die Schaumregion (Jordan et al. 2004). Hydrodynamische Scherkräfte haben auch einen starken hemmenden Effekt auf die Produktion von rekombinanten Proteinen in CHO-Zellen. Pluronic verhindert dies nicht nur, sondern kann die Produktion der Zellen auch wiederherstellen. (Keane et al. 2003)

Soja Pepton

Seit der Etablierung von serumfreiem Medium, ist Pepton ein essentieller Medienzusatz. Es besteht zu 60% ($\pm$ 5%) aus Peptiden/AS, zu 20% ($\pm$ 5%) Kohlenhydraten, zu 10% Salzen und zu geringen Anteilen aus Phospholipiden, Polyphenolen und Spurenelementen (Michiels et al. 2011). Hydrolysierte Proteine sind von vielen Quellen kommerziell erhältlich. Jedoch ist das Kontaminationsrisiko mit Prionen, Viren oder Mykoplasmen pflanzlichen Ursprungs am geringsten (Grillberger et al. 2009). Chun et al. (2007) zeigten, dass von allen verfügbaren Hydrolysaten besonders CHO-Zelllinien durch Soja Pepton am positivsten beeinflusst werden.

Serumersatz, Proteinfrei-Zusatz

Dies ist eine Sammlung von weiteren Medienzusätzen, um die Funktion des Serums so gut als möglich zu ersetzen. Seine Bestandteile sollten um Infektionsquellen zu vermeiden, ohne Proteine sein. In den Experimenten wurde ein PF-Zusatz von Polymun Scientific GmbH (Österreich) verwendet.

Meist beinhalten serumfreie Zusätze Eisen. In der Form von Fe(III)Citrat oder $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ wirkt es positiv auf das Zellwachstum, fördert aber auch die Antikörperproduktion in CHO (Zhang et al. 2006).

Ein weiterer häufig verwendeter Bestandteil für serumfreie Zusätze ist Selen. Dieses essentielle Spurenelement unterstützt das Zellwachstum und die Entwicklung, indem es vor oxidativem Stress schützt (Yoon et al. 2002). Versuche der Arbeitsgruppe Zhang et al. (2006) zeigten des Weiteren, dass Selen Komplexe mit Eisen bildet und dieses so effektiv in die Zelle transportiert.

Neben essentiellen Spurenelementen, wie Eisen und Selen, ist Ascorbinsäure ein weiterer möglicher Bestandteil. Ascorbinsäure (=Vitamin C) ist hauptsächlich für den Schutz vor oxidativem Stress verantwortlich. Diese reguliert aber auch Vitamin E und Gluthathion (zwei weitere Antioxidantien). Bei zu hoher Konzentration kann es auch pro-oxidativ für CHO-Zellen wirken (Bijur et al. 1997).

Ethanolamin ist ein weiterer Bestandteil als Serumersatz. Es wirkt als Wachstumsfaktor und kommt meist im serumfreien Medium nur zu 10% gegenüber Medien mit Serum vor (Shiao & Vance 1995).

Neben Ethanolamin spielen Insulin und Transferrin eine ebenso wichtige Rolle als Wachstumsfaktoren (Glassy et al. 1988, Yandell et al. 2004). Transferrin ist neben Selen zusätzlich für die Eisenbindung und den Transport in die Zelle von Bedeutung (Kim et al. 1998).

Zusätze wie Insulin, Transferrin, Putrescin, Linolsäure und Ethanolamin können in PF-Zusätzen vertreten sein, ganz fehlen oder aber bereits dem Medium zugesetzt sein.

Methotrexat

Methotrexat ist ein Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase (Myers et al. 1975). Seine Struktur ähnelt der von Folsäure (Vitamin B₉), Abb. 1. McBurney & Whitmore (1975) zeigten, dass MTX die Bildung von Dihydrofolat reversibel blockiert. Es hemmt somit die Produktion von Nukleinsäuren (Purine, Thymidilat), aber auch Aminosäuren (Serin, Methionin), wie Bertino (1984) bestätigte. Methotrexat steht außerdem im Verdacht, kanzerogen zu sein (HSDB 2012). Verwendung findet es deshalb nur zwischen den

Versuchen, um möglichst viele Kopien des integrierten Antikörpers mit *dhfr*-Sequenz zu erhalten. Vor allem bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen wird darauf verzichtet (Cacciatore et al. 2010).

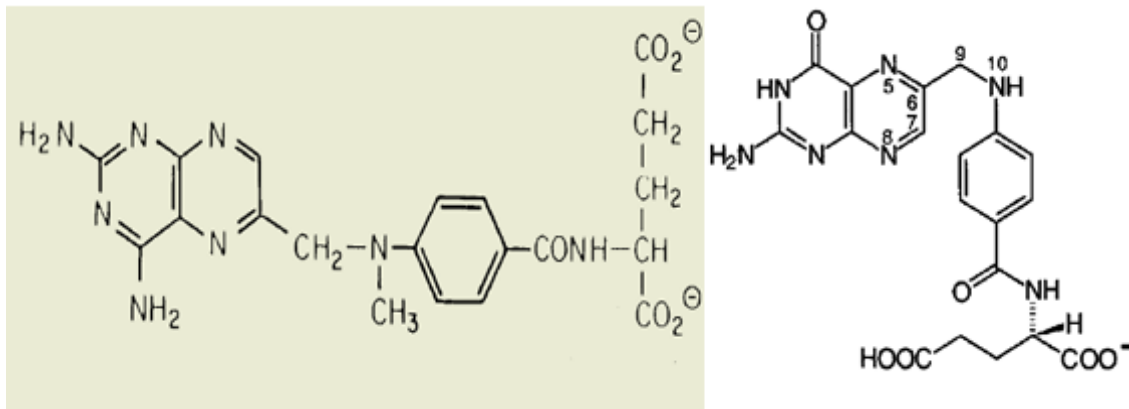


Abbildung 1: links: MTX Strukturformel, © Josting et al. 1998; rechts: Folsäure Strukturformel © Smith et al. 2000

Hypoxanthin &Thymidin (HT)

HT ist ein essentieller Zusatz für alle Host-Zelllinien die auf *dhfr*-Selektion basieren. Da diese nicht mit dem *dhfr*-Gen enthaltenden Plasmiden transformiert sind, ist es aus mehreren Gründen wichtig, diese zwei Substanzen zu erhalten.

Thymidin ist das Deoxyribonukleotid von Thymin (Latscha et al. 2004). Es ist für den Umsatz von Nukleinsäuren von größter Wichtigkeit. Hypoxanthin gehört zu den Purinen. Es ist ein wichtiger Bestandteil in der Purin Nukleotid Biosynthese. Ohne Hypoxanthin gibt es kein Adenosin und vice versa (McKee 2002).

Jedoch wird durch das Fehlen von *dhfr* die komplette Purin- und Pyrimidin-Biosynthese verhindert (Dettmer et al. 2005). Siehe dazu Kapitel 1.2

1.5 Immunoglobulin M (IgM)

Die Hauptaufgabe von IgM ist die Aktivierung der Komplementreaktion. Es ist eines der ersten Moleküle, welches in der Immunantwort aktiv wird. IgM ist in seiner löslichen Form ein Pentamer oder Hexamer. Die einzelnen Monomere binden durch die schwere Kette μ an die Joining-Kette. An dieser hängen zwei leichte Ketten, die aus konstanten und variablen Regionen bestehen (C_L = konstant, C_V = Variabel). Des Weiteren werden die Ketten durch Disulfidbrücken gestützt, (Abb. 2; Schütt & Bröcker 2011). Durch seine komplexe Größe von 970 kDa bleibt es hauptsächlich in der Blutbahn.

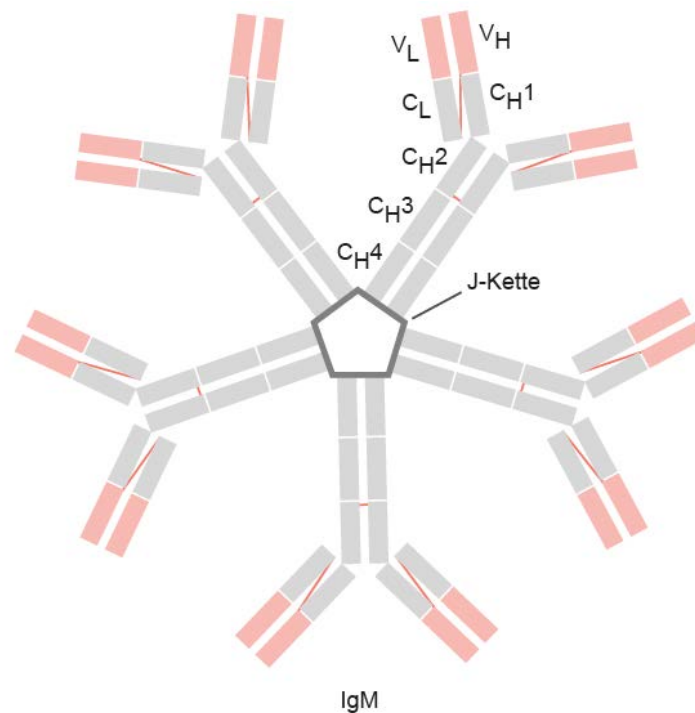


Abbildung 2: Aufbau eines Immunglobulins M, die Disulfidbrücken sind als rote Linien eingetragen © Schütt & Bröcker, Grundwissen Immunologie, 2011

Die Produktion von humanen rekombinanten Antikörpern erfordert die korrekte posttranskriptionelle Faltung der Proteine. Bakterielle und Hefe Systeme können dies in den meisten Fällen, im Gegensatz zu tierischen Zellen, nicht oder unzureichend (Doyle 1998). Die meisten tierischen Zelllinien, die dazu kultiviert werden könnten, sind aber meist wesentlich anspruchsvoller an ihre Umgebung. Viele benötigen Serum zur Kultivierung und andere teure Maßnahmen (Glacken et al. 1983). Besonders bedeutend sind deshalb, seit ihre Fähigkeit entdeckt wurde, humane Proteine korrekt zu falten (Lee et al. 1989), CHO-Zelllinien.

Antikörper Variante 2G12

Der monoklonale Antikörper 2G12 wurde erstmals 1990 aus einem asymptomatischen HIV-1 Patienten isoliert (Kunert 2012). Er bindet an das Glykoprotein 120 (gp12), genauer an Kohlenhydrat-Liganden im Glykan-Epitop (Pantophlet & Burton 2006). Kristallographie-Daten zeigen des Weiteren, dass 2G12 fast keine Selbstbindung aufweist. 2G12 wirkt auf HIV-1 durch direkte zellfreie Neutralisierung, Komplementierung und antikörperverursachte Zelltoxizität (Kunert 2012).

Antikörper Variante HB617

Der IgM-Antikörper HB617 wurde ursprünglich durch die mit dem Epstein Barr Virus transformierte humane B-Zelllinie 617 exprimiert (Jursik et al. 2009; Lattenmayer et al. 2006). Er teilt sich mit MAb 4E10 IgM die gleichen konstanten Regionen, liegt jedoch fast ausschließlich in der pentamerischen Form vor (Kunert et al. 2004). Die schweren und leichten Ketten sind in der variablen Region verändert (Kapitel 2.3). 4E10 ist ein lange bekanntes Epitop des HIV-1 envelope spike (Burton et al. 2004).

2 Materialien und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Liste der verwendeten Medien, Lösungen, Puffer und deren chemische Bestandteile

Lysepuffer für Coulter Zellzählung	0,1 M Zitronensäure
	2 % Triton X-100
Färbelösung für Hämozytometer	0,5 % Trypan Blau
Pluronic	10 % Pluronic F68
	90 % HQ H ₂ O
Pep	12,5 % Soja Pepton
	87,5 % HQ H ₂ O
100x HT	1,36 mg/L Hypoxanthin
	0,39 mg/L Thymidin
Coating Puffer	0,1 M NaHCO ₃
	pH 9,6-9,8
PBS (10x)	11,5 g Na ₂ PO ₄ x 2H ₂ O
	2 g KH ₂ PO ₄
	2 g KCL
	80 g NaCl
	pH 7,2-7,4
Waschpuffer (5 L)	0,1 % Tween20
	0,5 L 10x PBS
	4,5 L HQ H ₂ O
Dilution-Puffer (200 ml)	1 % BSA
	200 ml Waschpuffer
Färbepuffer (1 L)	7,3 g Zitronensäure x H ₂ O
	11,6 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	pH 4,8-5
Färbelösung für ELISA (10 ml)	100 µl OPD
	6 µl H ₂ O ₂
	10 ml Färbepuffer
DH (1 L) + Zusätze	500 ml DMEM Exx-009 (PAA)
	500 ml HAM's F12 Exx-016 (PAA)
	16 ml L-Glutamin
	20 ml 50x Soja Pepton
	10 ml 100x Pluronic F68
	10 ml 100x Proteinfrei Zusatz
Proteinfrei Zusatz	Formel geschützt
250 mM Glutamin (1 L)	36,5 g L-Glutamin
	HQ Wasser auf 1 L

2.2 Analyse der verschiedenen Kulturen

Die Probenahme der jeweiligen Kultur erfolgt einmal täglich. Von jeder gezogenen Probe werden zweimal 1 ml Überstand bei -20 °C eingefroren. Die Messung der Metabolite und Nährstoffe erfolgt ebenso zu diesem Zeitpunkt. Ein Bio Profiler 100+ (Nova Biomedical, USA) misst die Glucose-, Glutamin-, Laktat-, Ammoniak-Werte sowie den pH-Wert. Die Antikörper werden jeweils am Ende eines Versuchs mittels ELISA analysiert (Kapitel 2.4).

Die Probe muss sieben Minuten bei 1300 rpm abzentrifugiert werden. Der Überstand ist für weitere Analysen aufzuheben. Zu dem aufgeschüttelten Zellpellet gibt man 1 ml Lysepuffer (Kapitel 2.1) und inkubiert für eine Stunde. Die Messung der Zellzahl erfolgte mit einem Coulter Counter Z2 (Beckman USA). In einem elektrischen Feld wird der Widerstand zwischen zwei Elektroden gemessen. Eine liegt innerhalb eines Röhrchens, die andere außerhalb. Über eine feine Kapillare, angepasst an die Größe der zu messenden Partikel, kann die Probeflüssigkeit in das Röhrchen gelangen. Durch einen Pumpvorgang wird die Probe durch die Kapillare in das Röhrchen gesaugt. Dabei ändert sich der Widerstand proportional zur Größe und Zahl der Partikel, die durch das elektrische Feld wandern. Man erhält nach wenigen Minuten eine genaue Zellkernzahl (Abb. 3).

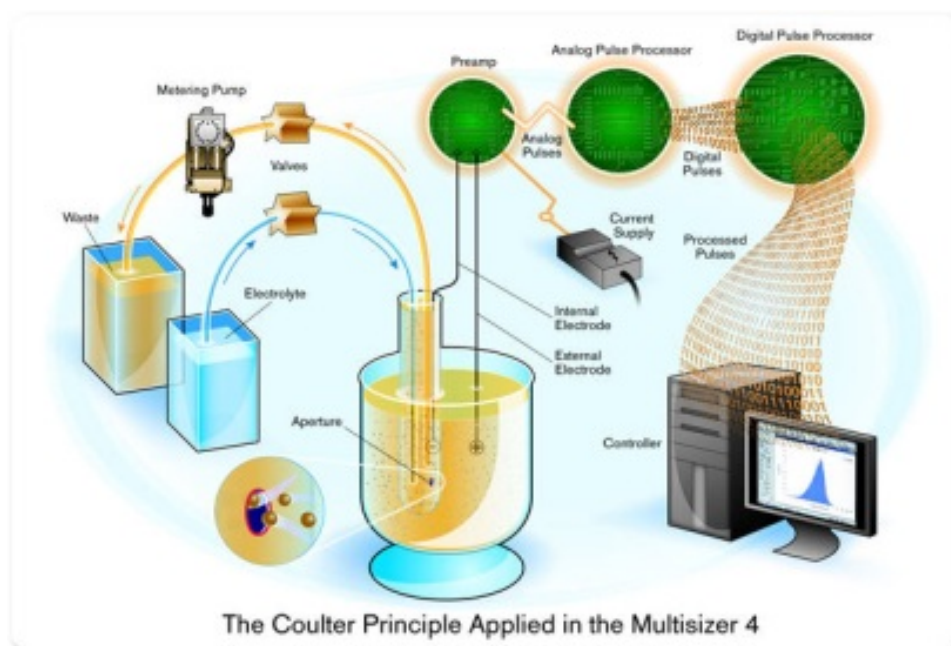


Abbildung 3 Coulter Funktionsweise © 2000-2013 Beckman Coulter, Inc.

Zur Kontrolle der Zellzahlen und Bestimmung der Viabilität erfolgt eine Trypanblau Färbung mit 500 µl der Probe und 100 µl Färbelösung (Kapitel 2.1)

2.3 Verwendete Zelllinien

DUKX-B11 (ATCC CRL-9096)

Dieser Stamm ist heterozygot für das *dhfr*-Gen. Ein Allel ist mutiert, das andere ist komplett inaktiviert (Urlaub & Chasin 1980).

Der verwendete Stamm wurde an der Universität für Bodenkultur an DMEM/HAM's F12 Medium + spezifische Zusätze (Tab. 1) adaptiert. Die Mutation bedingt, dass dieser nicht ohne HT Zugabe wächst.

DG44 (Cat. No. A11000-01, Gibco, Invitrogen)

Beide *dhfr*-Allele sind komplett inaktiviert (Urlaub et al. 1983). An der Universität für Bodenkultur adaptiert an serumfreies Medium DMEM/ HAM's F12 und spezifische Zusätze (Tab. 1). Zugabe von HT ist für das Wachstum erforderlich.

Rekombinante Zelllinien

Diese Zelllinien entstammen einerseits von DUKX-B11 Stamm, andererseits dem DG44 Stamm. Die Klone unterscheiden sich in den variablen Regionen der leichten, als auch der schweren Ketten des exprimierten Antikörpers. Die DG44 Stämme wurden bis zur Adaption in ProCHO5 (Lonza Schweiz) + 4 mM Gln + 0,096 µM MTX kultiviert. Die DUKX-B11 Stämme sind wie die Host-Zelllinien in D/H (+ Zusätze) gezüchtet, aber ohne HT Zugabe. Dafür ebenso mit 0,096 µM MTX.

DG44 2G12 Original

pIRES_DHFR_SV40_2G12 heavy chain

pIRES_CMV_2G12_LC_JC light chain

Subklon: 9D8/4D10

Transfektionsdatum: 13.01.2011

Transformiert und zur Verfügung gestellt von Veronika Chromikova.

DG44 HB617

pIRES_DHFR_SV40_HB617 heavy chain

pIRES_CMV_HB617_LC_JC light chain

Subklon: 3E11/5G7

Transfektionsdatum: 27.01.2011

Transformiert und zur Verfügung gestellt von Veronika Chromikova.

DUKX-B11 2G12 Original

2G12 LC-IRES-JC light chain

2G12 HC-IRES-JC heavy chain

Subklon: VI-5B7 2G12 IGM

Transfektionsdatum: 13.10.2008

Transformiert von Helga Böhm-Hofstätter. Zur Verfügung gestellt von Willibald Steinfellner.

DUKX-B11 2G12 Germline

2G12-vH_GL in pIRES_Dhfr (Genart 0900161)

2G12_GL-LC und J-chain in pIRES-A,B (Genart 0900666)

Subklon: 2H7

Transfektionsdatum: 21.09.2009

Transformiert und zur Verfügung gestellt von Willibald Steinfellner.

DUKX-B11 HB617

pHB617IgM HC/DHFR

pHB617IgM LC/JC/DHFR

Subklon: 8B10/6B3/8D11/SF

Transfektionsdatum: 03.01.2000

Transformiert und zur Verfügung gestellt von Silke Seidinger.

2.4 Messung der Antikörperproduktion

Zur Bestimmung der IgM-Produktion wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt.

2.4.1 Vorbereitung der Platten

100 µl des spezifischen Antikörper (goatanti human immunoglobuline/ μ chain, 1 mg/ml, Sigma Il636) wurde in Coating Puffer (Tab. 1) 1:1000 verdünnt und in jedes well der Immunosorbent-Platten (Maxisorb 96 well, NUNC) pipettiert. Die Platten inkubieren bei +4 °C über Nacht. Am nächsten Tag werden die Platten mit einem Tecan 96 PW mit Waschpuffer (Tab. 1) gewaschen.

2.4.2 Verdünnungen

Alle Proben verdünnt man mit Dilution Puffer (Tab. 1), nach erwarteten Konzentrationen. Anschließend erfolgt das Auftragen zu jeweils 120 µl in nicht sterile 96-well Platten. Das Auftragungsschema sieht wie folgt aus: In erster Reihe Dilution Puffer, in Reihe zwei und drei Standards (human Serum IgM, 1 mg/ml, Sigma A7164, Stammlösung 200 ng/ml) und Reihe vier bis elf die Proben. Es erfolgte eine 1:2 Verdünnung auf der Platte.

2.4.3 Auftragung und Inkubation

Die Proben trägt man zu 50 µl pro well auf die Immunosorbent Platte auf. Die Proben inkubieren eine Stunde auf einem Schüttler bei 300 rpm. Es erfolgt ein Waschschrift mit Waschpuffer. Anschließend gibt man den zweiten Antikörper zu (goat anti human kappa light chain- Peroxidase, 1mg/ml, Sigma A7164) und inkubiert eine Stunde.

2.4.4 Farbreaktion und ELISA Messung

Pro well erfolgt die Zugabe von 100µl Färbelösung (Tab. 1). Die Farbreaktion ist mit 2,5N H₂SO₄ zu stoppen sobald ein Farbumschlag von gelb auf orange passiert. Abschließend werden die Platten mit einem Tecan Infinite M1000 Pro (Anregung 492 nm, Emission 620 nm) und der „Magellan“-Software analysiert.

2.5 Berechnungen

Die Auszählung der Zellen im Hämozytometer liefert eine Zahl, die sich aus der Summe der vier Zählquadrate der Neubauerkammer zusammensetzt. Jedes dieser Quadrate fasst ein Volumen von 0,1 µl. Durch die nachstehende Formel kann die Zellzahl pro ml berechnet werden:

$$ZZ = \frac{Z_K \times \left(\frac{1000}{0,4}\right)}{Vd}$$

Z_K = Summe der 4 Quadrate

Vd = Verdünnung der Zellsuspension zu 5/6

Aus der Zählung des Coulter Counters kann die effektive Zellzahl pro ml berechnet werden. In die Berechnung fließt die Menge der Probe und der isotonischen Lösung von 9 ml ein:

$$ZC = \frac{(ZC_1 + ZC_2) \times (a+b)}{a \times c}$$

ZC_1, ZC_2 = Zellkernzahl 1. Messung, 2. Messung

a = Probenahme Volumen in ml

b = Volumen isotonische Lösung in ml

c = Gesamtgewicht der Probe in g

Die spezifische Wachstumsrate μ leitet sich aus der am jeweiligen Tag gemessenen viablen Zellzahl ab. Während des Batch ändert sich diese Zahl fortlaufend und ist am aussagekräftigsten in der exponentiellen Phase, wie schon von Dutton et al. (1998) gezeigt. Die spezifische Wachstumsrate wird nach folgender Formel berechnet:

$$\mu = \frac{\ln w_2 - \ln w_1}{t_2 - t_1}$$

w_1 = Viable Zellzahl Tag x

w_2 = Viable Zellzahl Tag $x+1$

t_1 = Tag x in h/24

t_2 = Tag $x+1$ in h/24

Die viablen kumulierten Zelltage (VCCD) sind eine Zusammensetzung aus den viablen Zellzahlen und μ über ein Zeitintervall von zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Formel dazu lautet:

$$VCCD = \left(\frac{VCC_2 - VCC_1}{\mu_2} \right) + \left(\frac{VCC_3 - VCC_2}{\mu_3} \right)$$

VCC= viable Zellzahl eines bestimmten Tages
 μ = spezifische Wachstumsrate über zwei folgende Tage

Die Tagesproduktion an IgM pro Zelle wurde über die exponentielle Phase berechnet. Dazu wird die Anfangs- und Endkonzentration von drei Tagen in $\mu\text{g/ml}$ mit den VCCD der jeweiligen Tage dividiert. Um Werte in pg/c/d zu erhalten wird mit 10^6 multipliziert:

$$qp = \frac{(C3 - C1) \cdot 10^6}{VCCD3 - VCCD1}$$

C= Konzentration des jeweiligen Tages in $\mu\text{g/ml}$
VCCD= viable kumulierte Zellzahl des jeweiligen Tages

2.6 Fermentationssysteme

2.6.1 Bioreaktor

Die Fermentation lief in einem Bioreaktor System von Dasgip (DS0700TPSS, Dasgip AG, Jülich, Deutschland) mit der Software „Dasgip Control 4.0“. Die Temperatur wurde mit einer TP100 Sonde kontrolliert und auf konstanten 37 °C gehalten. Die Temperatur in den vier Reaktoren wurde durch einen Wassermantel in einer doppelten Ummantelung reguliert. Die Sauerstoffmessung erfolgte durch eine Broadley James Oxyprobe Sonde und wurde mit Druckluft und N_2 bei 30% Luftsättigung gehalten. Der pH=7 wurde mit einer Mettler Toledo Sonde gemessen und mit 0,5M Natronlauge bzw. CO_2 automatisch durch die Steueranlage reguliert. Die Glasgefäße fassen 300 ml - 800 ml Probevolumen. Die Kulturen werden durch gewinkelte Rotorblätter bei 80 rpm gerührt. Die Kontrolleinheiten waren TC4/SC4 (Temperatur/Rührmotor), MP8 (Pumpen), PH4 (pH-Werte), MX4/4 (Druckluft/ N_2 Mischung) und OD4 (optische Dichte).

