

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fachbereich Naturwissenschaftliche Technik

**Etablierung eines Prozesses zur Kultivierung, Abtrennung und
Zellyse zur Untersuchung von Proteininteraktionen**

Diplomarbeit

im Studiengang Biotechnologie

angefertigt an der Technischen Universität Hamburg-Harburg
im Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik

vorgelegt von
Martin Schaletzky
Hamburg-Bergedorf
am 15.12.2009

Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)
Priv. Doz. Dr. Ing. Ralf Pörtner (TUHH, Institut
für Bioprozess- und Biosystemtechnik)

Danksagungen

Bedanken möchte mich bei Prof. Dr. Oliver Ullrich für die Betreuung meiner Diplomarbeit und dafür, dass er mein Interesse an der Zellkulturtechnik geweckt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Priv. Doz. Dr. Ing. Ralf Pörtner für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik ausführen zu dürfen und die Betreuung der Diplomarbeit.

Besonderen Dank schulde ich Master of Science Oscar Platas Barradas für seine engagierte Betreuung, seine stete Diskussionsbereitschaft und die vielen hilfreichen Anregungen, die er mir im Laufe der Diplomarbeit gegeben hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Christiane Göpfert, die mir viele interessante und hilfreiche Anregungen gegeben hat, sowie bei Kerstin Michael, die mir im Labor mit ihrer großen Erfahrung stets zur Seite stand.

Ferner möchte ich mich bei Stefanie Meyer, Susanne Rohn, Linh Da Minh Phan und Berkan Ünal für die schöne und lustige Zusammenarbeit bedanken.

Außerdem möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die Hilfsbereitschaft und die ausgeglichene und schöne Atmosphäre bedanken.

Außerdem wollte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Telomer- und Stammzellbiologie am UKE bedanken, allen voran bei Henning Sievert und Michael Preukschas für die nette Zusammenarbeit und die vielen wichtigen Informationen, die sie mir gegeben haben.

Ich danke meiner Freundin Christina Maria Klein für die Unterstützung und den Rückhalt.

Danken wollte ich auch meiner Familie, allen voran meiner Mutter Agnes Schaletzky, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium ermöglichte.

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Chronische myeloische Leukämie	5
2.2	Medikamentöse Therapie mit Imatinib	6
2.3	Potentielle Zielstrukturen für kombinatorische Therapieansätze	7
2.4	Aufreinigung von eIF5A und eIF5A-2 mittels TAP-Tag	9
2.5	Tierische Zellkulturprozesse	10
2.5.1	Charakteristika tierischer Zellen	10
2.5.2	Mediumanforderungen	11
2.5.3	Metabolismus tierischer Zellen	12
2.5.4	Apoptose und Nekrose	13
2.6	Kultivierungssysteme für tierische Zellen	15
2.6.1	Statische Kultivierungssysteme	15
2.6.2	Dynamische Kultivierungssysteme	15
2.6.2.1	Rührkesselbioreaktor	16
2.7	Betriebsweisen von Bioreaktoren	17
2.7.1	Satz-Betrieb (Batch)	17
2.7.1.1	Typischer Wachstumsverlauf eines Batch-Ansatzes	18
2.7.2	Zulauf-Satz-Betrieb (Fed-Batch)	19
2.7.3	Kontinuierlicher Betrieb ohne Zellrückhaltung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Aseptische Arbeitstechnik	21
3.2	Zelllinien	21
3.3	Medium	21
3.4	Zufütterungsmedium (Fed-Batch)	22
3.5	Working Cell Bank	22
3.6	Auftauen von Zellen	23
3.7	Stammhaltung	23
3.8	Vorkultur	23
3.9	Zelldichte und Viabilität	23
3.10	Spezifische Wachstumsrate μ	24
3.11	Verdopplungszeit t_d	25
3.12	Glukose- und Laktatkonzentration c_