2.6.2 Schüttler

Die Schüttelkulturversuche erfolgten in einem Climo Shaker ISF1-X Schüttelinkubator (SMX1503, Kühner AG, Schweiz). Die Temperatur wurde durch eine Pt-100 Sonde gemessen und bei konstanten 37 °C gehalten. Die Messung der Luftfeuchtigkeit erfolgte kapazitiv und wird auf 90% r.F. reguliert. Der CO₂ Gehalt wurde auf 7% eingestellt und mittels einer integrierten Infrarot Sonde überwacht/ automatisch reguliert. Die verwendeten Plastikkolben (Corning Inc., USA) fassen 50 ml – 100 ml Probevolumen. Die Kulturen werden durch die Schütteleinheit bei 140 rpm geschwenkt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen von HT Medienzusatz

Es erfolgten die Auswertungen der Wachstumsrate, Viabilität sowie jene der Produktion und des Verbrauches von Metaboliten. Verglichen wurden die zwei Stämme DUKX-B11 und DG44 ohne Plasmide (Kapitel 1.1.1, 1.1.2). Insgesamt sind es vier HT Versuche, zwei fanden im Schüttler (S1, S2) statt, die anderen im Fermentor (F24, F25, F26). Eine Variation in der Konzentration von HT (einfache Menge vs. fünffache Menge), sollte Unterschiede aufzeigen.

3.1.1 Wachstum und Viabilität

In den vier Hypoxanthin-Thymidin -Versuchen wuchsen die zwei Stämme DUKX-B11 und DG44 in D/H 1:1 Medium + Zusätze (1.4) mit unterschiedlichen Konzentrationen von HT. Ebenso variierten die Wachstumsbedingungen zwischen den zwei Stämmen in Schüttelkultur und in dem Fermentor (Kapitel 2.6.1, 2.6.2). Alle Kulturen wurden aus dem Schüttler mit einer Zellzahl von $3 \cdot 10^5$ Zellen pro ml inokuliert. Sobald die Viabilität einer Kultur unter 80% fiel, wurde nur noch an einem weiteren Tag Probe gezogen und anschließend der Batch beendet. In den vier HT Versuchen nahmen diese acht bis zehn Tage in Anspruch.

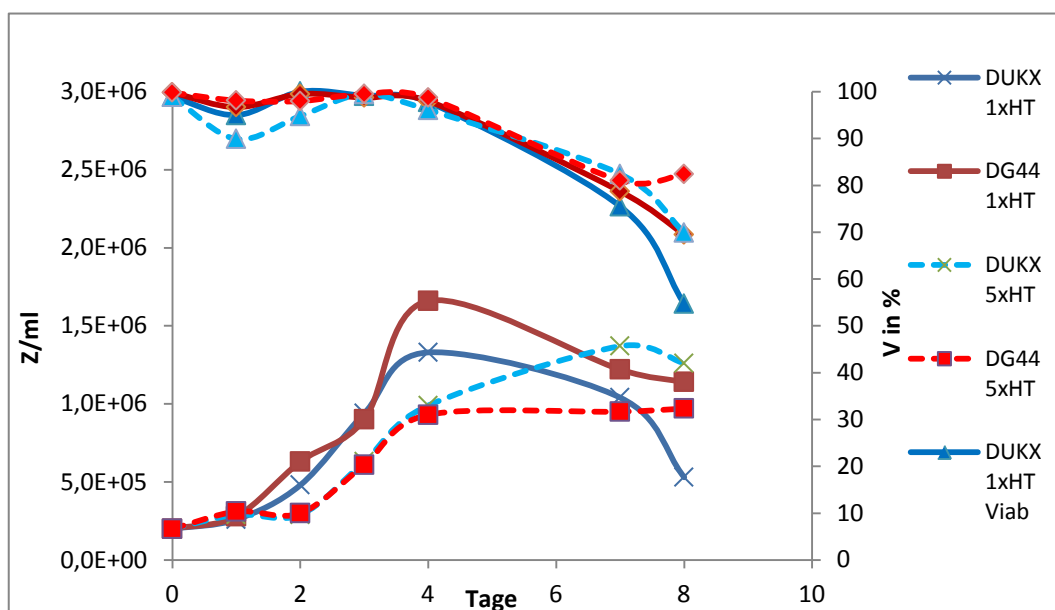


Abbildung 4: Wachstum und Viabilität von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch S1)

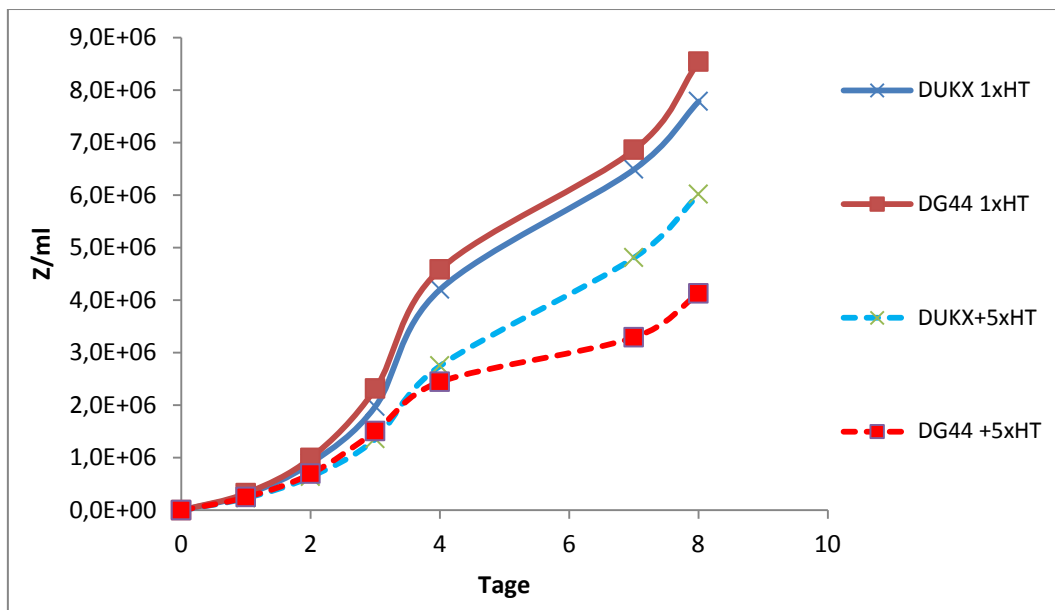


Abbildung 5: Viable kumulierte Zellzahl von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch S1)

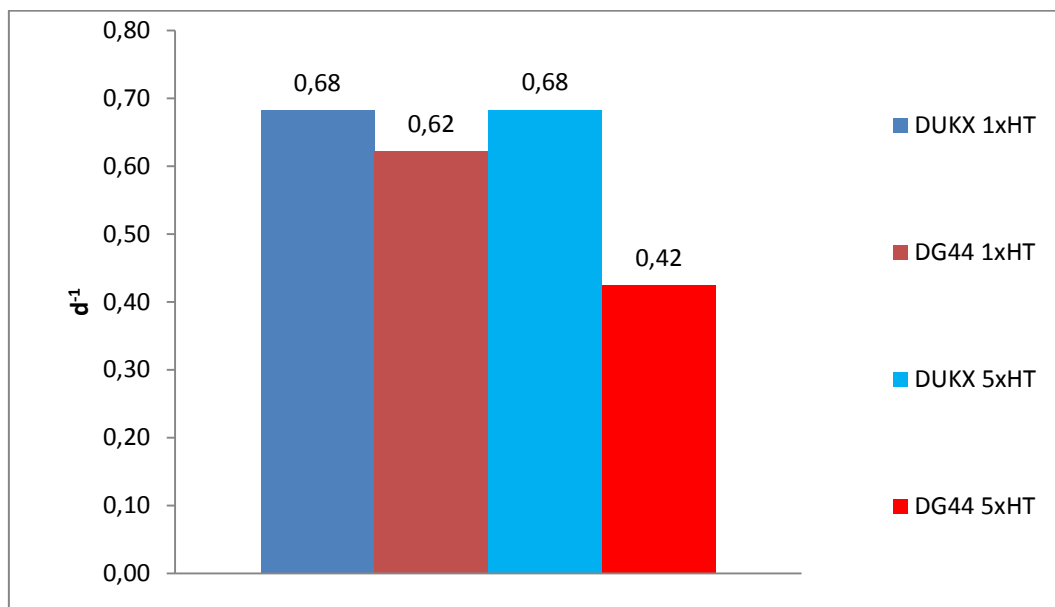


Abbildung 6: Wachstumsrate von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch S1)

Die Kulturen erreichen bis auf DUKX-B11 5xHT die maximale Zellzahl im ersten Batch nach vier Tagen, DUKX-B11 5xHT erreicht diese später. Da an Tag fünf und sechs nicht gemessen werden konnte, fehlen hier die Werte, die in der stationären Phase liegen. Ab dem vierten Tag nimmt bereits die Viabilität aller Kulturen ab. Am Ende des

Batches nach acht Tagen ist die Viabilität für DUKX-B11 auf 55%, DG44 5xHT auf 82%, DG44 und DUKX-B11 5xHT auf 70% gesunken. Die kumulierten viablen Zelltage zeigten insgesamt ein besseres Wachstum der zwei Stämme mit normaler HT Konzentration im Gegensatz zu den Kulturen mit fünffacher Konzentration. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Phase zeigte ebenfalls einen auffallend niedrigeren Wert für die DG44- und die DUKX-B11 Kultur in 5xHT Medium.

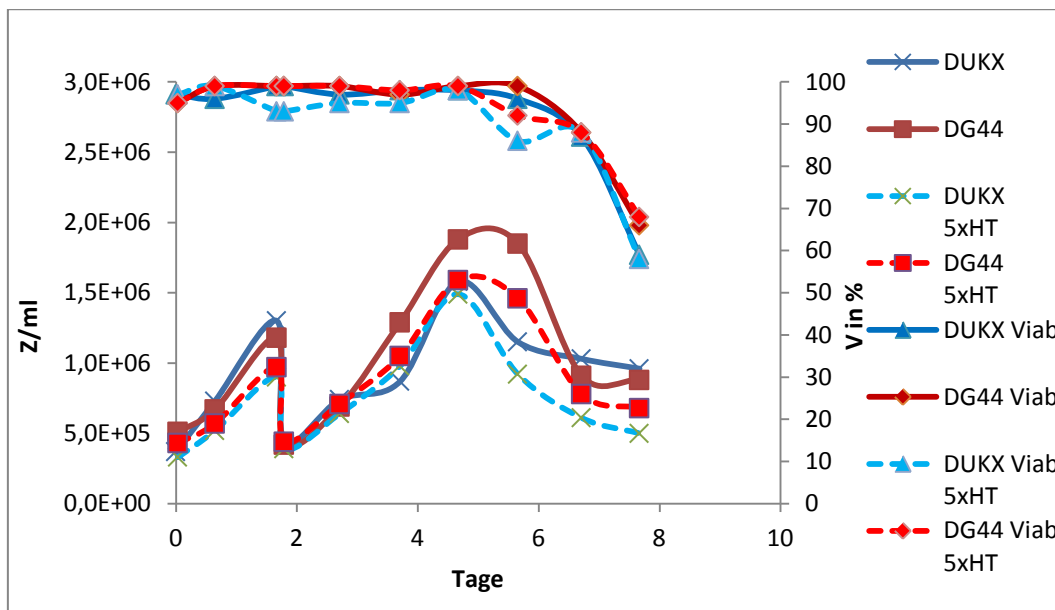


Abbildung 7: Wachstum und Viabilität von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch S2)

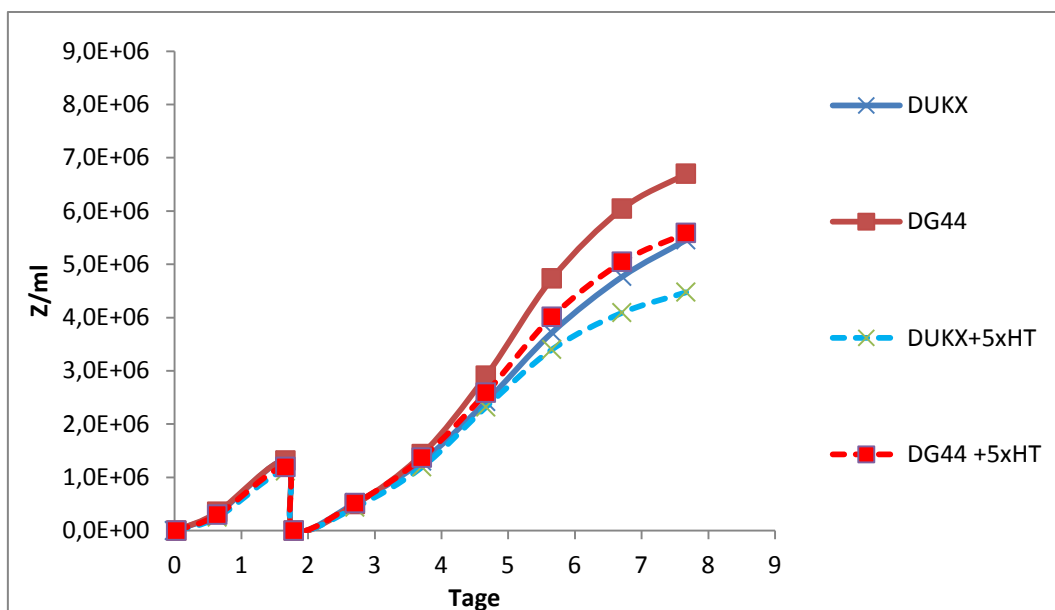


Abbildung 8: Viable kumulierte Zellzahl von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch S2)

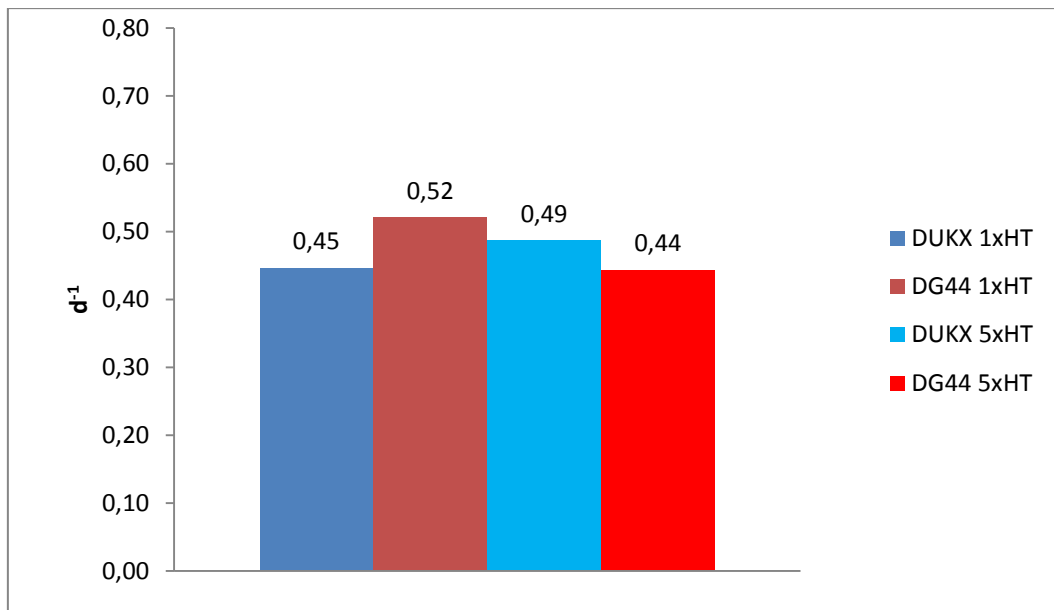


Abbildung 9: Wachstumsrate von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch S2)

Im zweiten Versuch erreichten alle Kulturen nach drei Tagen, ausschließlich der Adaptionphase, die maximal gemessene Zellzahl. Nach insgesamt sechs Tagen fiel die Viabilität bei allen Kulturen ab. Zu diesem Zeitpunkt nahm auch die Zellzahl kontinuierlich ab. Das VCCD-Diagramm zeigt das leicht schlechtere Wachstum der Kulturen mit 5xHT Konzentration gegenüber der Kulturen mit normaler HT Menge. Die durchschnittlichen μ -Werte sind in diesem Batch sehr ähnlich. Sie variieren leicht zwischen $0,52 d^{-1}$ für DG44 und $0,44 d^{-1}$ DG44 5xHT sowie $0,45 d^{-1}$ für DUKX-B11 und $0,49 d^{-1}$ DUKX-B11 5xHT (Abb.9).

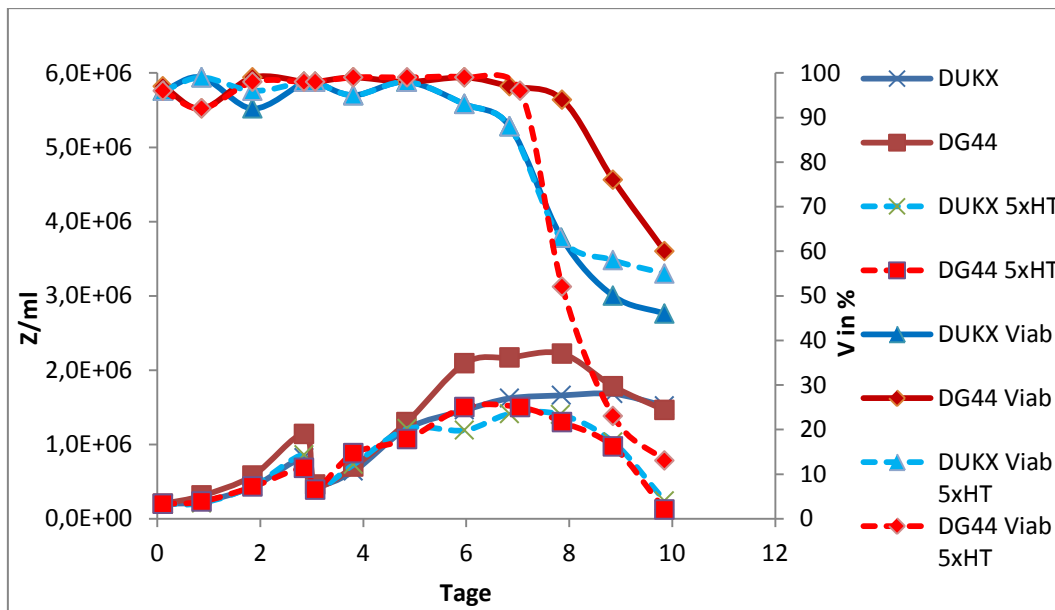


Abbildung 10: Wachstum und Viabilität von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch F24)

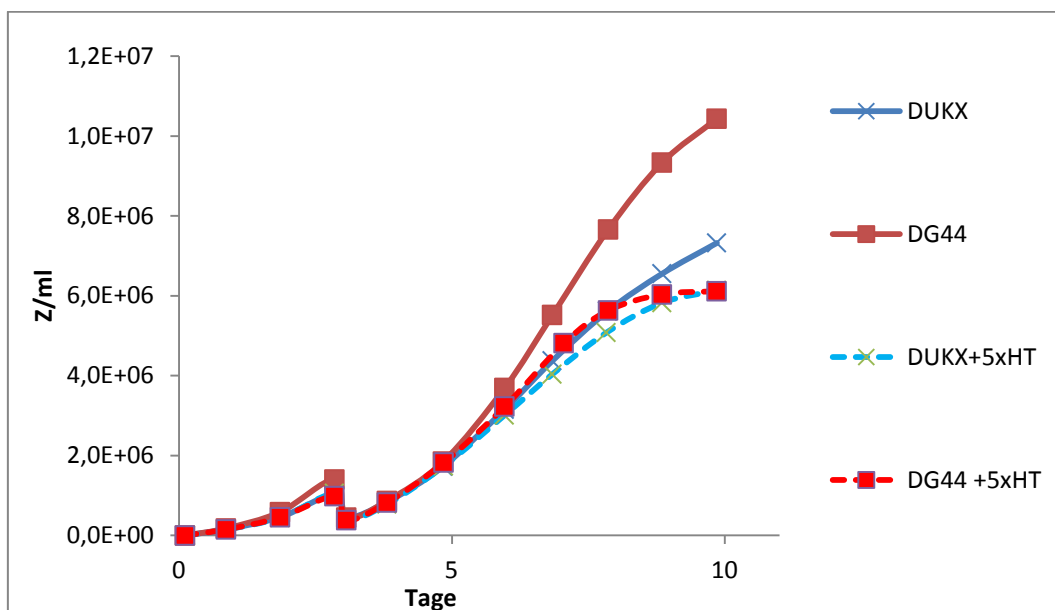


Abbildung 11: Viable kumulierte Zellzahl von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch F24)

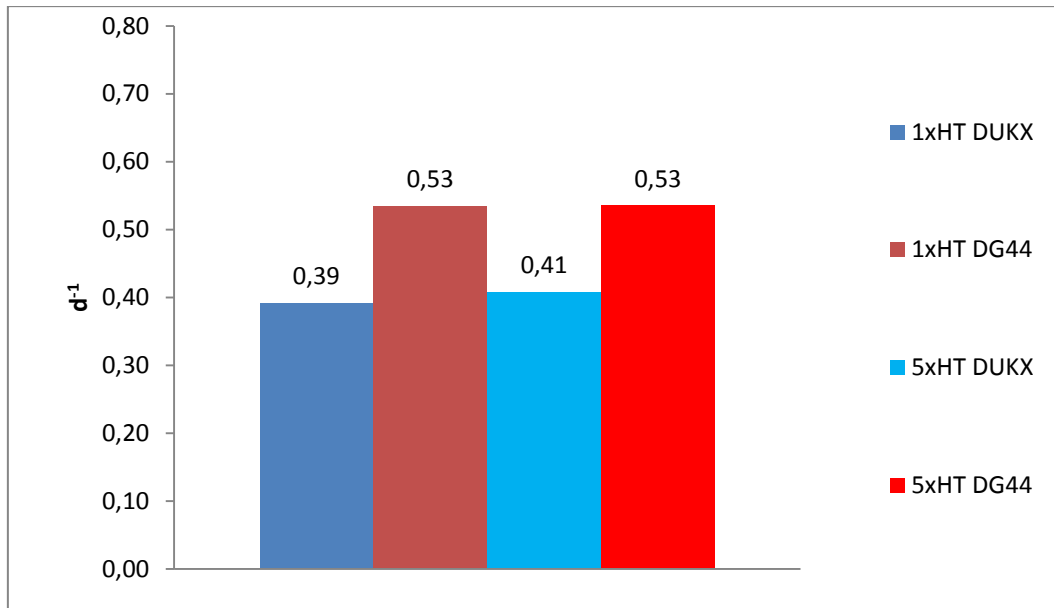


Abbildung 12: Wachstumsrate von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch F24)

Die Ergebnisse des dritten Batch sind denen der vorausgegangenen Batches ähnlich. Das Wachstum der zwei 5xHT Kulturen bleibt leicht hinter den Kulturen mit normalen HT Konzentrationen zurück. Der Unterschied zwischen den DG44 Kulturen ist etwas größer (Abb. 11). Jedoch ist der starke Abfall der DG44 5xHT Kurve auch auf die sehr rasche Abnahme der Viabilität zurückzuführen. Die μ -Werte zeigen ein besseres Wachstum der DG44 Kulturen gegenüber den DUKX-B11 Kulturen in der exponentiellen Phase. Ein Unterschied zwischen normalen HT Konzentrationen und fünffachen ist aber nicht zu sehen. Insgesamt erreichen die 5xHT Kulturen niedrigere Zellzahlen als die Kulturen mit normaler HT Konzentration. Im Vergleich $1,24 \cdot 10^6$ Z/ml für DUKX-B11 5xHT, $1,49 \cdot 10^6$ Z/ml für DG44 5xHT sowie $1,43 \cdot 10^6$ für DUKX-B11 und $2,1 \cdot 10^6$ für DG44 (Abb. 10).

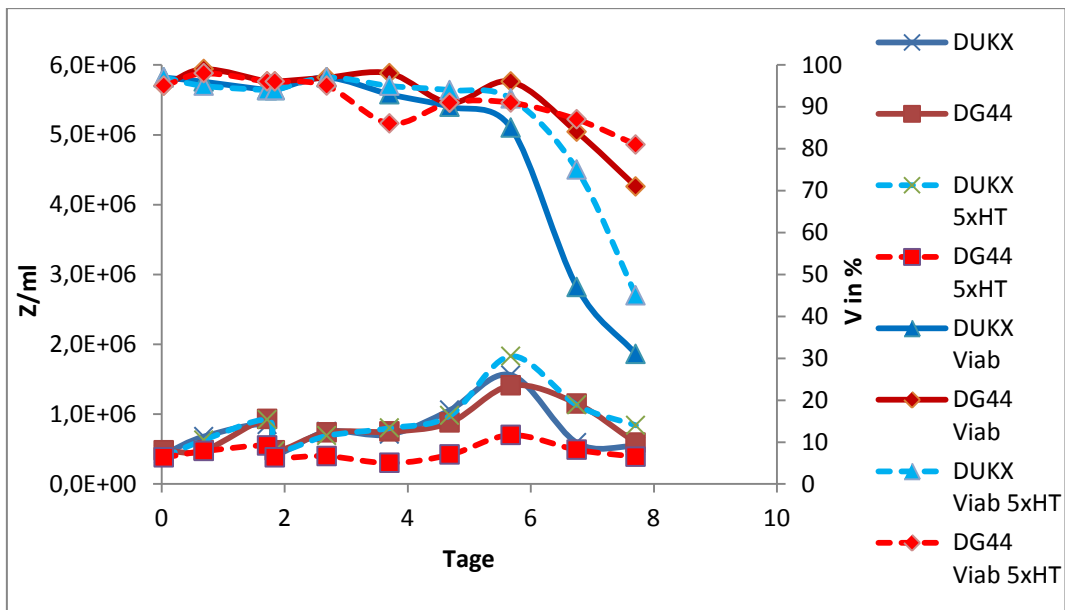


Abbildung 13: Wachstum und Viabilität von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch F25)

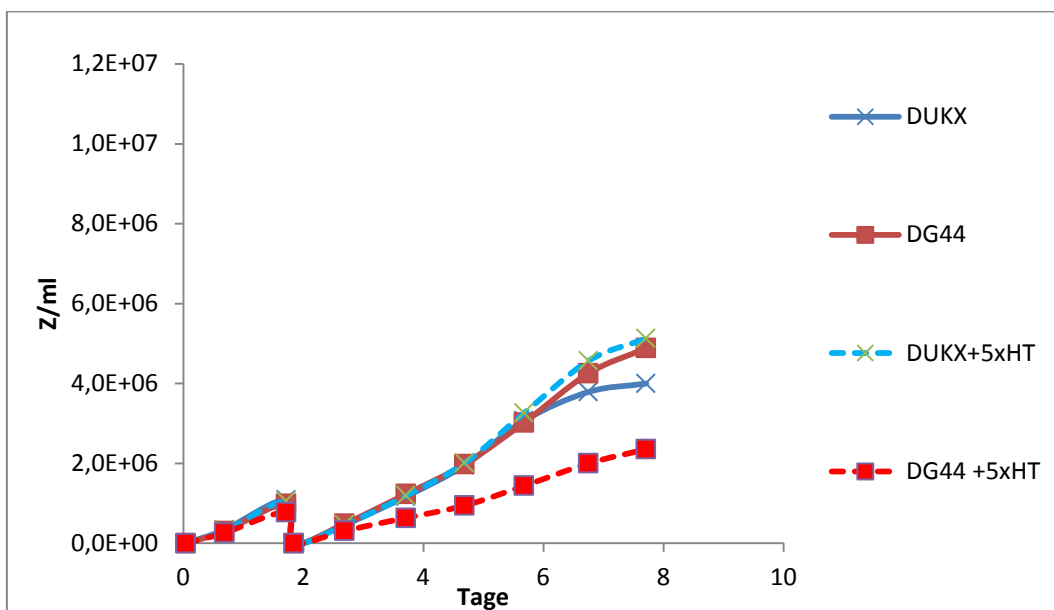


Abbildung 14: Viable kumulierte Zellzahl von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch F25)

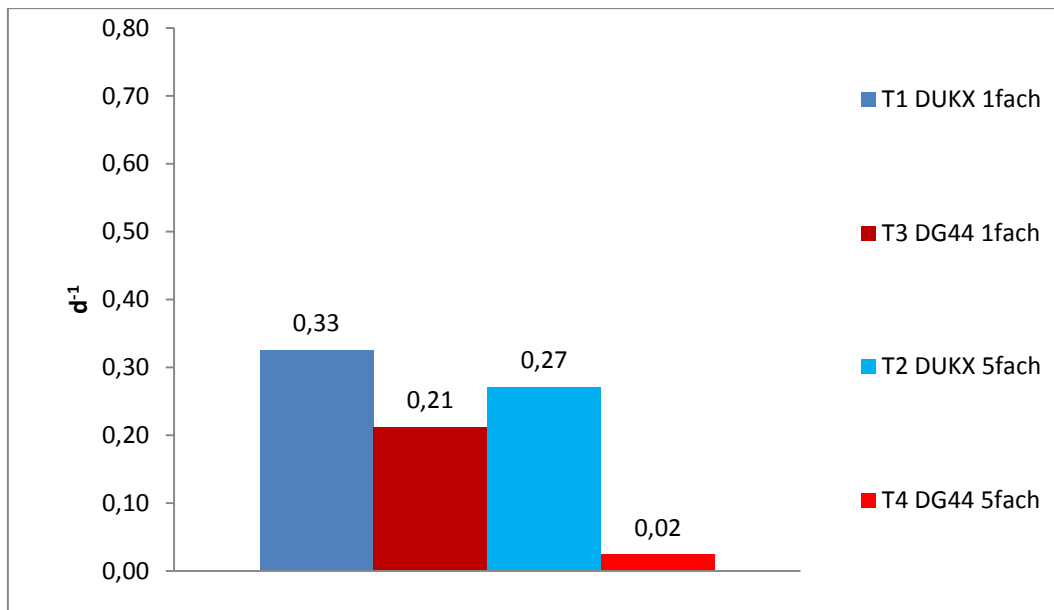


Abbildung 15: Wachstumsrate von DUKX-B11 und DG44 in zwei unterschiedlichen Medien (Versuch F25)

Der vierte Versuch zeigte wieder ein etwas schlechteres Wachstumsverhalten zwischen den Kulturen mit normalen HT Konzentrationen und den 5xHT. Das sehr schlechte Wachstum der DG44 5xHT Kultur ist jedoch auf den Ausfall der Sauerstoffelektrode zurückzuführen. Ein Austausch im laufenden Betrieb war nicht möglich. Trotz manueller Gasmischung regenerierte sich die Kultur nicht mehr und erreichte insgesamt weitaus niedrigere Zellzahlen als die Vergleichskulturen. Die DUKX-B11 Kulturen zeigen in der Absterbephase einen sehr raschen Abfall der Viabilität. Die maximale Zellzahl blieb trotzdem über den Werten der DG44 Kulturen.

3.1.2 Nährstoffe und Abfallprodukte

Der Verbrauch der zwei wichtigsten Nährstoffe ist für die zwei Stämme leicht unterschiedlich. Hingegen gibt es zwischen den unterschiedlichen HT Konzentrationen kaum eine signifikante Änderung in den Metabolit Werten. Auffällig ist, dass die DUKX-B11 5xHT Kulturen ein paar Tage länger Glutamin im Medium beinhalten als die DUKX-B11 Kulturen mit normaler HT Konzentration. Die Diagramme (Abb. 16-23) zeigen den Verlauf der Glukose-, Glutamin-, Laktat- und Ammoniak-Werte im Vergleich zur Viabilität. Um die Ansicht übersichtlicher zu halten, befinden sich die restlichen Diagramme zu den Metaboliten von S1 und F25 im Anhang.

Die Startkonzentration von Glukose lag bei 2700 mg/L bis 3000 mg/L, die Glutaminmenge beläuft sich auf 500 mg/L. DUKX-B11 ist durch die Glukosemenge

im Medium limitiert, wohingegen in den DG44 Kulturen noch ein bis zwei Tage länger Glukose im Medium vorhanden war. Für den Glutaminverbrauch verhält es sich genau umgekehrt. Hier ist DG44 bereits nach vier bis fünf Tagen limitiert, im Medium der DUKX-B11 Kulturen hingegen, war Glutamin noch ein bis drei weitere Tage enthalten. In den DG44 Kulturen fällt die Viabilität ab, sobald das Glutamin aufgebraucht ist. In den DUKX-B11 Kulturen verhält es sich ähnlich für den Glukoseverbrauch.

Laktat ist ein Abbauprodukt der Glykolyse und deshalb direkt vom Glukoseverbrauch abhängig. Die Laktatwerte steigen in der exponentiellen Wachstumsphase stärker an und erreichen in der stationären Phase in den Schüttelkulturen S1 und S2 2000 mg/L. In den Fermentoren liegt der Wert bei allen Kulturen zwischen 200 mg/L und 400 mg/L höher. Die Laktatkonzentration erreicht den Maximalwert, wenn die Glukose komplett verbraucht ist. Ab diesem Zeitpunkt kommt es zu einer leichten Abnahme der Laktatkonzentration. Es werden 100 mg/L bis 300 mg/L in allen Kulturen wieder verbraucht.

Ammoniak entsteht aus dem Abbau von Glutamin. Durch einen rascheren Verbrauch von Glutamin der von DG44 zu erwarten ist, sollten die Ammoniakwerte ebenso schnell ansteigen. Dieses Ergebnis kann für DG44 ist in allen Kulturen bestätigt werden. Gegenüber DUKX-B11 Kulturen ist ein doppelt so schneller Anstieg in der exponentiellen Phase zu beobachten. Jedoch erreichten die DG44 Kulturen in nur zwei der vier Batches leicht höhere Endwerte als DUKX-B11. Zwischen normaler und 5xHT Konzentration gab es keinen signifikanten Unterschied. Die Ammoniak-Werte erreichten 70 mg/L bis 90 mg/L.

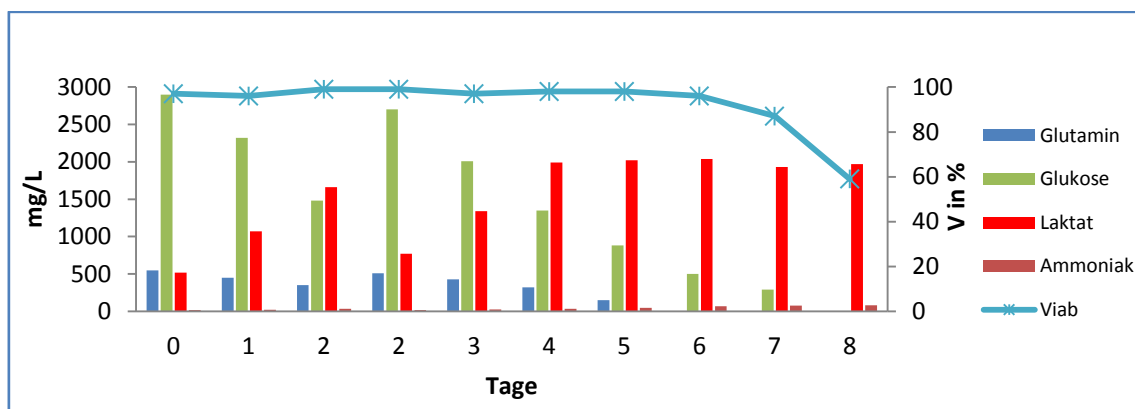


Abbildung 16: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DUKX-B11 im 1xHT Medium (Versuch S2)

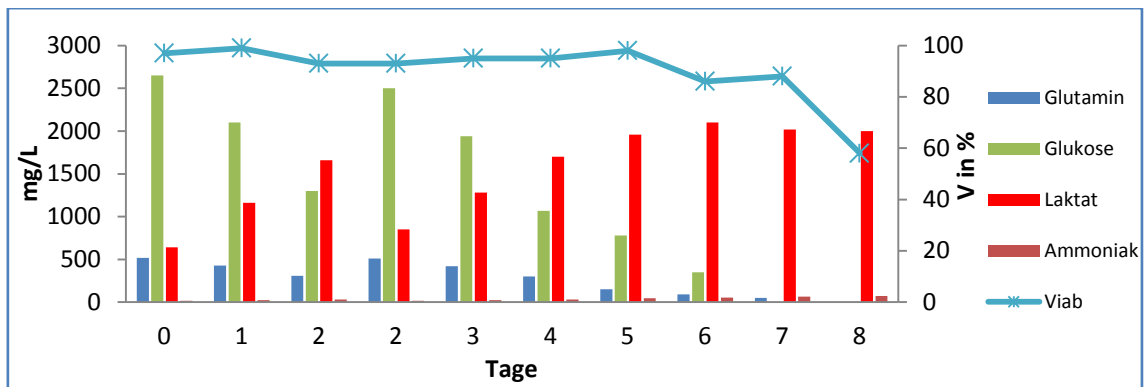


Abbildung 17: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DUKX-B11 im 5xHT Medium (Versuch S2)

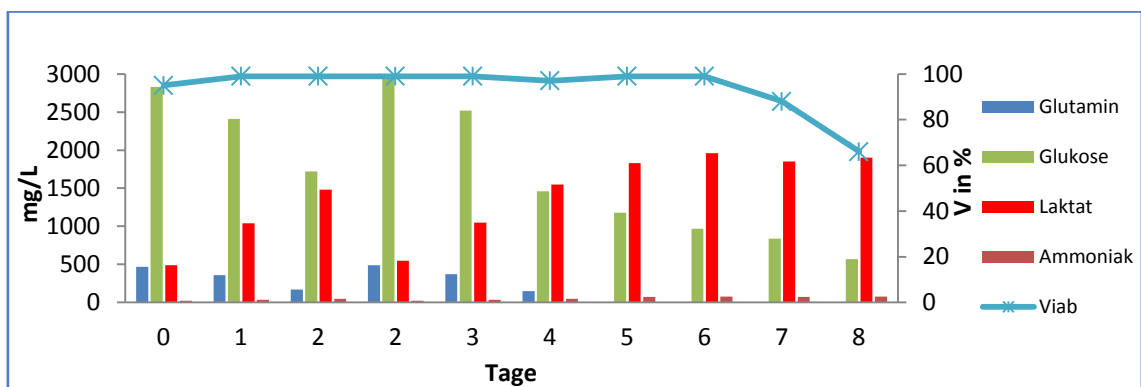


Abbildung 18: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DG44 im 1xHT Medium (Versuch S2)

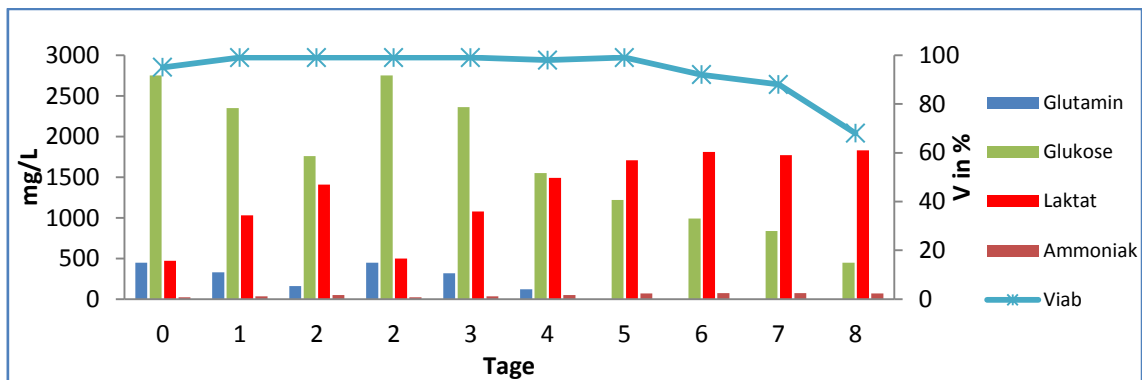


Abbildung 19: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DG44 im 5xHT Medium (Versuch S2)

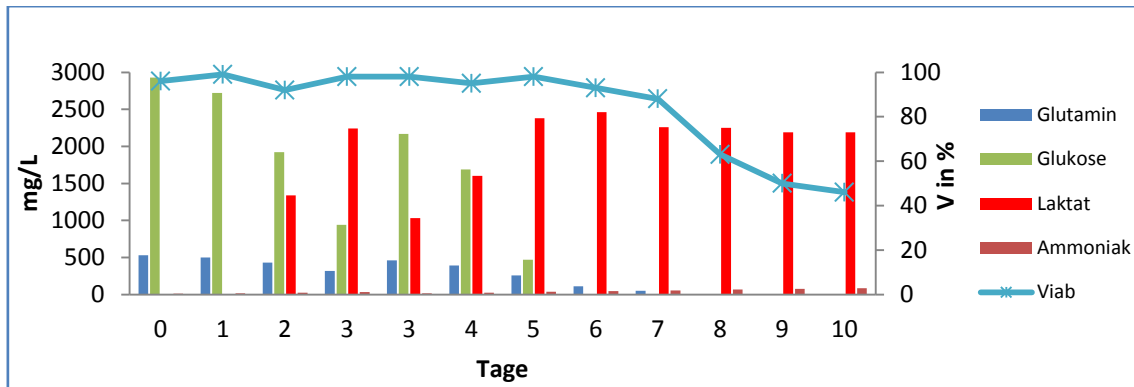


Abbildung 20: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DUKX-B11 im 1xHT Medium (Versuch F24)

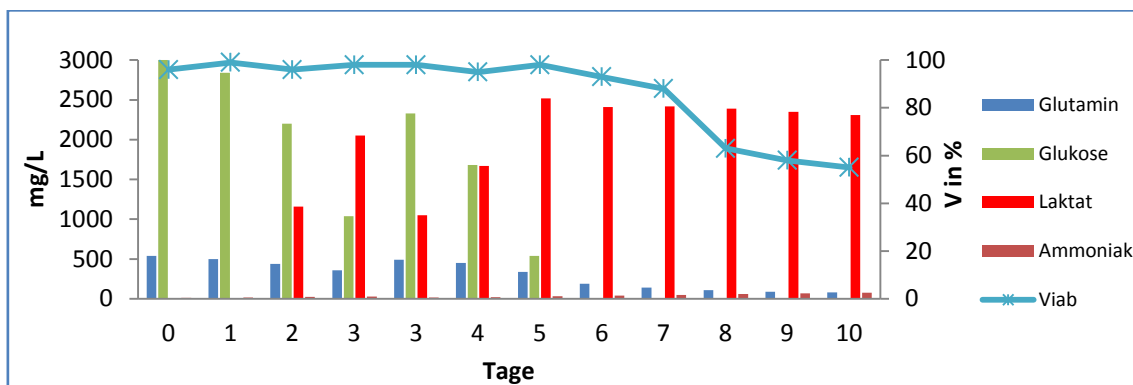


Abbildung 21: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DUKX-B11 im 5xHT Medium (Versuch F24)

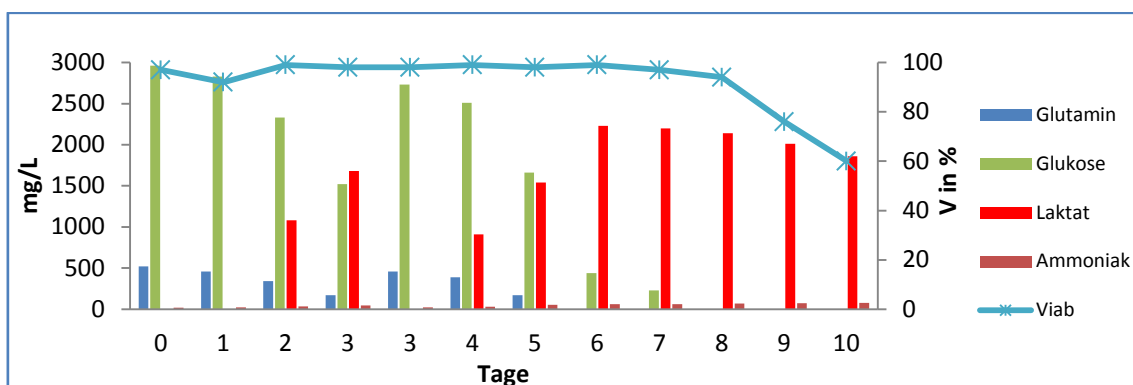


Abbildung 22: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DG44 im 1xHT Medium (Versuch F24)

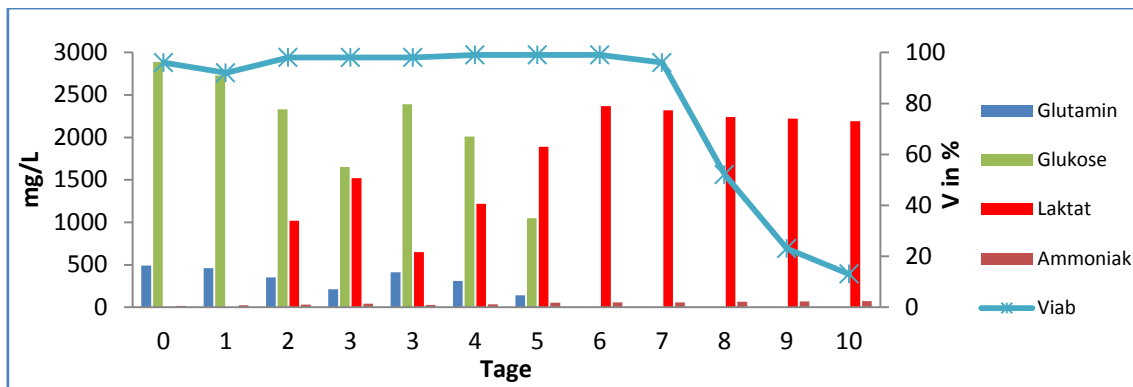


Abbildung 23: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DG44 im 5xHT Medium (Versuch F24)

3.2 Medium Umstellung der DG44 IgM-Kulturen

Dieser Versuch sollte Unterschiede im Wachstum, der Viabilität sowie der IgM-Produktion der DG44 Stämme zeigen.

Dazu wurden die Kulturen in ProCHO5 jeweils aus 10 ml in T25-flasks inokuliert. Die drei Phasen dieses Versuches waren: a) ProCHO5, b) ProCHO5 + D/H 1:1, c) D/H.

In jedem Medium verbrachte die jeweilige DG44 Kultur zehn Passagen. Eine Passage wurde nach drei bzw. vier Tagen durchgeführt. Nach dieser Zeitspanne wurde die Kultur in das neue Medium überführt. Dazu wurde so viel Medium/Kultur entfernt, dass zusammen mit dem neuen Medium 30 ml bei einer Zellzahl von rund $2,5 \cdot 10^5$ viablen Zellen/ml erreicht wurden.

Mit dem Bioprofiler 100+ wurde die ursprüngliche Glukose- und Glutaminmenge beider Medien gemessen. Diese waren 7,7 g/L Glukose in ProCHO5 und 3,1 g/L Glukose in D/H Medium. Glutamin war zu 0,5 g/L $\pm 0,05$ in beiden Medien vorhanden. Der Gehalt ist in beiden Medien fast ident, da es zugegeben wurde.

3.2.1 Wachstum und Viabilität

Die DG44 2G12 Ori erreichte im ProCHO5 Medium eine maximale viable Zellzahl von $2,66 \cdot 10^6$ Z/ml. Im 1:1 Gemisch von ProCHO5 und D/H Medium $2,41 \cdot 10^6$ Z/ml und im reinen D/H Medium maximal $1,9 \cdot 10^6$ Z/ml. Die Viabilität fiel im ProCHO5 Medium einmal auf 90%, blieb aber ansonsten bei mindestens 95%. Im 1:1 Gemisch war dieser Wert nie unter 98%. Im D/H Medium fiel die Viabilität an einem Messtag auf 90%, blieb aber ansonsten ebenso bei über 95%. Die durchschnittliche

Zellzahl der zehntägigen Adaptionphase zeigte den höchsten Wert für das 1:1 Medien Gemisch. Der niedrigste Mittelwert ist bei der Kultur mit D/H Medium zu finden.

DG44 HB617 zeigte in ProCHO5 eine maximale viable Zellzahl von $2,61 \cdot 10^6$, im 1:1 Gemisch war diese etwas niedriger ($2,54 \cdot 10^6$ Z/ml) und im D/H Medium, bei einer max. viablen Zellzahl von $1,18 \cdot 10^6$ Z/ml, am niedrigsten. Die durchschnittliche Zellzahl war im 1:1 Medium am höchsten und im D/H Medium am niedrigsten. Ebenso bestätigten die μ -Werte (Abb. 35) die Ergebnisse der durchschnittlichen Zellzahlen (Abb. 34). Die Viabilität war sowohl in reinem ProCHO5, als auch im 1:1 Gemisch immer über 95%. Im D/H Medium war jedoch die Viabilität im Durchschnitt bei 93%. Dafür sind die gemessenen Zellzahlen homogener als im ProCHO5 und 1:1 Medium. Die durchschnittliche Wachstumsrate spiegelt die durchschnittliche Zellzahl wieder, mit dem höchsten Wert im 1:1 Medium und dem niedrigsten im D/H Medium (Abb. 35).

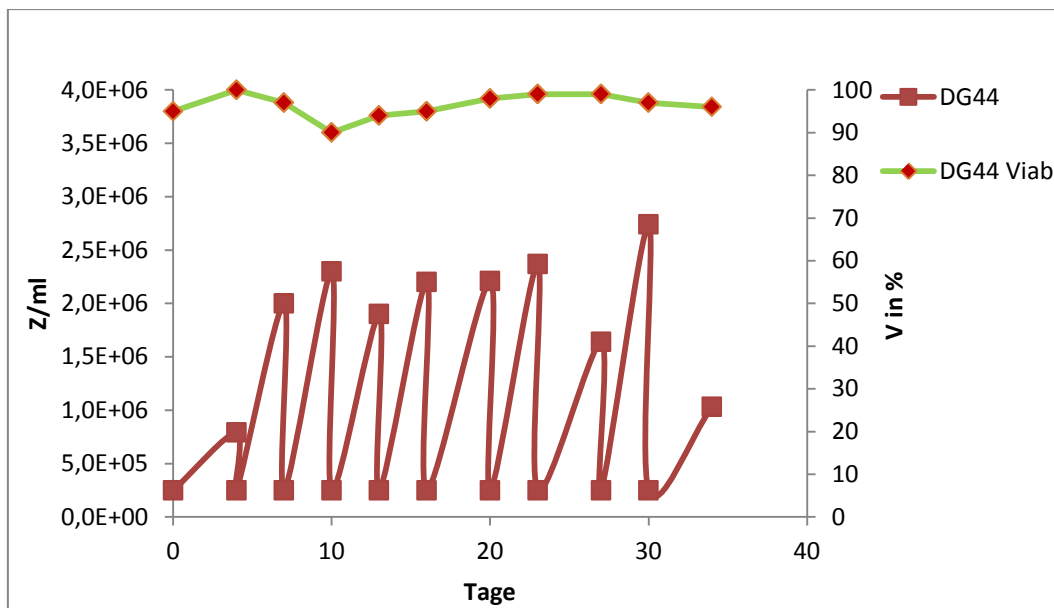


Abbildung 24: Zellzahl und Viabilität von DG44 2G12 Ori im ProCHO5 Medium

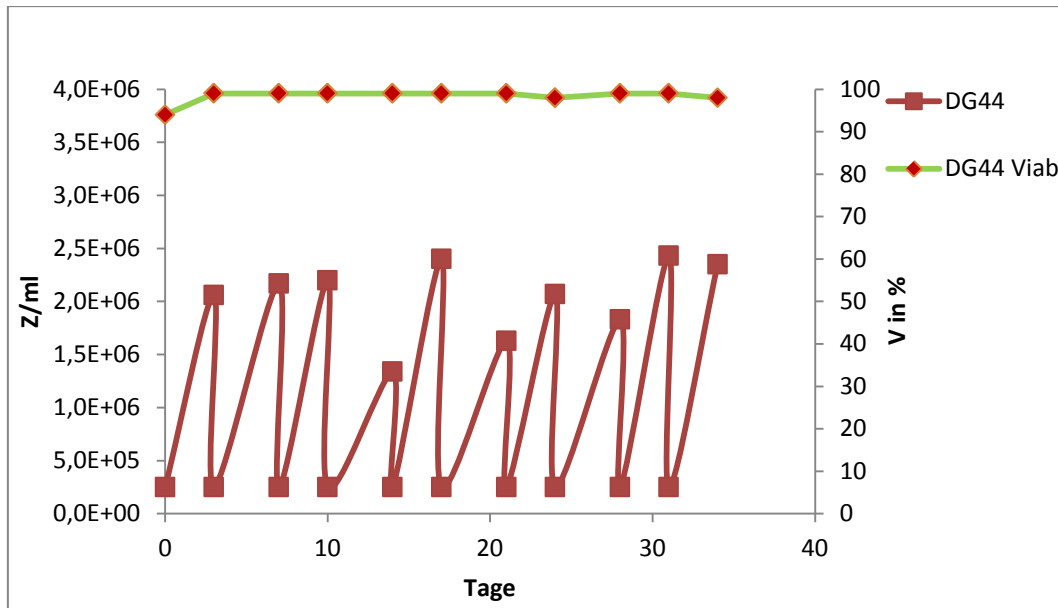


Abbildung 25: Zellzahl und Viabilität von DG44 2G12 Ori im ProCHO5-D/H 1:1 Medium

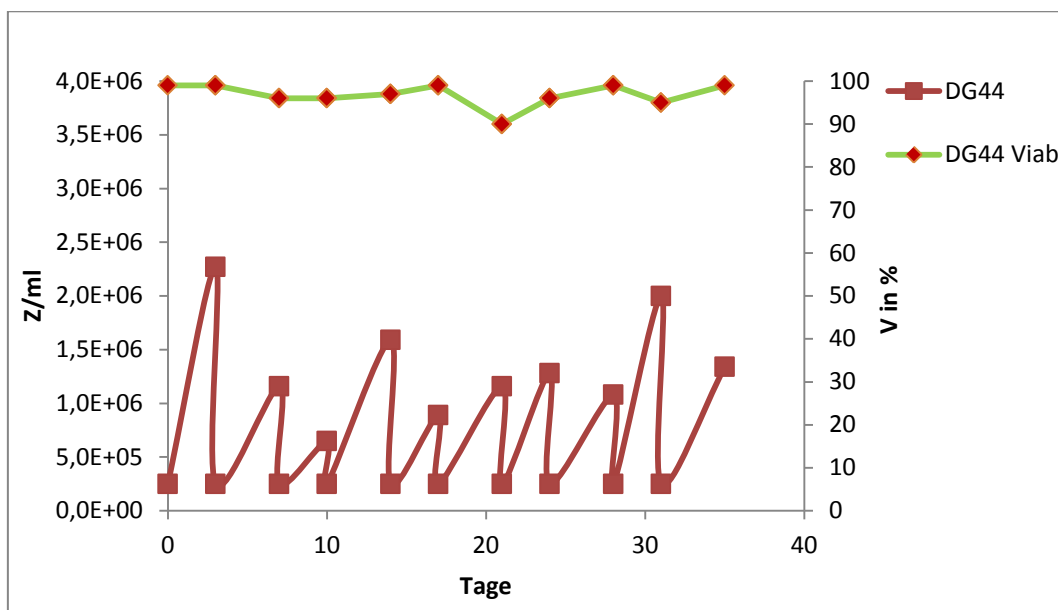


Abbildung 26: Zellzahl und Viabilität von DG44 2G12 Ori im D/H Medium

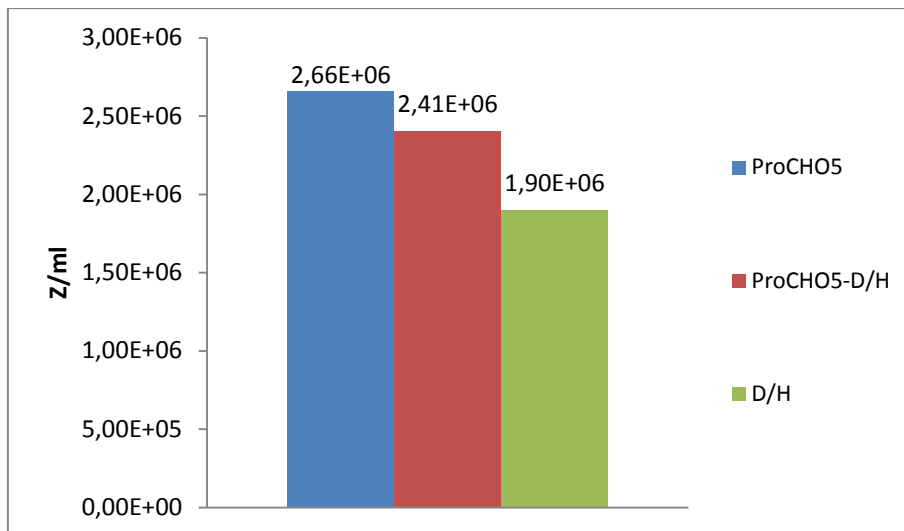


Abbildung 27: Maximale Zellzahl von DG44 2G12 Ori in unterschiedlichen Medien

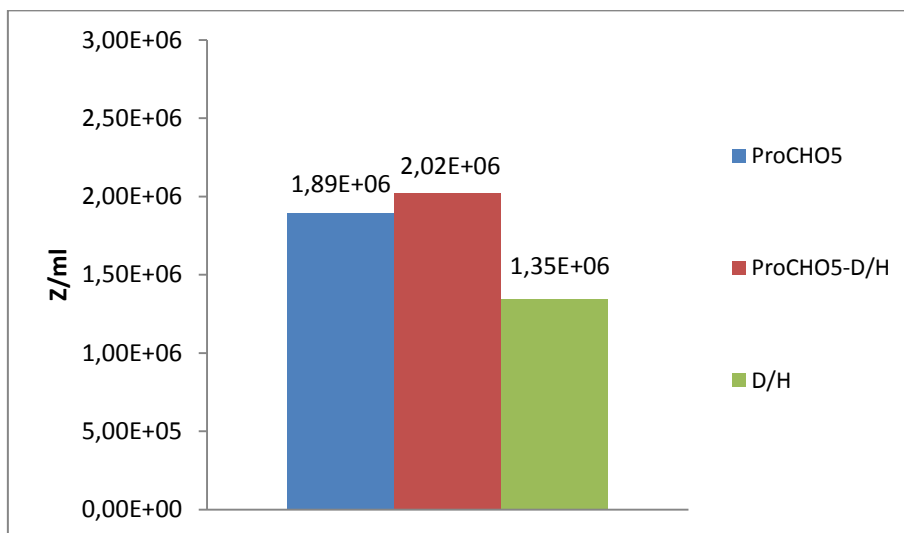


Abbildung 28: Durchschnittliche Zellzahl von DG44 2G12 Ori in unterschiedlichen Medien

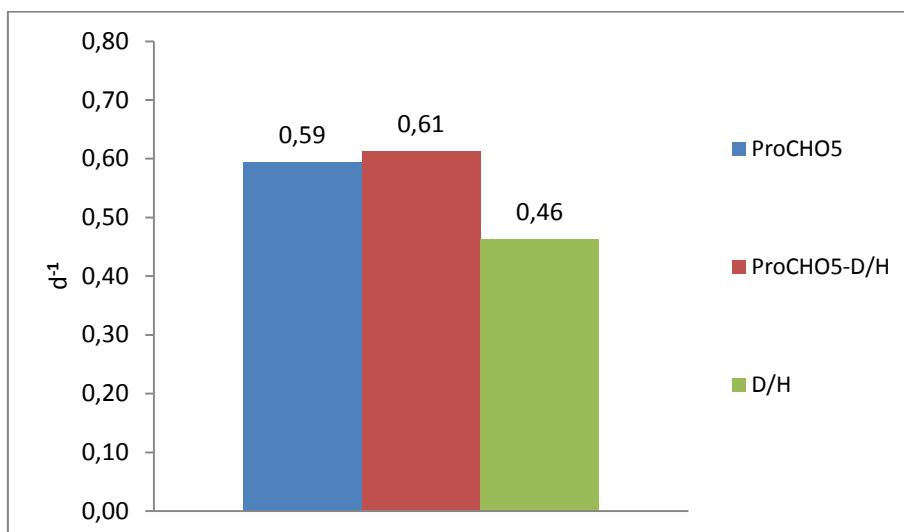


Abbildung 29: Durchschnittliche Wachstumsrate von DG44 2G12 Ori in unterschiedlichen Medien

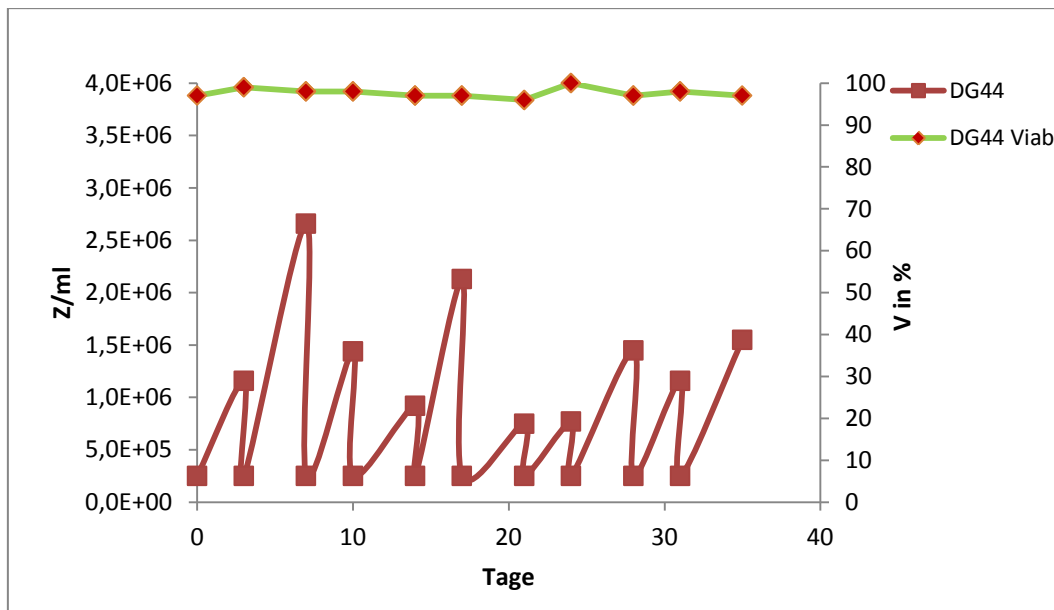


Abbildung 30: Zellzahl und Viabilität von DG44 HB617 im ProCHO5 Medium

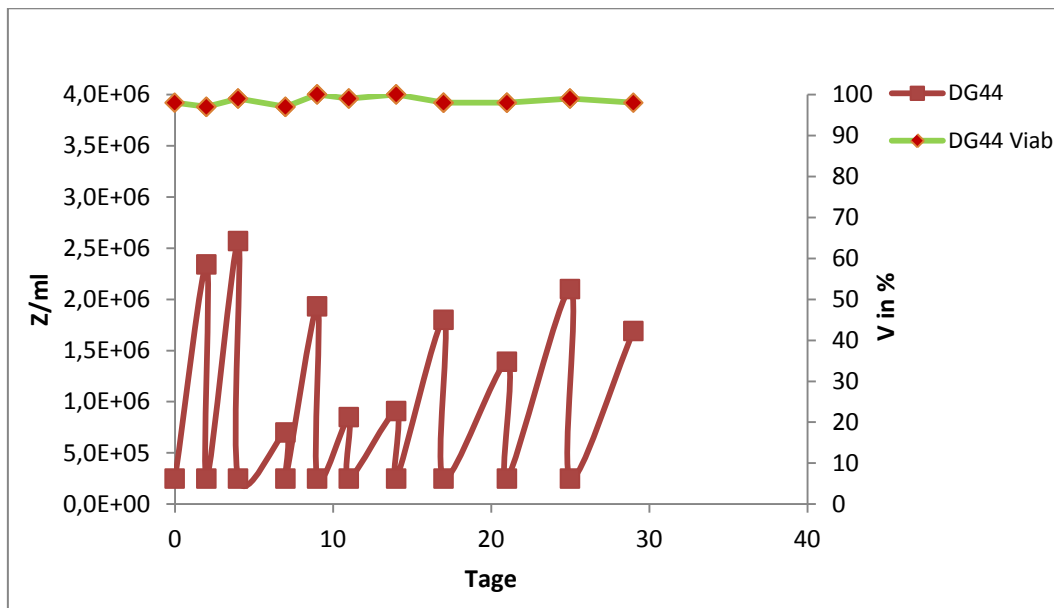


Abbildung 31: Zellzahl und Viabilität von DG44 HB617 im ProCHO5-D/H 1:1 Medium

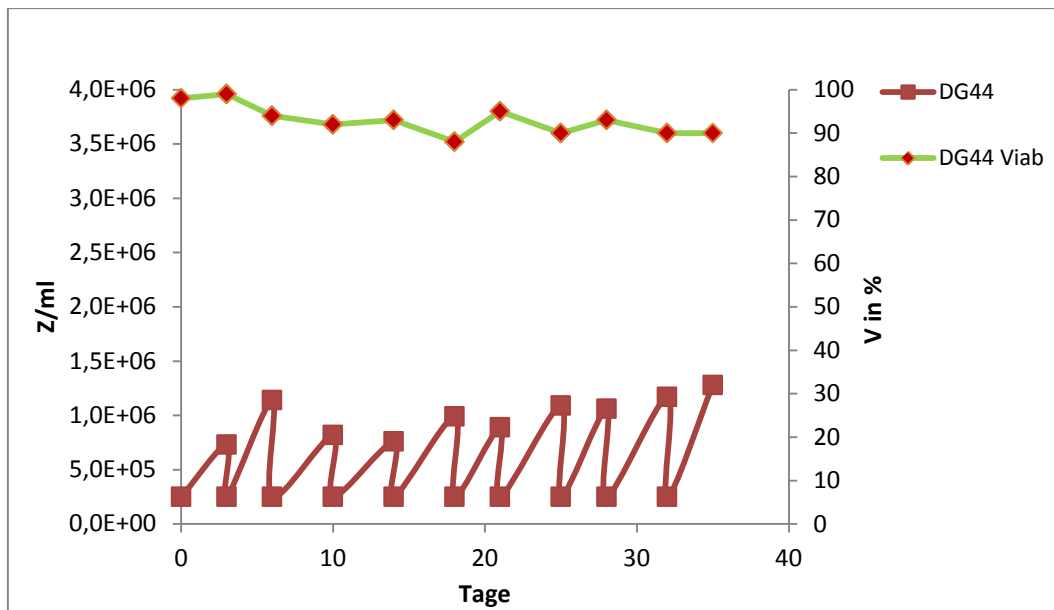


Abbildung 32: Zellzahl und Viabilität von DG44 HB617 im D/H Medium

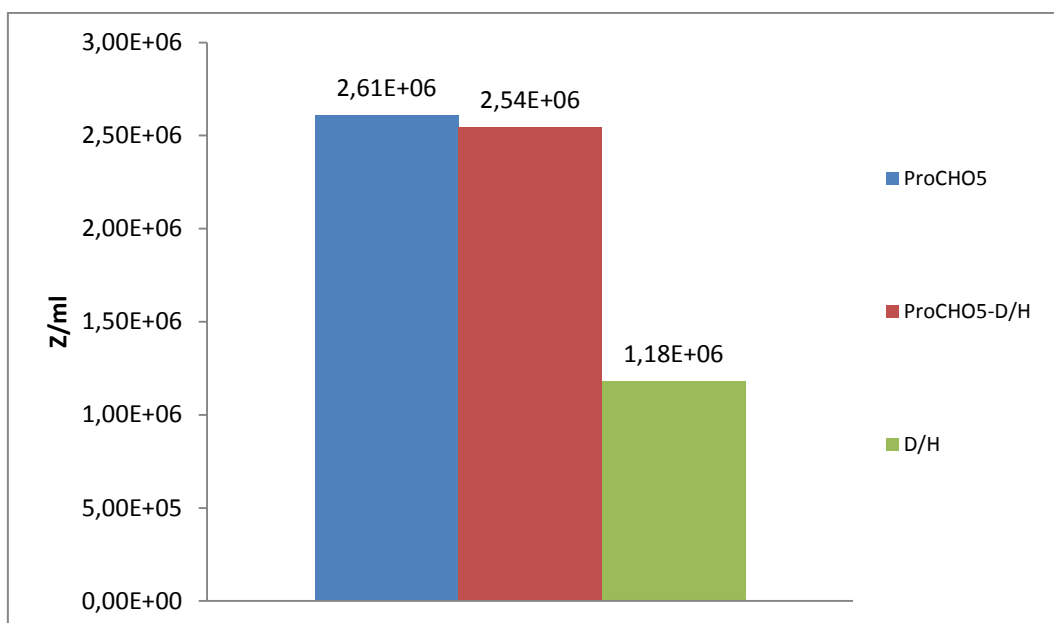


Abbildung 33: Maximale Zellzahl von DG44 HB617 in unterschiedlichen Medien

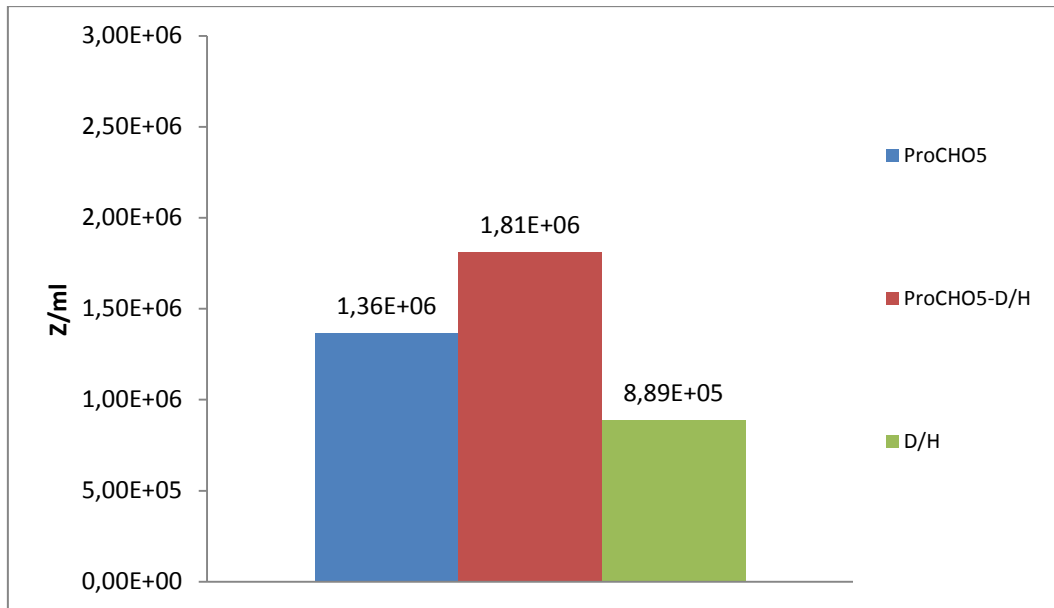


Abbildung 34: Durchschnittliche Zellzahl von DG44 HB617 in unterschiedlichen Medien

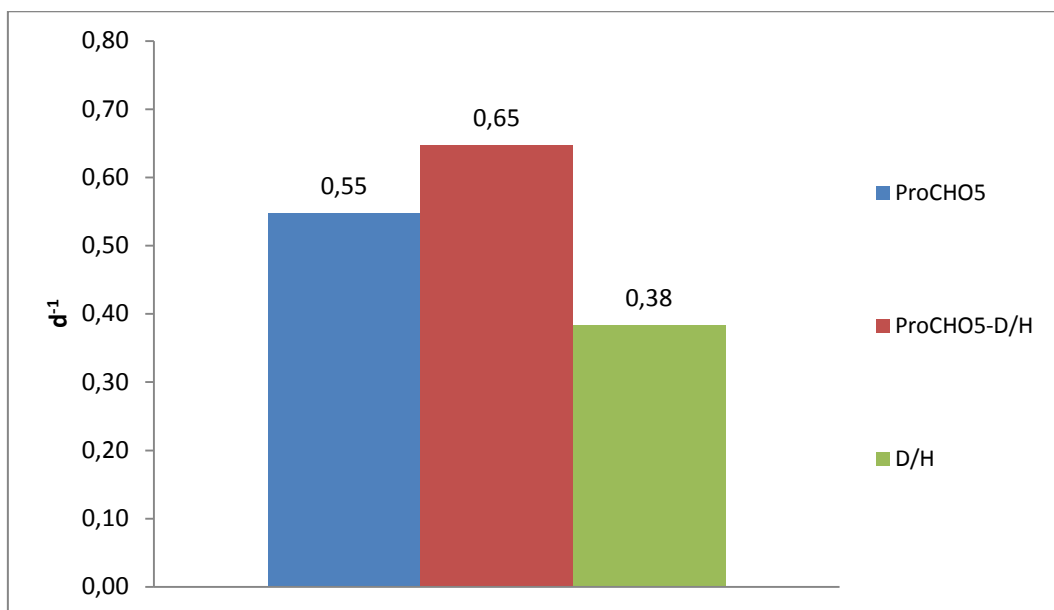


Abbildung 35: Durchschnittliche Wachstumsrate von DG44 HB617 in unterschiedlichen Medien

3.2.2 Antikörperproduktion

Um die Ausbeute an IgM zu ermitteln, wurden jeweils in den letzten zwei aufeinander folgenden Passagen Proben gezogen. Aus diesen zwei Werten jeder Adaptionsphase konnte die Tagesproduktion berechnet werden.

Die höchste IgM Konzentration zeigte DG44 2G12 Ori im ProCHO5 Medium. Sobald D/H Medium enthalten war, lag die Produktion nur noch bei 1,59 pg/c/d im 1:1 Medium bzw. 1,76 pg/c/d im reinem D/H Medium.

DG44 Hb617 produzierte pro Zelle am meisten IgM im 1:1 Mediengemisch. Reines ProCHO5 bzw. D/H Medium zeigten fast idente Antikörperkonzentrationen. DG44 HB617 erreichte insgesamt eine um den Faktor sieben bis elf Mal bessere IgM-Ausbeute als DG44 2G12 Ori.

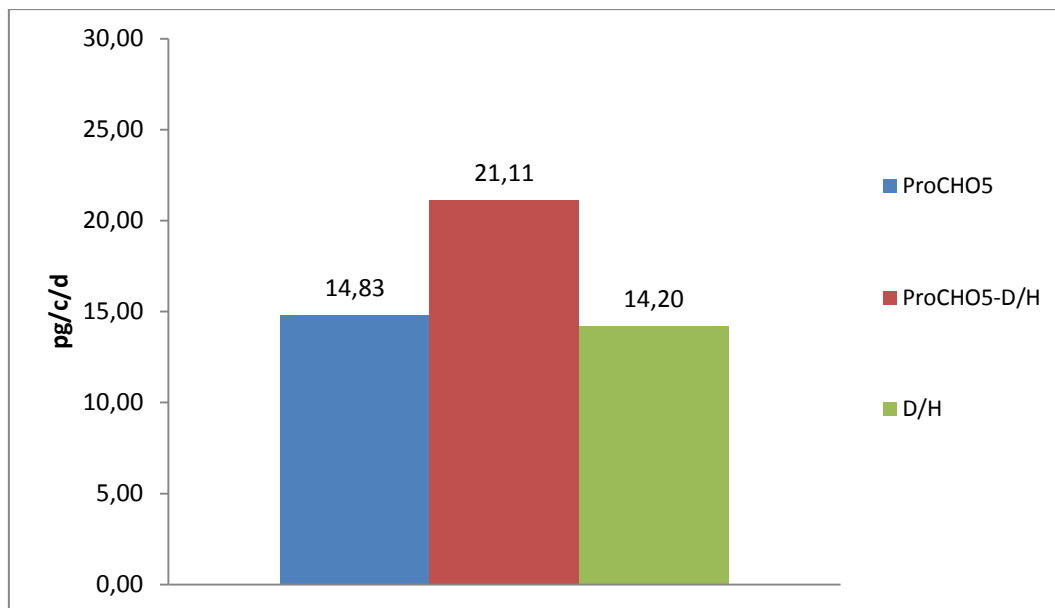


Abbildung 36: IgM-Tagesproduktion von DG44 HB617 in unterschiedlichen Medien

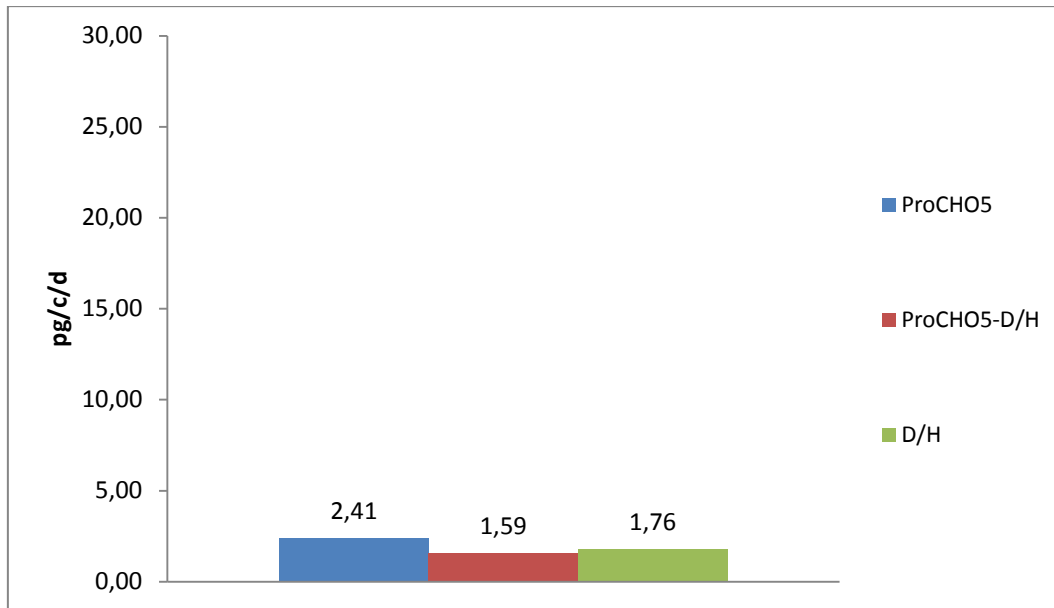


Abbildung 37: IgM-Tagesproduktion von DG44 2G12 Ori in unterschiedlichen Medien

3.3 Vergleich von verschiedenen IgM-produzierenden DUKX-B11 und DG44 Kulturen

Der Start der drei IgM-Versuche erfolgte mit einer Inokulationszellzahl von $3,5 \cdot 10^5$ Z/ml. Passagiert wurde auf eine Zellzahl von $2,5 \cdot 10^5$. Alle Zelllinien wuchsen bis zu den Versuchen mit MTX im Medium. Die Probenahme der jeweiligen Kultur konnte beendet werden, sobald die Viabilität unter 70% fiel. Keine Kultur überlebte länger als elf Tage. Es wurden zwei Versuche in Schüttler-Kultur (S3, S6) und ein Versuch im Fermentor (F27) durchgeführt.

3.3.1 Wachstum und Viabilität

Der erste IgM-Versuch ergab die beste Wachstumsrate für DG44 2G12 Ori. Im Gegensatz dazu erreichte DG44 HB617 die niedrigste Zellzahl. Auch die Viabilität nahm bei diesem Stamm am rasantesten ab. Der Einbruch der Viabilität am ersten Tag nach Inokulation ist auf Adaptionstress zurückzuführen. DG44 HB617 reagierte schon vorher sehr empfindlich auf kleinste Änderungen in der Kultivierung.

Am längsten blieb DUKX-B11 2G12 GL in Kultur. Dessen Viabilität fiel erst am elften Tag unter 70%. Die Wachstumsrate lag nah an der von DG44 2G12 Ori. In der logarithmischen Phase war die spezifische Wachstumsrate beider Kulturen ident (Abb. 40).

DUKX-B11 HB617 musste bereits am zweiten Tag wegen einer Kontamination beendet werden. Der gesamte Inhalt des Kolbens wies eine starke Trübung auf.

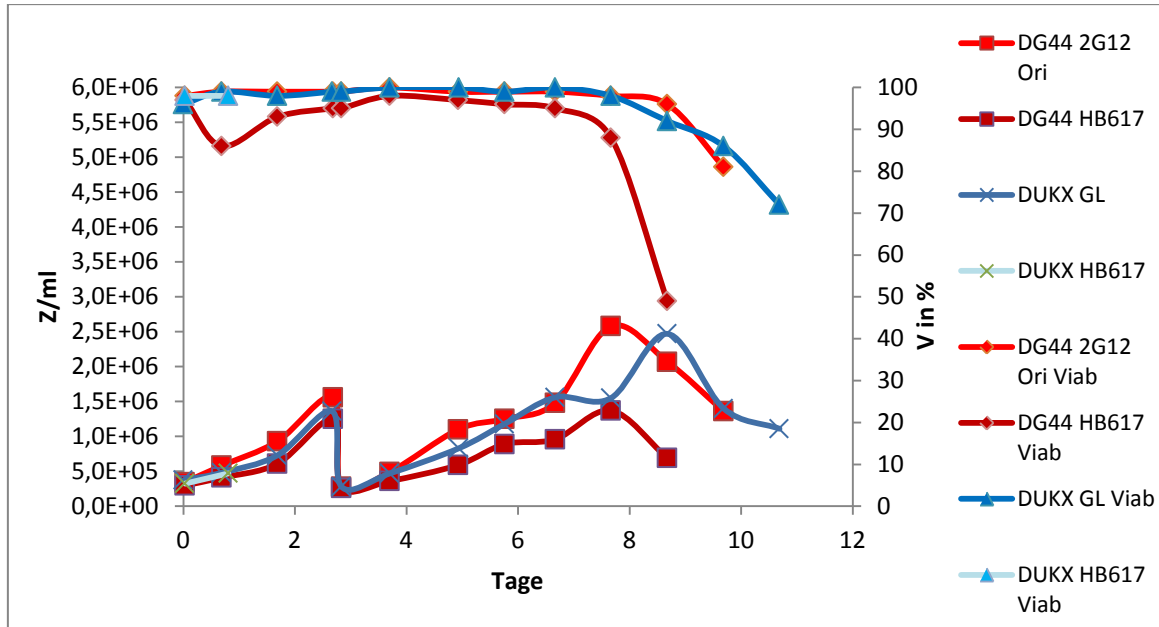


Abbildung 38: Zellzahl und Viabilität rekombinanter Zelllinien (Versuch S3)

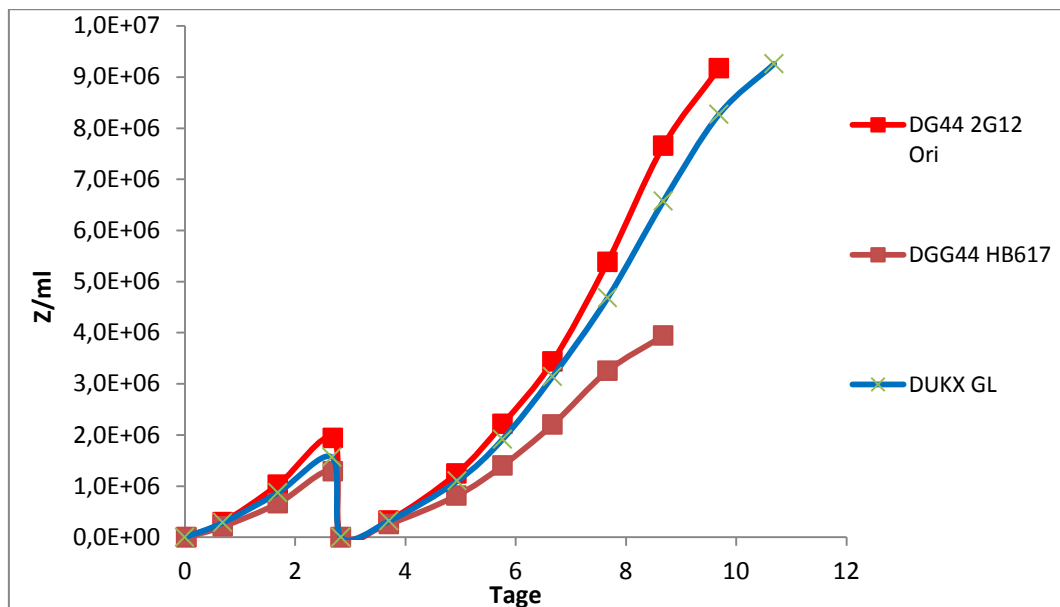


Abbildung 39: Viable kumulierte Zellzahlrekombinanter Zelllinien (Versuch S3)

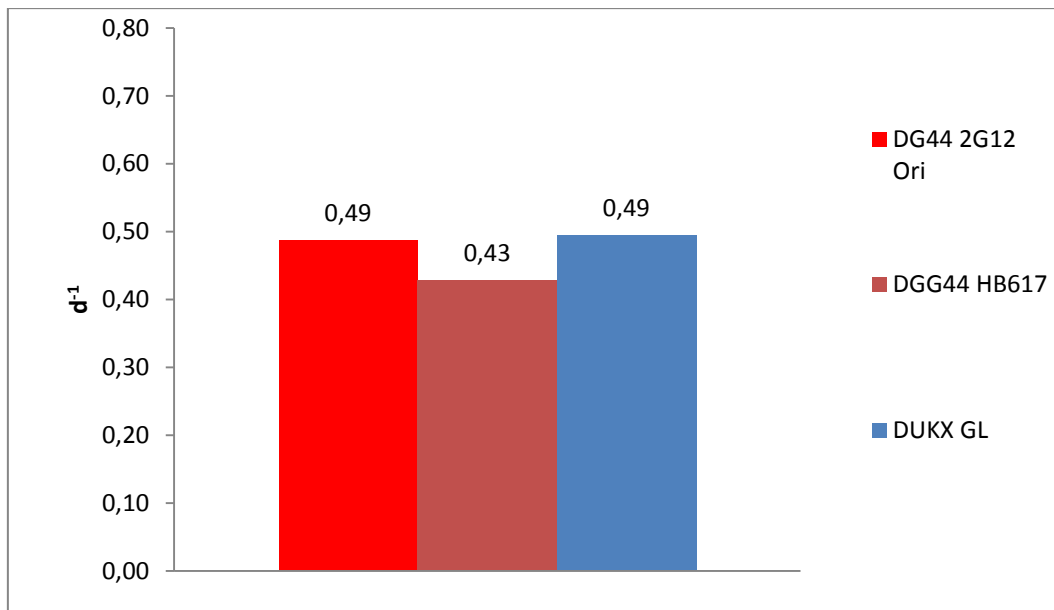


Abbildung 40: Durchschnittliche Wachstumsrate rekombinanter Zelllinien (Versuch S3)

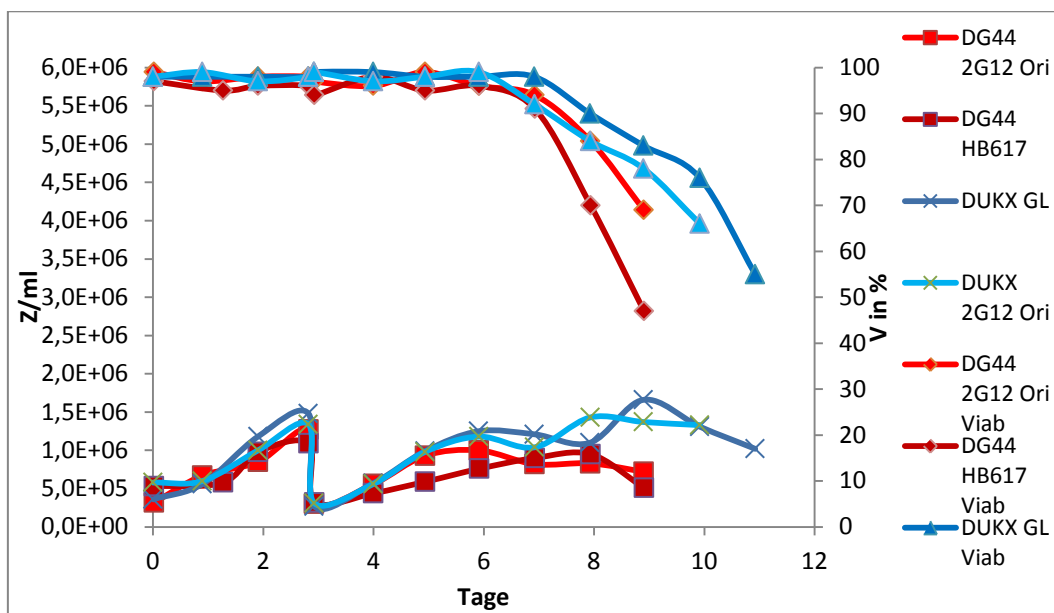


Abbildung 41: Zellzahl und Viabilität rekombinanter Zelllinien (Versuch S6)

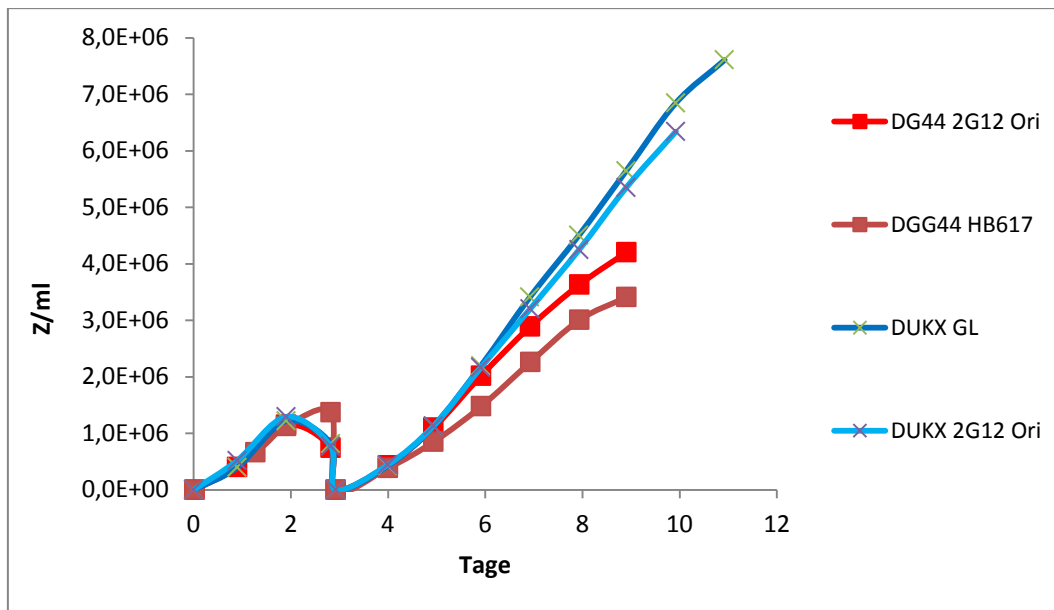


Abbildung 42: Viable kumulierte Zellzahl rekombinanter Zelllinien (Versuch S6)

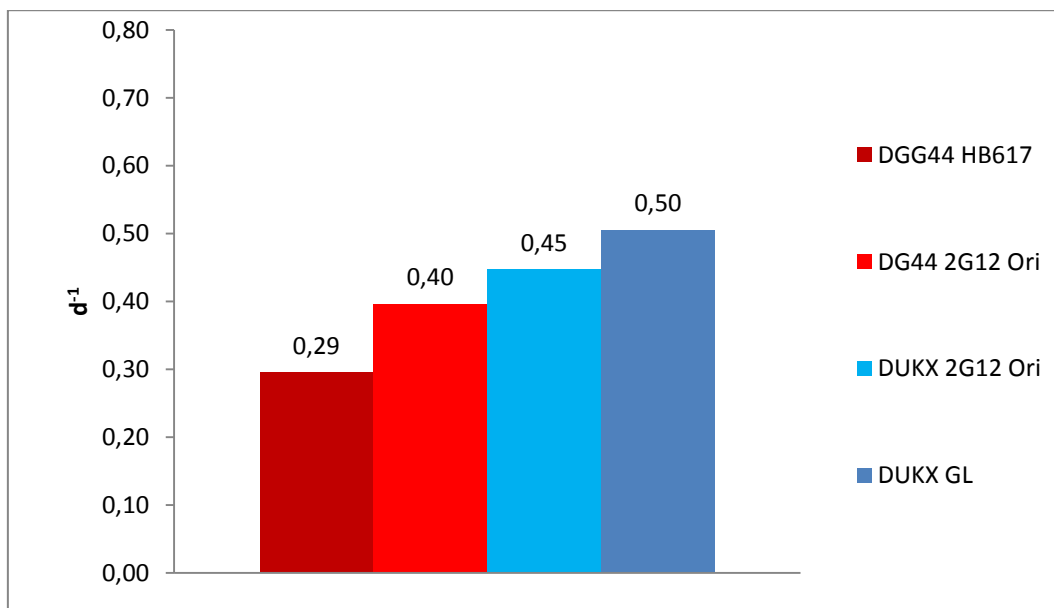


Abbildung 43: Durchschnittliche Wachstumsrate rekombinanter Zelllinien (Versuch S6)

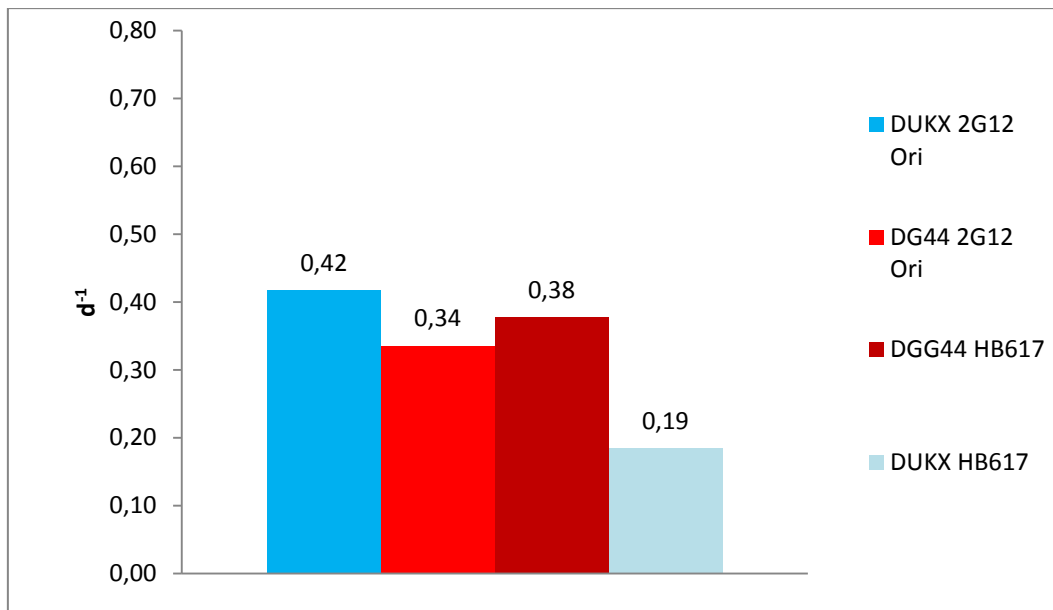


Abbildung 44: Durchschnittliche Wachstumsrate rekombinanter Zelllinien (Versuch F27)

Im zweiten Versuch blieben alle Zellzahlen relativ niedrig. Alle Kulturen erreichten insgesamt kaum höhere Zellzahlen als nach dem Mediumwechsel. DG44 HB617 weist hier jedoch eine sehr ähnliche Wachstums- und Viabilitätskurve wie im vorangegangenen Versuch (Abb. 38) auf. Der Stamm zeigte bereits ab dem siebten Tag, sowohl stark abfallenden Viabilitätswerten, als auch die niedrigste Zellzahl aller Kulturen.

Bei ähnlichen Viabilitätskurven von DG44 2G12 Ori und DUKX-B11 2G12 GL zeigten sich niedrigere maximale Zellzahlen zwischen den beiden Schüttler-Versuchen. Die μ -Werte der exponentiellen Phase ähneln sich jedoch stark. Nur DG44 HB617 zeigte einen noch niedrigeren μ -Wert mit $0,29 \text{ d}^{-1}$ im Gegensatz zu $0,38 \text{ d}^{-1}$ im ersten Versuch.

Interessant ist in diesem Versuch auch der Vergleich zwischen DUKX-B11 2G12 Ori und DG44 2G12 Ori. Es zeigen sich hier sowohl in der VCCD-Abbildung, als auch in den μ -Werten leicht höhere Werte für die DUKX-B11 Linie. Auffällig ist ebenso, dass einen Tag später die Viabilität von DUKX-B11 2G12 Ori auf 70% gesunken ist.

Des Weiteren ist zu bemerken, dass die beiden DUKX-B11 Zelllinien in diesem Versuch leicht besseres Wachstum zeigten als die DG44 Zelllinien.

Der dritte Versuch wurde im Fermentor durchgeführt. Es kam hier jedoch nach fünf Tagen zu einer Infektion aller Reaktoren. Deshalb konnten die durchschnittlichen μ -Werte nur aus der Wachstumsphase vor dem Mediumwechsel verwendet werden.

In Abb. 44 zeigt DUKX-B11 2G12 Ori einen μ -Wert, der sehr ähnlich zu dem des zweiten Versuches (Abb. 43) ist. Auch der μ -Wert von DG44 2G12 Ori weicht nur um $0,06 \text{ d}^{-1}$ vom vorherigen Versuch ab. DG44 HB617 hingegen weicht, stark von dem Wert des zweiten Versuches ab. Dafür ist dieser wiederum sehr nahe zu dem des ersten Versuches. DUKX-B11 HB617 erreichte die niedrigste spezifische Wachstumsrate aller Kulturen. Auffällig ist ebenso, dass dieser bereits im ersten Versuch frühzeitig kontaminiert war und deshalb kaum Ergebnisse lieferte.

Die Zellzahl/ Viabilität sowie das VCCD-Diagramm lieferten aufgrund der Infektion im Fermentor (F27) keine signifikanten Ergebnisse (Kapitel 6).

3.3.2 Nährstoffe und Abfallprodukte

Der Nährstoffverbrauch bzw. die Produktion von Abfallstoffen war, wie erwartet, leicht unterschiedlich zwischen den Kulturen. Die Unterschiede zwischen den DG44 und DUKX Linien fielen geringer aus als in den HT Versuchen. Jedoch liefert der Vergleich zwischen den verschiedenen IgM-Klonen interessante Werte.

DG44 2G12 Ori verbrauchte das gesamte Glutamin nach sieben Tagen und die Glukose bereits nach acht Tagen (Abb. 45). DUKX 2G12 Ori verhielt sich ident, Glutamin und Glukose waren zu diesen Zeitpunkten ebenso verbraucht (Abb. 46). Die Viabilität sank jedoch in DUKX 2G12 Ori etwas schneller als in DG44 2G12 Ori.

Wie in Abb. 47 zu sehen, zeigte DUKX-B11 2G12 GL ein ähnliches Verhalten. Die beiden Nährstoffe waren am achten Tag verbraucht. Die Viabilität sank ab diesem Zeitpunkt stetig.

DG44 HB617 verbraucht das Glutamin nach acht Tagen, Glukose befand sich jedoch bis zum Batchende im Medium. Auch wenn nicht genug Daten von DUKX-B11 HB617 gesammelt werden konnten, so manifestiert sich doch ein ähnliches Verhalten zu DG44 HB617. Beide Zelllinien zeigen von Anfang an schlechtere Viabilitätswerte als die anderen Kulturen. Im Fall von DG44 HB617 nimmt die Viabilität bereits ab Tag sechs stetig ab (Abb. 48).

Auffallend ist, dass alle Stämme bis auf DG44 HB617 und DUKX-B11 HB617 das produzierte Laktat, nach zwei bis drei Tagen ohne Hauptnährstoffe, wieder verbrauchen. DG44 HB617 produzierte bis zum Ende des Batches Laktat, erreichte aber auch nicht die Konzentrationen der anderen Kulturen. DUKX-B11 HB617 kann wegen den Infektionen nicht direkt verglichen werden, liefert aber ähnliche Werte wie DG44 HB617.

Die Ammoniakproduktion war für alle Kulturen ähnlich hoch, bei einem Wert von rund 100 mg/L. Einzig die HB617 produzierenden Zelllinien bildeten eine Ausnahme. Lag der Wert für DG44 HB617 bei rund 80 mg/L, konnten für DUKX-B11 HB617 keine Endwerte bestimmt werden. F27 ergab nach Beendigung des Batches für alle Kulturen einen Wert von rund 30 mg/L Ammoniak im Medium. Da alle Kulturen in F27 frühzeitig beendet werden mussten, konnten hier generell nur S3 und S6 sinnvoll verglichen werden.

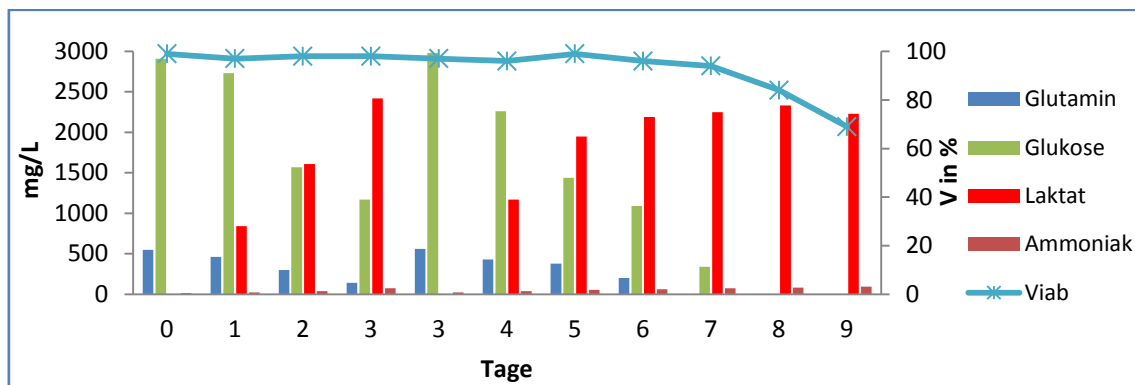


Abbildung 45: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DG44 2G12 Ori im D/H Medium (Versuch S6)

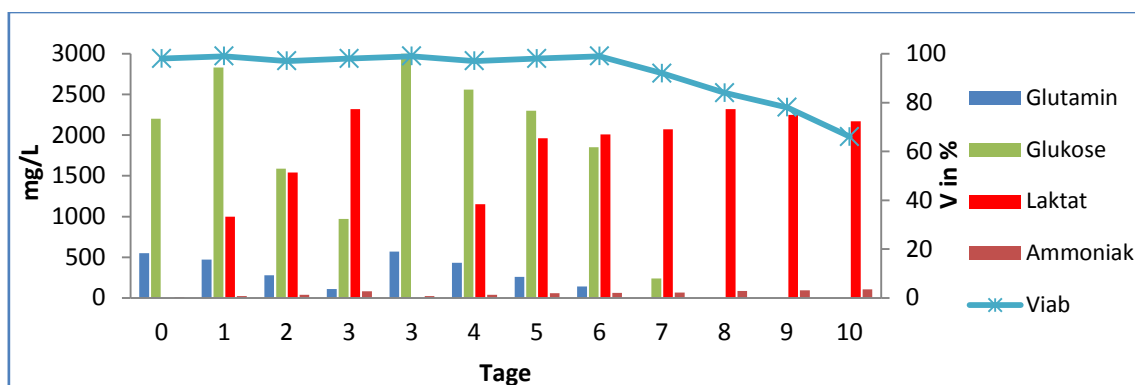


Abbildung 46: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DUKX-B11 2G12 Ori im D/H Medium (Versuch S6)

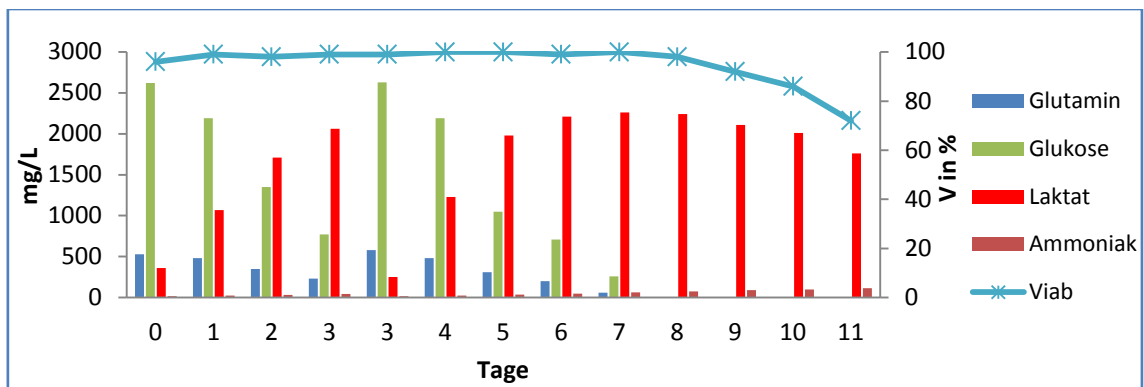


Abbildung 47: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DUKX-B11 2G12 GL im D/H Medium (Versuch S3)

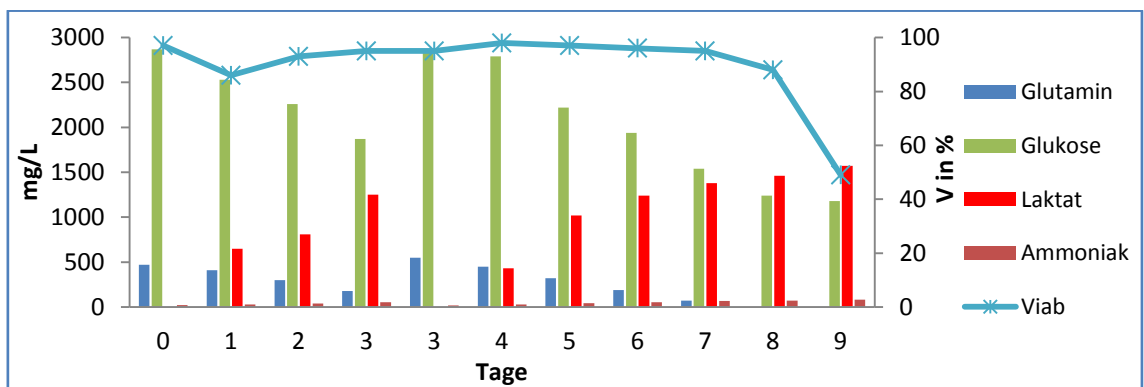


Abbildung 48: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DG44 HB617 im D/H Medium (Versuch S3)

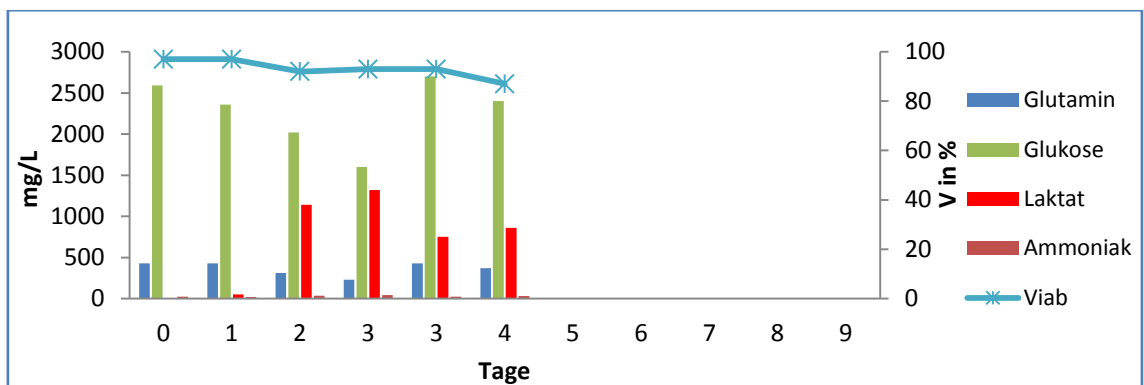


Abbildung 49: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte von DUKX-B11 HB617 im D/H Medium (Versuch F27)

3.3.3 Antikörperproduktion

Die Berechnung der Tagesproduktion einer Zelle erfolgte, im Fall der zwei Schüttler-Experimente S3 und S6, nach den Werten der exponentiellen Phase. DUKX-B11 HB617 lieferte in S3 keine IgM-Konzentrationen, da er zu früh starb. In S3 und S6 wurde der Endtiter nach zehn Tagen verglichen. Ein weiterer Versuch, der im Fermentor mit den Stämmen DUKX-B11 2G12 Ori, DG44 2G12 Ori, DG44 HB617 und DUKX-B11 HB617 durchgeführt wurde, lieferte aufgrund einer Komplettkontamination nach vier Tagen keine auswertbaren Ergebnisse. Ein Vergleich zwischen den IgM- Tagesproduktionen von F27 und den Schüttler-Versuchen wäre interessant gewesen, konnte jedoch wegen der Infektion nicht durchgeführt werden.

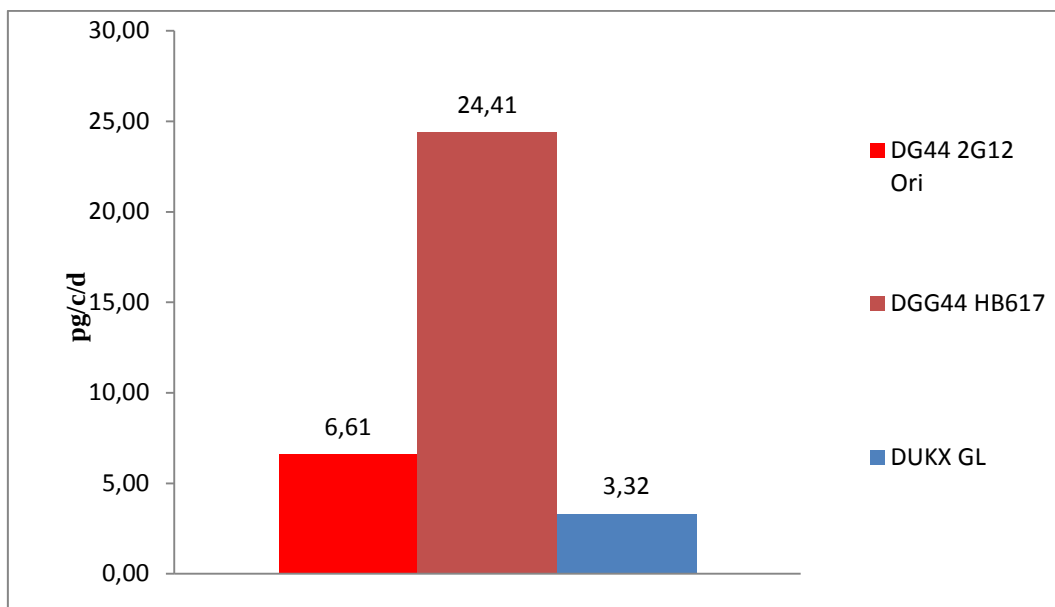


Abbildung 50: IgM-Tagesproduktion rekombinanter Zelllinien (Versuch S3)

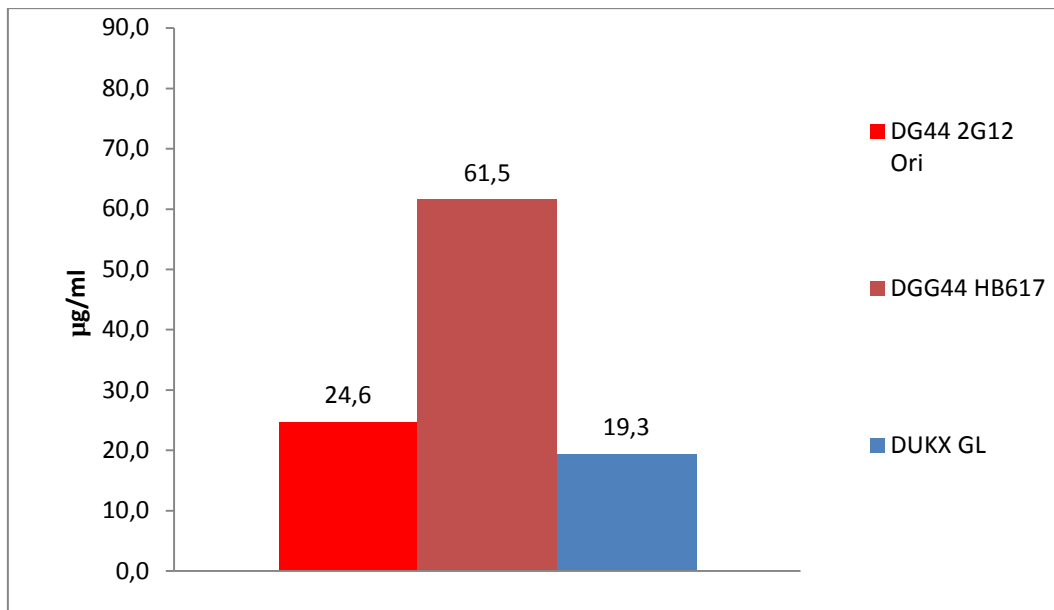


Abbildung 51: IgM-Endtiter rekombinanter Zelllinien (Versuch S3)

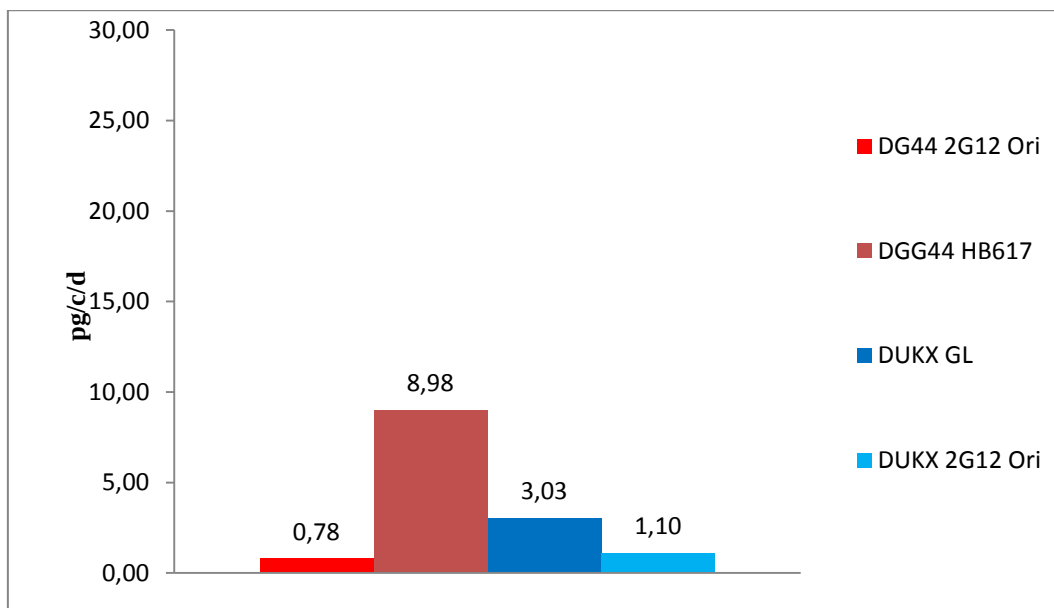


Abbildung 52: IgM-Tagesproduktion rekombinanter Zelllinien (Versuch S6)

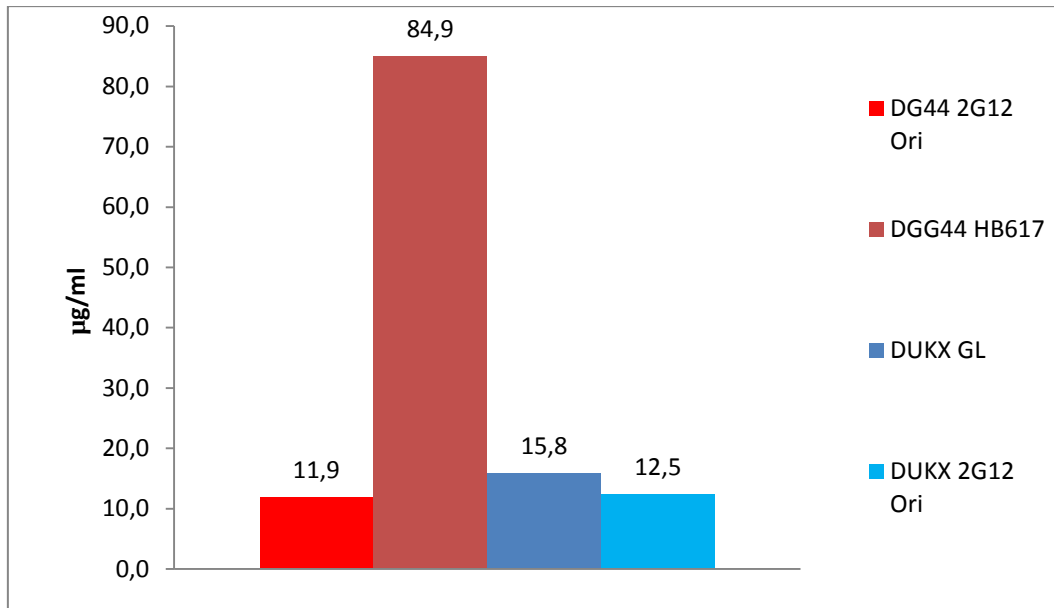


Abbildung 53: IgM-Endtiter rekombinanter Zelllinien (Versuch S6)

Die IgM-Tagesproduktionen und die Endkonzentrationen sind in S6 deutlich geringer als in S3 (Abb. 50, Abb. 52). Dies zeigte sich bereits in den Wachstumsraten, welche um einiges niedriger in S6 ausfielen. Insgesamt lieferte jeweils DG44 HB617, mit 24,41 pg/c/d in S3 und 8,98 pg/c/d in S6, die größte Antikörperausbeute. In den beiden Schüttler-Experimenten lieferte DUKX-B11 2G12 GL eine gleich bleibende Leistung von ~3 pg/c/d. DG44 2G12 Ori zeigte eine wesentlich höhere Konzentration in S3. Im Experiment S6 war der Wert, bei 0,78 pg/c/d., um das Achtfache geringer. DUKX-B11 2G12 Ori war zwar nur in S6 vertreten, wies jedoch mit 1,1 pg/c/d einen ähnlichen Wert wie DG44 2G12 Ori auf.

Die Endkonzentrationen zeigen ähnliche Ergebnisse wie schon die Tagesproduktionen (Abb. 51, Abb. 53). DG44 HB617 produzierte in den zwei Schüttler-Versuchen jeweils die höchste Konzentration an IgM. DUKX-B11 2G12 Ori zeigte höhere Antikörper-Endkonzentrationen als DG44 2G12 Ori. DUKX GL produzierte mit 19,3 µg/ml in S6 und 18,8 µg/ml in S3 eine ähnlich hohe Konzentration von IgM in beiden Schüttler-Experimenten.

4 Diskussion

4.1 HT Versuche

4.1.1 Zielsetzung

Um das Wachstum von CHO Host Zellen mit *dhfr*-Selektionssystem zu gewährleisten, ist die Zugabe von Hypoxanthin und Thymidin in das serumfreie Medium essentiell. Die Annahme, dass eine genügend hohe HT Konzentration das Fehlen von *dhfr* ausgleicht, wurde bereits 1980 postuliert (Urlaub & Chasin 1980). Für normale Reihenversuche mit zwei- bis drei tägigem Mediumwechsel konnte dies auch bestätigt werden (Florin et al. 2011). Die Fragestellung, die sich daraus für diese Versuche ergeben hat, ist, ob eine stark erhöhte HT Konzentration das Wachstumsverhalten in einem Repbatch verbessern kann. In Fedbatch-Versuchen konnte bisher keine steigernde Wirkung erzielt werden (Florin et al. 2011). Eine weitere Fragestellung in diesem Versuch ist der direkte Vergleich von DUKX-B11 vs. DG44.

4.1.2 Nährstoffverbrauch und Produktion von Abfallprodukten

Die zwei Hauptnährstoffe der CHO-Zelle sind Glukose und Glutamin. Während Glukose essentiell für die Energiegewinnung der Zelle ist, wird Glutamin in Proteine eingebaut und stellt Stickstoff zur Verfügung. Glukose wird über die Glykolyse zu Laktat abgebaut, Glutamin wird hydrolytisch zu Ammoniak umgewandelt (Koolman & Röehm 2005). Ammoniak beeinflusst vor allem das Wachstum negativ (Hassel et al. 1991, Xing et al. 2008), kann aber auch die Bildung rekombinanter Proteine negativ beeinflussen (Hansen & Emborg 1994, Rajendra et al. 2012, Schneider et.al. 1996). Laktat hat ähnliche Auswirkungen auf CHO-Zellen. Es beeinflusst einerseits das CHO-Wachstum negativ (Lao & Toth 1997). Andererseits erhöht Laktat, vor allem dann wenn der pH-Wert deswegen reguliert werden muss, die Osmolarität. Dies führt zu niedrigeren Antikörperproduktionsraten (Irani et al. 1999).

4.1.3 Glukose, Laktat

In allen HT Versuchen waren die DUKX-B11 Kulturen durch die Glukose im Medium limitiert. Man könnte annehmen, dass durch den rascheren Glukoseverbrauch die Laktat-Werte höher sein müssten als bei DG44 Kulturen. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Laktat-Werte waren sobald die Viabilität abnahm ähnlich hoch. Eine Erklärung

hierfür ist, dass Glutamin zu ca. 25% auch zur Energiegewinnung und somit zur Laktatproduktion beiträgt (Dean & Reddy 2013).

Des Weiteren waren in den beiden Fermentorversuchen leicht höhere Laktatwerte zu messen als im Schüttler. Die Erklärung hierfür liefert das größere Reaktorvolumen, das eine größere Zelldichte und somit mehr Laktat liefernde Zellen ermöglichte. Ein weiteres Ergebnis war der geringe Laktatverbrauch in allen Kulturen. Erklärbar ist dies durch die mit der Zeit abnehmende Verfügbarkeit von NADH, wenn die Laktatwerte bereits sehr hoch sind. Je niedriger das Glukose-Level ist, desto weniger NADH wird produziert. Es kommt kombiniert mit einem niedrigen Redoxpotential zum Abbau von Laktat und zur Produktion von NADH (Nolan & Lee 2011).

Die schädliche Wirkung von Laktat wurde in diesen Experimenten nicht erreicht. In den vier Versuchen war der höchste gemessene Laktatwert bei 2,52 g/L = 22,5 mM. Hemmend wirkt Laktat laut Literatur ab einer Konzentration von 58-60 mM (Lao & Toth 1997, Xing et al. 2008). Solch hohe Werte treten aber auch nur bei fedbatch-Versuchen mit größeren Versuchsvolumina auf, z.B. 5 L Reaktorvolumen (Xing et al. 2008). Meist zielen diese auf eine möglichst lange Laufzeit zur Antikörperproduktion hin (Kim & Lee 2007). Niedrige Laktatlevel von 20 mM können, laut einer Literaturquelle (Lee et al. 2005), sogar förderlich für das Wachstum bzw. eine etwaige Antikörperproduktion sein. Vor allem dann, wenn das Glukoselevel niedrig ist (Lee et al. 2005). Laktat kann, neben Glukose, als eine Kohlenhydratquelle für CHO's und somit als Energielieferant angesehen werden (Tsao et al. 2005), wenn die Effekte der pH-Erhöhung reguliert werden. Dadurch erklärt sich die leichte Abnahme des Laktatlevels am Ende der Batches.

Der etwas schlechtere Glukoseverbrauch für 5xHT Kulturen im Gegensatz zu 1xHT Kulturen lässt sich auf das allgemein schlechtere Wachstum dieser Kulturen zurückführen.

4.1.4 Glutamin, Ammoniak

Der Glutaminverbrauch ist, wie aus den Ergebnissen ersichtlich, für die DG44 Kulturen der limitierende Faktor. Da Glutamin über Glutamat zu Glukose umgebaut werden kann (Newsholme et al. 2003), lassen sich die höheren Zellzahlen und der niedrigere Verbrauch von Glukose durch DG44 gut erklären. Daraus resultiert ein schnellerer Anstieg von Ammoniak als bei DUKX-B11 Kulturen. Insgesamt ist der höchste

gemessene NH_3 Wert $90 \text{ mg/L} = 5,3 \text{ mM}$ nach zehn Tagen ersichtlich. Laut Xing et al. (2008) beginnen die hemmenden Effekte bei 5 mM bis 10 mM NH_3 im Medium aufzutreten (Chen & Harcum 2005). Da diese Konzentrationen in den vier HT Versuchen aber erst sehr spät auftraten, kann hier nicht von einem negativen Einfluss gesprochen werden. Zum Zeitpunkt des Viabilitätsabfalls waren die NH_3 -Werte bei DG44 Kulturen von $60\text{-}70 \text{ mg/L}$ und bei DUKX-B11 Kulturen bei $50\text{-}60 \text{ mg/L}$. Diese befinden sich somit deutlich unter den minimal hemmenden Werten für Ammoniak. Zwischen den NH_3 - Konzentrationen von DUKX-B11 und DG44 gibt es gegen Ende kaum Unterschiede. Um negative Effekte zu bemerken, hätten die Kulturen gefüttert werden müssen, um nicht an Viabilität zu verlieren.

Der erkennbare Unterschied im Glutaminverbrauch von 1xHT und 5xHT DUKX-B11-Kulturen lässt sich durch das generell etwas geringere Wachstum der 5xHT Kultur gut erklären. Weitere Auffälligkeiten gab es für die Glutamin- und Ammoniak-Werte nicht.

4.1.5 Zellzahl, Viabilität und Vergleich der Host Linien

Während der gesamten HT Versuche zeigte sich zwischen den Kulturen ein ähnliches Wachstumsverhalten in der exponentiellen Phase. Hier waren die μ -Werte der DUKX-B11 Kulturen oft höher als die der DG44 Kulturen. Jedoch wuchsen DG44 Kulturen generell etwas besser als DUKX-B11 Kulturen. Die maximalen Zellzahlen und die Viabilität waren fast durchwegs höher als die von DUKX-B11 Kulturen.

Müsste eine Zelllinie gewählt werden, so gibt es bei DUKX-B11 den Vorteil des schnelleren Glukoseverbrauchs, resultierend in einer besseren spezifischen Wachstumsrate in der exponentiellen Phase. Des Weiteren wird durch den langsameren Glutaminverbrauch eine hohe Ammoniumkonzentration erst später erreicht. Auf der anderen Seite zeigten DG44 Kulturen bessere VCCDs. Die Glukose wurde langsamer verarbeitet, woraus ein gemäßigerer Anstieg der Laktatwerte resultierte. Dies könnte einen effektiveren Glc-Metabolismus bedeuten. Leider ist hierzu keine Literatur zu finden, welche dies bestätigt oder widerlegt. Weitere Experimente sind notwendig um den Sachverhalt zu klären.

4.1.6 Vergleich der unterschiedlichen HT Konzentrationen

Es konnte kein positiver Effekt durch erhöhte HT Konzentration beobachtet werden, wie anfangs angenommen. Im Gegenteil zeigten die vier Versuche eine signifikante, wenn auch nur geringe Reduzierung der Wachstumsrate in beiden Host-Zelllinien.

Gegenüber Kulturen mit normalen HT Konzentrationen, erreichten 5xHT Kulturen niedrigere maximale Zellzahlen und die Viabilitätswerte fielen schneller ab. Auch in der Literatur (Fei et al. 2012) finden sich ähnliche Ergebnisse für erhöhte HT Konzentrationen mit schlechteren Wachstumsergebnissen, wenn auch hier leicht höhere Konzentrationen verwendet wurden. Es wurden Konzentrationen von 100 mg/L Hypoxanthin und 20 mg/L Thymidin (Fei et al. 2012) im Vergleich zu diesen Versuchen (Tab. 2) verwendet. Die Toxizität scheint vor allem von zu hohen Thymidin-Konzentrationen auszugehen, welche eine Störung des dTTP-Gleichgewichts bewirkt (Kunz & Kohalmi 1991). Dies resultiert im Zellzyklusarrest und einer Größenzunahme der Zellen (Bergeron 1971, Bradley & Sharkey 1978). Eine Größenzunahme war unter dem Hämozytometer nicht zu erkennen, jedoch kam es in den 5xHT Kulturen zu einer vermehrten Clusterbildung, im Gegensatz zu den anderen Kulturen. Dieses Verhalten kann auf den Thymidin-Stress zurückgeführt werden. Weitere Versuche könnten dies klären.

Tabelle 2: Hypoxanthin- & Thymidin-Konzentrationen in D/H Medium

	D/H	D/H + 1xHT	D/H + 5xHT
Hypoxanthine	2,0 mg/L	13,6 mg/L	68 mg/L
Thymidine	0,36 mg/L	3,9 mg/L	19,5 mg/L

4.2 Adaption an D/H Medium

4.2.1 Zielsetzung

Das Ziel dieses Versuches war die Adaption der zwei DG44 Stämme 2G12 Ori und HB617 an D/H Medium. Diese Zelllinien wuchsen bisher in ProCHO5 (BE12-766Q) Medium in 80 ml T-flasks. Dieses ist ein chemisch definiertes proteinfreies CHO-Medium, welches speziell für die Produktion von rekombinanten Proteinen durch CHOs von Lonza (Schweiz) entwickelt wurde. Die Umstellung erfolgte zur Kostenersparnis, aber auch um einen bessere Vergleichbarkeit zu den anderen IgM-produzierenden Kolonien (alle in D/H Medium) zu erzielen. Es sollte in diesem Versuch auf die Zellzahlen, die Viabilität und die IgM-Produktion geachtet werden.

4.2.2 Vergleich der DG44 Kulturen

Die starken Schwankungen in den gemessenen Zellzahlen sind einerseits auf den Adaptionstress zurückzuführen. Andererseits neigten DG44 Kulturen generell leicht zur Clusterbildung. In DG44 HB617 verursachte die Umstellung des Mediumwechsels auf zwei Tage die starken Zellzahlschwankungen.

Auch wenn ProCHO5 ein nährstoffreicheres Medium ist, und allein gesehen wesentlich besseres Wachstum als in D/H Medium fördert, so ergibt die 1:1 Mischung mit D/H doch die besten Ergebnisse. Zu erklären ist dieses Phänomen, durch die erhöhte Nährstoffkonzentration, die ein Medium für sich genommen nicht erreichen kann. Chen & Harcum (2005) zeigen, dass vor allem die erhöhte Menge der Aminosäuren Threonin, Prolin und Glycin einen positiven Einfluss auf die CHO-Zellen haben kann. Diese AS reduzieren das Abfallprodukt Ammonium, welches den intrazellulären pH-Wert beeinträchtigt (Chen & Harcum 2005). Somit werden die Wachstumsrate und die Viabilität gefördert.

Die IgM-Produktion korreliert für DG44 HB617 gut mit den Zellzahlen. Im 1:1 Gemisch erzielte dieser die höchste Tagesproduktion, im D/H Medium die niedrigste. Eine Erklärung für die doch relativ niedrige IgM-Ausbeute im ProCHO5 Medium könnte die Viabilität sein. Im Vergleich zum 1:1 Medium ist diese nämlich durchwegs geringer, was auf den Adaptionstress im Schüttler zurückzuführen ist. Ähnliche Werte (10-20 pg/c/d) zeigten sich auch während der letzten Tage der Klon Selektion (V. Chromikova, unveröffentlicht)

DG44 2G12 Ori produzierte am meisten IgM in ProCHO5 und am wenigsten im 1:1-Gemisch. Da die durchschnittlichen Zellzahlen das gleiche Schema wie bei DG44 HB617 zeigten, wäre die höchste IgM-Produktion im 1:1-Gemisch zu erwarten gewesen. Dies kann nur als Messungsschwankung gedeutet werden, da bei DG44 2G12 Ori alle drei Produktionswerte sehr nahe beieinander lagen. Auch unterlag DG44 2G12 Ori bereits in der Selektion in ProCHO5 Medium Schwankungen in der IgM-Produktion von 1-5 pg/c/d (V. Chromikova, unveröffentlicht).

Wie aus früheren Boku-internen Versuchen zu erwarten war, lieferte DG44 2G12 Ori durchwegs höhere Zellzahlen als DG44 HB617, dafür verhält es sich für die IgM-Produktion genau umgekehrt, mit deutlich besseren Ausbeuten für DG44 HB617.

4.3 IgM-Zelllinien

4.3.1 Zielsetzung

Alle IgM-Klone wurden aus Schüttler-Kultur inokuliert, es wurden wieder Batches im Schüttler sowie im Fermentor durchgeführt. Die letzten Versuche hatten den Vergleich der IgM-produzierenden Kolonien zum Ziel. Der Unterschied im Wachstum sowie die Antikörperausbeute lagen im Fokus der Beobachtungen. Hierbei spielten Endausbeute und Tagesproduktion die größte Rolle. Aber auch die Viabilität sowie das Verhalten im Schüttler bzw. Fermentor waren relevant.

4.3.2 Vergleich der IgM-Zelllinien

Es zeigte sich auch in diesen Versuchen wieder, ein leicht besseres Wachstum von DUKX-B11 Kulturen. Jedoch ist dieser Trend nur in S6 klar zu sehen, da dieser auch der einzige der drei Versuche ist, in dem alle vier Kulturen bis zum Ende des Batches gemessen werden konnten. DUKX-B11 2G12 GL war die Kultur die in beiden Schüttler Batches am längsten die Viabilität über 70% halten konnte. Dafür war hier die Antikörperausbeute sehr gering mit 15,8-19,3 µg/ml IgM am Versuchsende. DUKX-B11 2G12 Ori lieferte die geringste Menge IgM mit 12,5 µg/ml und einer Tagesproduktion von 1,1 pg/c/d. Die Wachstumsrate war dafür hoch und auch die Viabilität fiel langsamer ab.

DG44 HB617 erzielte in allen Batches die höchste IgM-Ausbeute (61,5-84,9 µg/ml) sowie die beste Produktionsrate (9-24,4 pg/c/d) während der exponentiellen Phase. Dafür zeigte dieser mit Abstand das schlechteste Wachstum. Dies ist wahrscheinlich auf die Selektion mit MTX zurückzuführen, die zwar hunderte von integrierten Inserts bewirken aber auch Instabilität im Karyotyp (Lattenmayer et al. 2007). Je mehr Runden gemacht werden, desto wahrscheinlicher ist dies. Daten von der Entstehung dieser Klonlinie zeigten, dass DG44 HB617 mit 87 Passagen in MTX selektiert wurde (V. Chromikova, unveröffentlicht). Im Gegensatz zu DUKX-B11 2G12 GL der 28 Passagen selektiert wurde (W. Steinfeldner, unveröffentlicht).

Die Unterschiede von S3 zu S6 zwischen der Tagesproduktion und dem Endtiter können auf eine bessere Produktion in der stationären Phase hinweisen, da in dieser Phase die IgM-Produktion generell höher sein soll, als in der log Phase (Dean & Reddy 2013).

Generell ist es möglich, dass die Antikörperproduktionsraten größeren Schwankungen unterliegen, so variiert in der Selektionsphase die Produktion für z.B. DG44 HB617 zwischen 10-40 pg/c/d (V. Chromikova, unveröffentlicht)

Weitere Versuche wären notwendig um die genauen Ursachen der unterschiedlichen Antikörperproduktion und den Wachstumsraten zu ergründen, da es zu 2G12 und HB617 fast keine veröffentlichte Literatur gibt.

Des Weiteren wären Strukturanalysen des IgM-Produkts notwendig, um die korrekte Translation zu bestätigen. Auch kann das Verhältnis von schwerer Kette zu leichter Kette Einfluss auf die Quantität bzw. die Effektivität der IgM-Produktion, nehmen (Schlatte et al. 2005). So wäre es möglich, dass die Produktion von 2G12 noch gesteigert werden könnte.

4.3.3 Kontaminationsproblem

Trotz des Autoklavierens des gesamten Fermentationssystems sowie eines Medium-Steriltests über zwei Tage, kam es in zwei F26-Kulturen, und in F27 in allen Reaktoren, zur Kontamination. Weitere Sicherheitsmaßnahmen waren die Verwendung von thermoplastischen Schläuchen, so konnten Medium-, waste- und Inokulum-Flaschen steril an die Fermentor-Reaktorschläuche geschweißt werden (Sterile TubeFuser IRC, GE Healthcare UK). Die Infektionsgefahr durch die Probenahme wurde durch, bis zur Verwendung in 70%igem Alkohol eingelegte, sterile Spritzen vermindert. Des Weiteren wurden bei jeder Probenahme jeweils 6 ml zuerst verworfen. Vorsichtshalber wurden nach F26 alle Gummidichtungsringe an den Reaktoranschlüssen kontrolliert und ein paar ausgetauscht, weil diese leicht abgenutzt wirkten. Da trotzdem die Kulturen in F27 infiziert waren, wurden abschließend alle Luftfilter auf ihre Funktionalität hin überprüft. Es wurde jedoch kein defekter Filter gefunden (Palltronic Flowstar XC, Pall USA). Wahrscheinlich hatte einer der Probenahme-Schläuche einen Haarriss (Abb. 54) und dadurch wurden die Reaktoren infiziert. Eine Möglichkeit für zukünftige Bioreaktorversuche wäre eine Überprüfung der Dichtheit mit Druckluft.

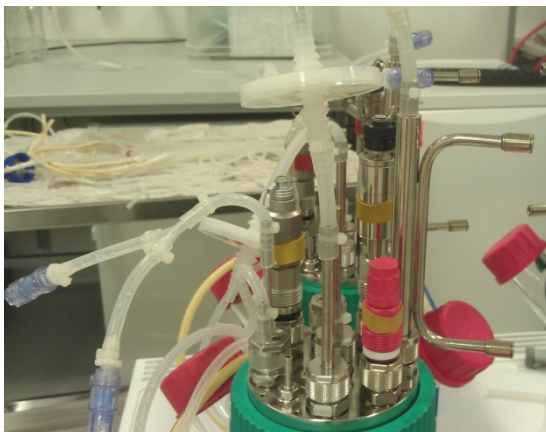


Abbildung 54: Anschlüsse eines Fermentor Bioreaktors; links zu sehen, die blauen Probenahmevertile und die Probenahmeschläuche

5 Referenzen

- Bergeron J. J. M., Different effects of thymidine and 5-fluorouracil 2'-deoxyriboside on biosynthetic events in cultured P815Y mast cells, *Biochemical Journal*, 123(3), 385-390, 1971
- Beckman Coulter, Inc. USA, Schematic of a coulter counter, 2000-2013
https://www.beckmancoulter.com/ucm/idc/groups/public/documents/webasset/glb_bci_075721.jpg, (1.September 2013)
- Bertino J.R., Folate Antagonists, *Antitumor Drug Resistance Handbook of Experimental Pharmacology*, 72, 615-631, 1984
- Bettger W., O'Dell B. L., A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes, *Life Sciences*, 28(13), 1425-1438, 1981
- Bijur G. N., Ariza M. E., Hitchcock C. L., Williams M. V., Antimutagenic and promutagenic activity of ascorbic acid during oxidative stress, *Environmental Molecular Mutagenesis*, 30(3), 339-345, 1997
- Bradley M. O., Sharkey N. A., Mutagenicity of thymidine to cultured Chinese hamster cells, *Nature*, 274(5671), 607-608, 1978
- Burton D. R., Desrosiers R. C., Doms R. W., Koff W. C., Kwong P. D., Moore J. P., Nabel G. J., Sodroski J., Wilson I. A., Wyatt, R. T., HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem, *Nature immunology*, 5(3), 233-236, 2004
- Cacciatore J. J., Chasin L. A., Leonard, E. F., Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system, *Biotechnology advances*, 28(6), 673-681, 2010
- Chen P., Harcum S. W., Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells, *Journal of biotechnology*, 117(3), 277-286, 2005
- Chen P., Harcum S. W., Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells, *Metabolic Engineering*, 8(2), 123-132, 2006

- Chun B. -H., Kim J. -H., Lee H. -J., Chung N., Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture, *Bioresource Technology*, 98(5), 1000-1005, 2007
- Dean J., Reddy P., Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), 1735-1747, 2013
- Dettmer U., Folkerts M., Kächler E., Sönnichsen A., Intensivkurs Biochemie, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 1. Auflage, 2005
- Dutton R. L., Scharer J. M., Moo-Young M., Descriptive parameter evaluation in mammalian cell culture, *Cytotechnology*, 26(2), 139-152, 1998
- Doyle A. & Griffiths J. B., *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd, 1.Auflage, 3-6, 1998
- Eagle H., Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture, *Science*, 122(3168), 501-504, 1955
- Flintoff W. F., Davidson S. V., Siminovitch L., Isolation and partial characterization of three methotrexate-resistant phenotypes from Chinese hamster ovary cells, *Somatic Cell Genetics*, 2(3), 245-261, 1976
- Florin L., Lipske C., Becker E., Kaufmann H., Supplementation of serum free media with HT is not sufficient to restore growth properties of DHFR^{-/-} cells in fed-batch processes - Implications for designing novel CHO-based expression platforms, *Journal of Biotechnology*, 152(4), 189-193, 2011
- Gandor C., Leist C., Fiechter A., Asselbergs F. A. M., Amplification and expression of recombinant genes in serum-independent Chinese hamster ovary cells, *FEBS Letter*, 377, 290-294, 1995
- Glacken M.W., Fleischaker R.J., Sinskey A.J., Mammalian cell culture: engineering principles and scale-up, *Trends in Biotechnology*, 1(4), 102-108, 1983
- Glassy M. C., Tharakan J. P., Chau P. C., Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production, *Biotechnology and bioengineering*, 32(8), 1015-1028, 1988

- Grillberger L., Kreil T. R., Nasr S., Reiter M., Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells, *Biotechnology Journal*, 4(2), 186-201, 2009
- Hansen H. A., Emborg C., Influence of ammonium on growth, metabolism, and productivity of a continuous suspension Chinese hamster ovary cell culture, *Biotechnology progress*, 10(1), 121-124, 1994
- Hazardous Substances Data Bank (HSDB), U.S. National Library of Medicine's TOXNET system (27. November 2012), <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~tHVlrt:1>> (19. Mai 2013)
- Helgason C. D., Miller C. L., Basic Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press, 3.Auflage, vol.290, 183, 2005
- Irani N., Wirth M., van den Heuvel J., Wagner R., Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction, *Biotechnology and bioengineering*, 66(4), 238-246, 1999
- Jordan M., Eppenberger H. M., Sucker H., Widmer F., Einsele A., Interactions between animal cells and gas bubbles: The influence of serum and pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface, *Biotechnology and bioengineering*, 43(6), 446-454, 1994
- Josting A., Diehl V., Engert A., Methotrexat, *Der Onkologe*, 4(10), 974-985, 1998
- Jursik C., Prchal M., Grillari-Voglauer R., Drbal K., Fuertbauer E., Jungfer H., Albert W. H., Steinhuber E., Hemetsberger T., Grillari J., Stockinger H., Katinger H., Large-scale production and characterization of novel CD4⁺ cytotoxic T cells with broad tumor specificity for immunotherapy, *Molecular Cancer Research*, 7(3), 339-353, 2009
- Keane J. T., Ryan D., Gray P. P., Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells, *Biotechnology and bioengineering*, 81(2), 211-220, 2003

- Kim E. J., Kim N. S., Lee G. M., Development of a serum-free medium for the production of humanized antibody from chinese hamster ovary cells using a statistical design, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 34(10), 757-761, 1998
- Kim S. H., Lee G. M., Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44), *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), 659-665, 2007
- Koolman J., Röehm K. H., Color atlas of biochemistry, Thieme, 2nd Edition, 2005
- Kunert R., The Neutralizing Anti-HIV Antibody 2G12, Kapitel aus *Anticarbohydrate Antibodies*, Springer Vienna, 147-160, 2012
- Kunert R., Wolbank S., Chang M., Voglauer R., Borth N., Katinger H., Control of Key Parameters in Developing Mammalian Production Clones, *BioProcess Technology*, 2(6), 54-59, 2004
- Kunz B. A., Kohalmi S. E., Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels, *Annual review of genetics*, 25(1), 339-359, 1991
- Schlatter S., Stansfield S. H., Dinnis D. M., Racher A. J., Birch J. R., James D. C., On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells, *Biotechnology progress*, 21(1), 122-133, 2005
- Latscha H. P., Kazmaier U., Klein H. A., *Chemie für Biologen*, Springer DE, 2. Auflage, 2004
- Lattenmayer C., Loeschel M., Steinfeldner W., Trummer E., Mueller D., Schriebl K., Vorauer-Uhl K., Katinger H., Kunert R., Identification of transgene integration loci of different highly expressing recombinant CHO cell lines by FISH, *Cytotechnology*, 51(3), 171-182, 2006
- Lattenmayer C., Trummer E., Schriebl K., Vorauer-Uhl K., Mueller D., Katinger H., Kunert, R., Characterisation of recombinant CHO cell lines by investigation of protein productivities and genetic parameters. *Journal of biotechnology*, 128(4), 716-725, 2007

- Lee E. U., Roth J., Paulson J. C., Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase, *Journal of biological chemistry*, 264(23), 13848-13855, 1989
- Lee J. C., Chang H. N., Oh D. J., Effects of supplementation of various medium components on Chinese hamster ovary cell cultures producing recombinant antibody, *Cytotechnology*, 47(1-3), 37-49, 2005
- Lee J. S., Park H. J., Kim Y. H., Lee G. M., Protein reference mapping of dihydrofolate reductase-deficient CHO DG44 cell lines using 2-dimensional electrophoresis, *Proteomics*, 10(12), 2292-2302, 2010
- Lao M., Toth D., Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture, *Biotechnology progress*, 13(5), 688-691, 1997
- McBurney M. W., Whitmore G. F., Mechanism of growth inhibition by methotrexate, *Cancer Research*, 35(3), 586-90, 1975
- McKee T., McKee J. R., *Biochemistry: the molecular basis of life*, Oxford University Press, 3rd Edition, 2002
- Michiels J. -F., Barbau F., De Boel S., Dessy S., Agathos S. N., Schneider Y. -J., Characterisation of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation, *Process Biochemistry*, 46(3), 671-681, 2011
- Myers C. E., Lippmann M. E., Elliot H. M., Chabner B. A., Competitive protein binding assay for methotrexate, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9), 3683-3686, 1975
- Newsholme P., Lima M. M. R., Procopio J., Pithon-Curi T.C., Doi S.Q., Bazotte R.B., Curi R., Glutamine and glutamate as vital metabolites, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(2), 153-163, 2013
- Newsholme P., Procopio J., Lima, M. M. R., Pithon-Curi, T. C., Curi R., Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function, *Cell biochemistry and function*, 21(1), 1-9, 2003

- Nolan R. P., Lee K., Dynamic model of CHO cell metabolism, *Metabolic Engineering*, 13(1), 108-124, 2011
- Ochi T., Otsuka F., Takahashi K., Ohsawa M., Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese hamster cells, *Chemico-Biological Interactions*, 65(1), 1-14, 1988
- Pantophlet R. & Burton D. R., GP120: Target for Neutralizing HIV-1Antibodies, *Annual Revue Immunology*, 24, 739-769, 2006
- Puck T. T. & Kao F. -T., Genetics of somatic mammalian cells. V. Treatment with 5-bromodeoxyuridine and visible light for isolation of nutritionally deficient mutants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 58(3), 1227-1234, 1967
- Puck T. T., Cieciura S. J., Robinson A., Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects, *Journal of experimental medicine*, 108(6), 945-956, 1958
- Rajendra Y., Kiseljak D., Baldi L., Hacker D. L., Wurm F. M., Reduced glutamine concentration improves protein production in growth-arrested CHO-DG44 and HEK-293E cells, *Biotechnology letters*, 34(4), 619-626, 2012
- Schmitz S., *Der Experimentator Zellkultur*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2.Auflage, 108, 2009
- Schneider M., Marison I. W., von Stockar U., The importance of ammonia in mammalian cell culture, *Journal of Biotechnology*, 46(3), 161-185, 1996
- Schütt C. & Bröcker B., *Grundwissen Immunologie*, Springer Verlag, 3.Auflage, 10-12, 2011
- Shiao Y. J., Vance J. E., Evidence for an ethanolamine cycle: differential recycling of the ethanolamine moiety of phosphatidylethanolamine derived from phosphatidylserine and ethanolamine, *Biochemical Journal*, 310(2), 673-679, 1995

- Sinacore M. S., Charlebois T. S., Harrison S., Brennan S., Richards T., Hamilton M., Scott S., Brodeur S., Oakes P., Leonard M., Switzer M., Anagnostopoulos A., Foster B., Harris A., Jankowski M., Bond M., Martin S., Adamson S. R., CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins, *Biotechnology and Bioengineering*, 52(4), 518-528, 1996
- Smith A., Datta S. P., Smith G. H., Campbell P. N., Bentley R., McKenzie H. A., Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology, Oxford University Press (OUP), revised edition, 241, 2000
- Tjio H. J. & Puck T. T., Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture, *Journal of experimental medicine*, 108(2), 259-268, 1958
- Tsao Y. S., Cardoso A. G., Condon R. G. G., Voloch M., Lio P., Lagos J. C., Kearns B.G., Liu Z., Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism, *Journal of biotechnology*, 118(3), 316-327, 2005
- Urlaub G. & Chasin, L.A., Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 4216-4220, 1980
- Urlaub G., Käs E., Carothers A. M., Chasin L. A., Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells, *Cell*, 33(2), 405-412, 1983
- Urlaub G., Mitchell P. J., Käs E., Chasin L. A., Funanage V. L., Myoda T. T., Hamlin J., Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions, *Somatic cell and molecular genetics*, 2(6), 555-566, 1986
- Xing Z., Li Z., Chow V., Lee S. S., Identifying inhibitory threshold values of repressing metabolites in CHO cell culture using multivariate analysis methods, *Biotechnology progress*, 24(3), 675-683, 2008
- Yandell C., Lawson J., Butler I., Wade B., Sheehan A., Grosvenor S., Goddard C., Simula T., An analogue of IGF-I, *Bioprocess International*, 2(3), 2-7, 2004

- Yoon S. -O., Kim M. -M., Park S. -J., Kim D., Chung J., Chung A. -S., Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI3-K/Akt pathways, *FASEB Journal*, 16(1), 111–113, 2002
- Zhang J., Robinson D., Salmon P., A novel function for selenium in biological system: Selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production, *Biotechnology and Bioengineering*, 95(6), 1188-1197, 2006
- Zhang Z., Al-Rubeai M., Thomas C. R., Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells, *Enzyme and Microbial Technology*, 14(12), 980-983, 1992

6 Anhang

6.1 Zusätzliche Grafiken

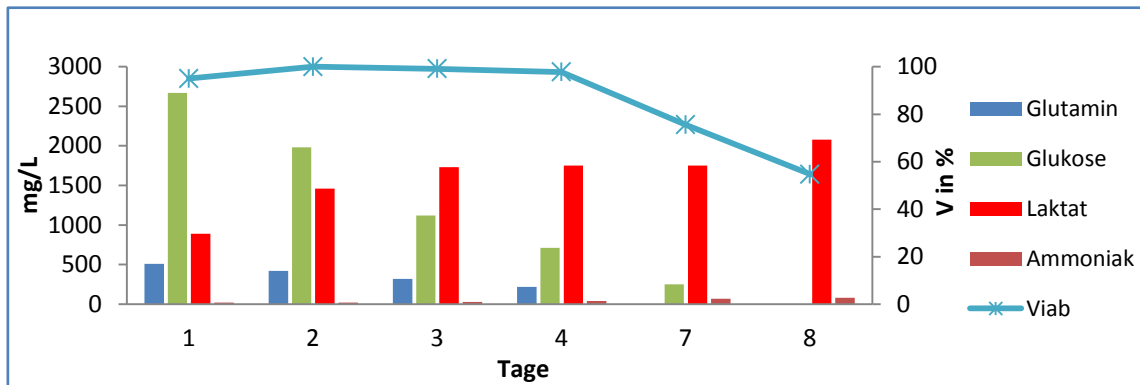


Abbildung 57: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DUKX-B11 im 1xHT Medium (Versuch S1)

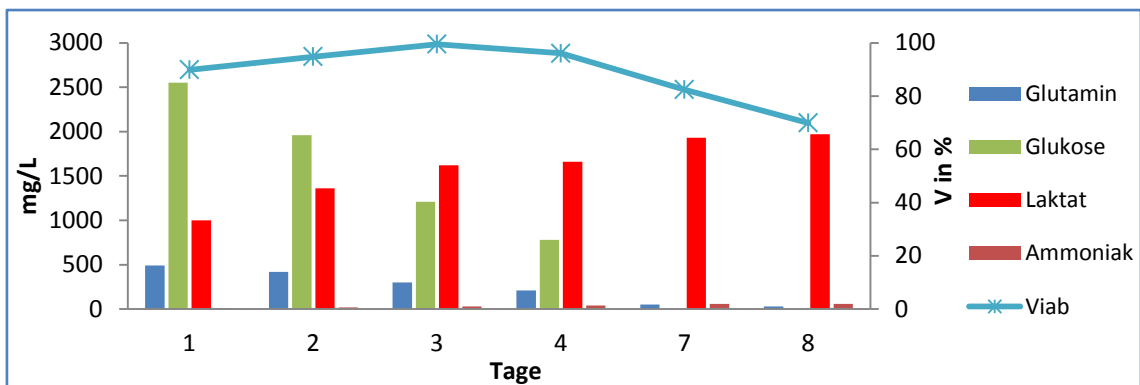


Abbildung 55: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DG44 im 1xHT Medium (Versuch S1)

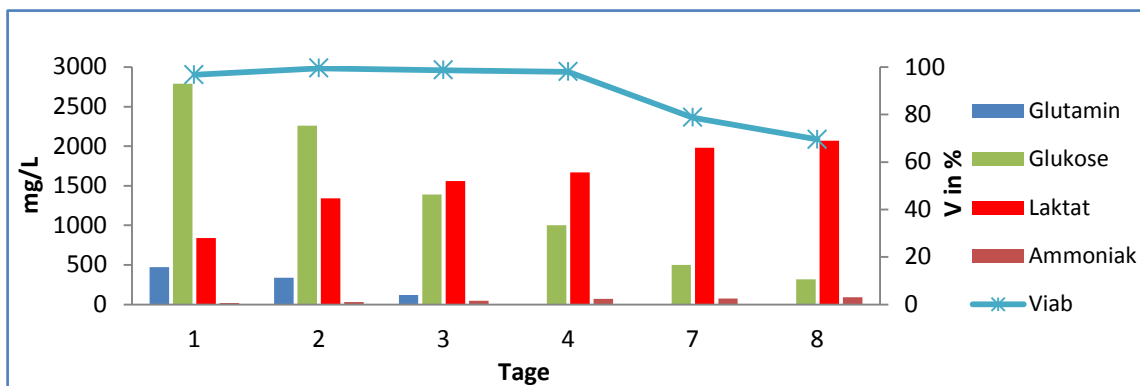


Abbildung 56: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DUKX-B11 im 5xHT Medium (Versuch S1)

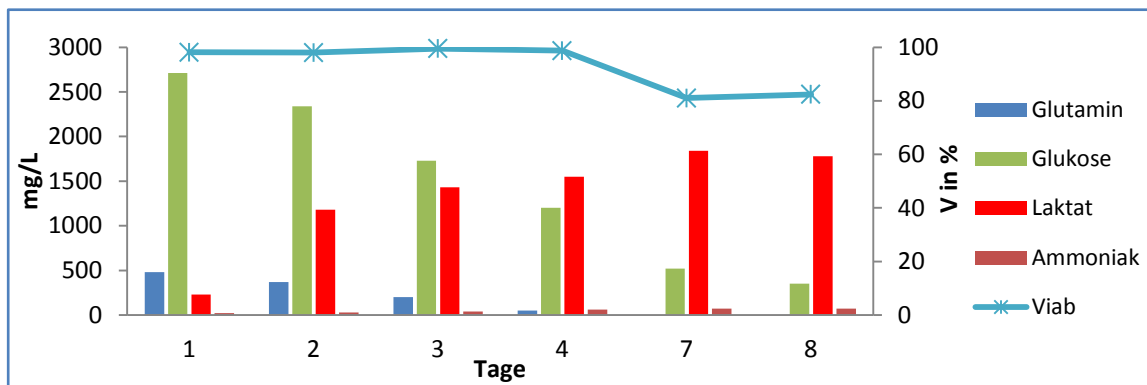


Abbildung 58: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DG44 im 5xHT Medium (Versuch S1)

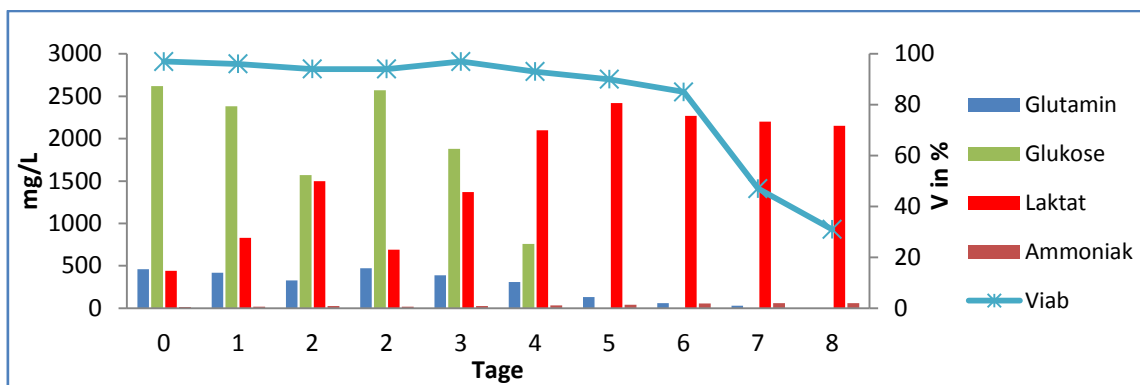


Abbildung 59: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DUKX-B11 im 1xHT Medium (Versuch F25)

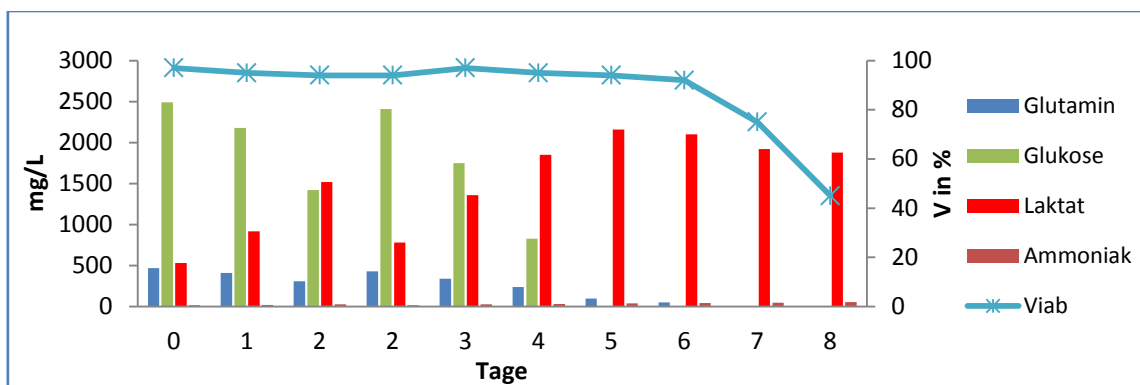


Abbildung 60: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DUKX-B11 im 5xHT Medium (Versuch F25)

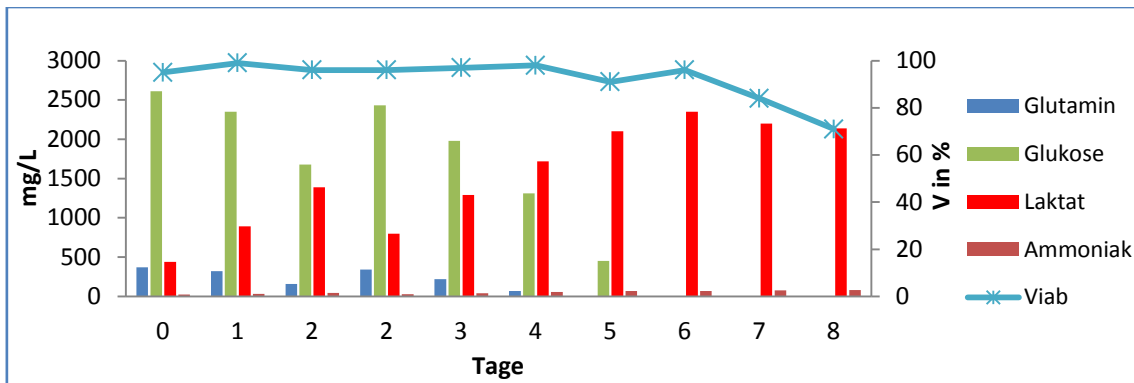


Abbildung 61: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DG44 im 1xHT Medium (Versuch F25)

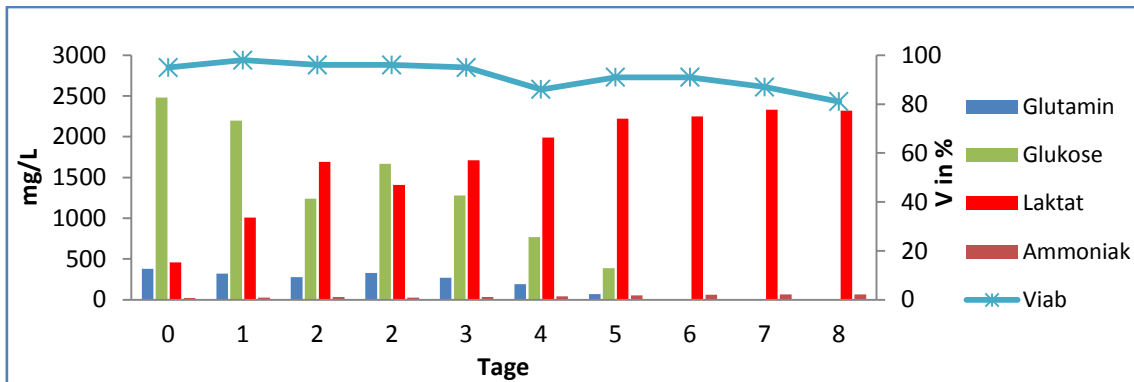


Abbildung 62: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DG44 im 1xHT Medium (Versuch F25)

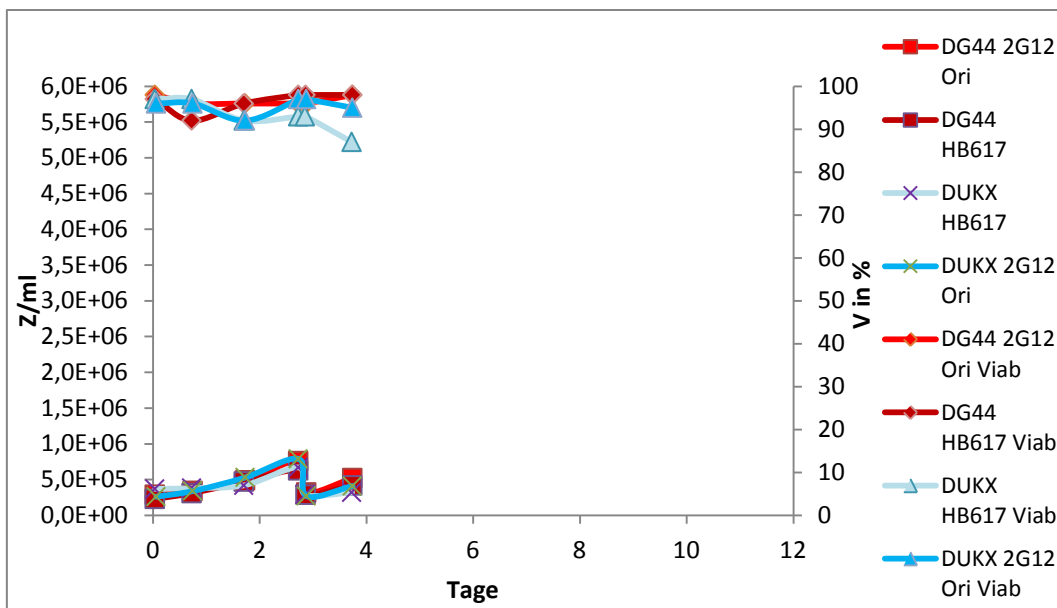


Abbildung 63: Zellzahl und Viabilität rekombinanter Zelllinien (Versuch F27)

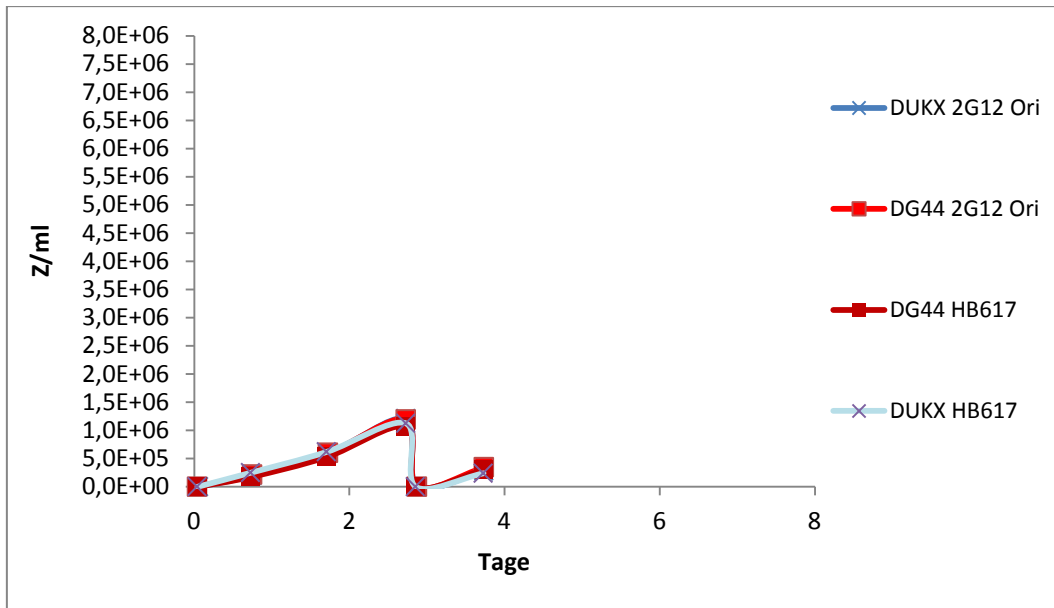


Abbildung 64: Viable kumulierte Zellzahl rekombinanter Zelllinien (Versuch F27)

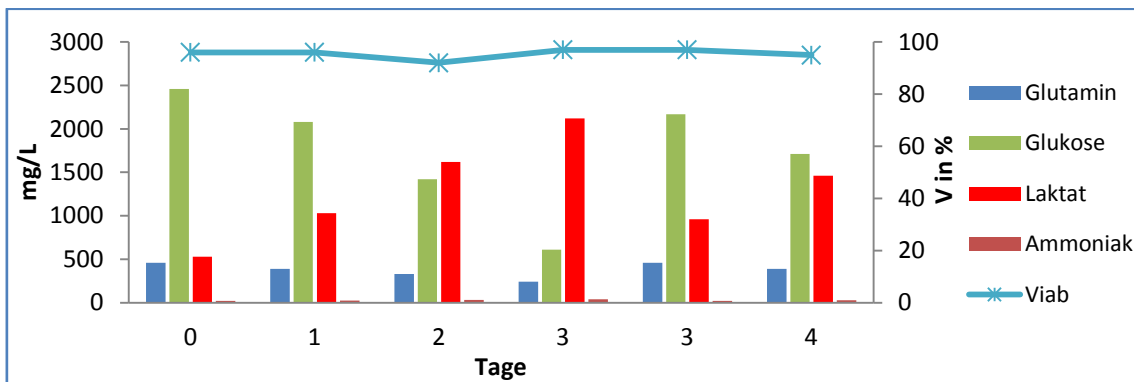


Abbildung 65: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DUKX-B11 2G12 Ori (Versuch F27)

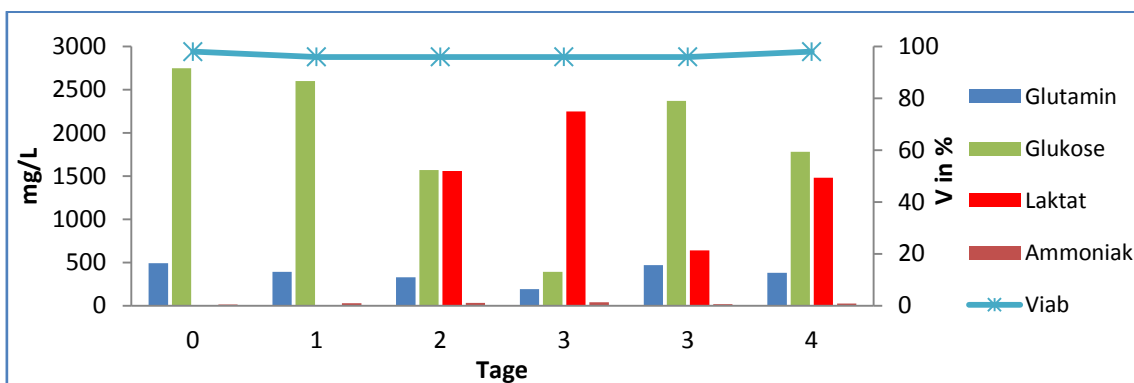


Abbildung 66: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DG44 2G12 Ori (Versuch F27)

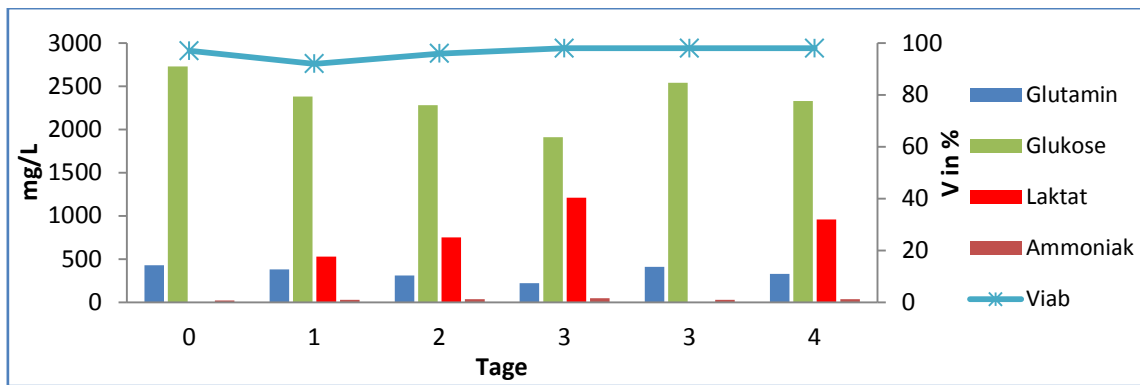


Abbildung 67: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DG44 HB617 (Versuch F27)

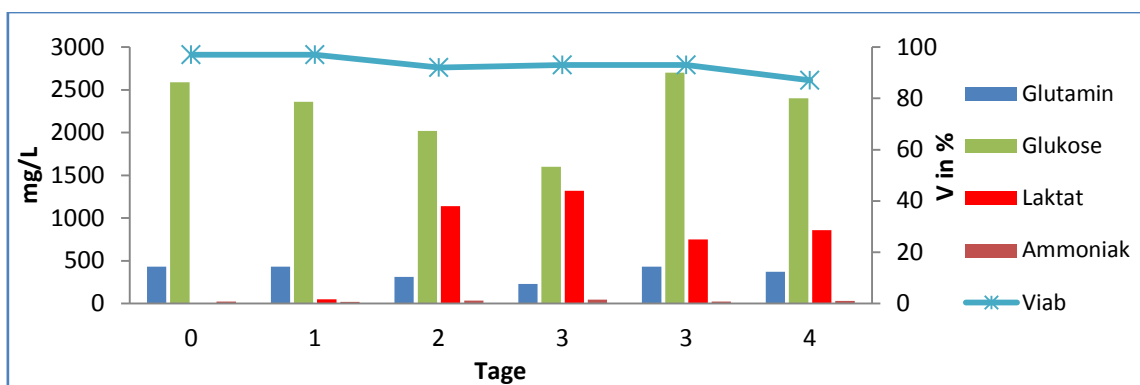


Abbildung 68: Nährstoffverbrauch und Abbauprodukte DUKX-B11 HB617 (Versuch F27)

6.2 Abkürzungsverzeichnis

- 1xHT= einfache, „normale“ Konzentration von HT
- 5xHT= fünffache Konzentration von HT
- AS= Aminosäure
- Batch= Versuchsablauf von Zellen in Medium
- CHO= Chinese Hamster Ovary
- D/H= DMEM/ HAM's F12
- *dhfr*= Dihydrofolat-Reduktase Gen
- dTTP= Desoxythymidintriphosphat
- ELISA= Enzym Linked Immunosorbent Assay
- Endtiter= Endkonzentration an Antikörper
- Fedbatch= feed batch, hier wird nach ca. 6 Tagen der Kultivierung meist eine große Menge der Hauptnährstoffe Gln und Glc nach „gefüttert“
- Glc= Glukose
- Gln= L-Glutamin
- HT= Hypoxanthin und Thymidin
- IgM= Immunoglobulin M
- Lac= Laktat
- MTX= Methotrexat
- NH₄= Ammoniak
- Repbatch= repeated batch, ein Versuchsablauf mit Medium Wechsel
- THF= Tetrahydrofolat
- VCCD= viable cumulated cell days

6.3 Zusammenfassung

Die Chinese Hamster Ovary (CHO-) Zelle ist eines der wichtigsten und das am häufigsten verwendete Expressionssystem für rekombinante Antikörper und andere Proteine. Aufgrund des starken Wachstums in diesem biopharmazeutischen Bereich, sind Optimierungen im Material und den Methoden äußerst wichtig. Diese Arbeit greift Themen wie die Verwendung des Mediums, die Zusätze und die Prozessparameter auf, behandelt aber auch Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Die Arbeit bestand aus drei Teilbereichen: Erstens, ein Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen eines bestimmten Medienzusatzes. Zweitens, die Adaptierung von zwei CHO-Zelllinien an ein neues Medium, und drittens die Produktion des Antikörpers IgM von verschiedenen CHO-Zelllinien. In all diesen Versuchen wurde das Wachstumsverhalten in den unterschiedlichen Umgebungen verglichen.

6.4 Summary

Chinese hamster ovary cells (CHO-) are one of the most important and widely used expression systems for recombinant antibody and protein production. Due to the growing needs in biopharmaceutical research, optimisations are important. This diploma thesis is about such optimisations in media, supplements and process parameters. It is structured in three major partitions. First an experiment with a supplement of different concentrations. Second the adaption of the CHO lines to a new media and third the production of IgM antibodies. Growth rate, viability and IgM production rate were the most important values.

6.5 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	David Keiler
Wohnsitz	Meissauergasse 2A/3/5
Kontakt	Telefon: +43 (0)650 707 50 50
Geburtsdatum, -ort	15.05.1987 Wien/Österreich
Familienstand	ledig
Staatsbürgerschaft	Österreich

Bildung

1997-2005	Bundesrealgymnasium Bernoullistrasse in Wien
seit 2005-2008	Studium der Biologie (A437) , an der Hauptuniversität Wien.
seit 2007	Mitbelegung an der Medizinischen Universität Wien
seit 2008	Studium der Mikrobiologie und Genetik (A441) , an der Hauptuniversität Wien
seit 2008	Mitbelegung an der Universität für Bodenkultur Wien
seit 2012- 2013	Diplomarbeit an der Universität für Bodenkultur, Universität Wien

Berufliche Tätigkeiten/Praktika

Oktober 2008	1-monatiges Praktikum in der Biobank des AKH Wien Medizinische Universität Wien Allgemeines Krankenhaus - KIMCL Währinger Gürtel 18-20, 1090 Wien
Februar 2012- Dezember 2012	Freiwilliger Mitarbeiter am Institut für angewandte Mikrobiologie, Arbeitsgruppe Kunert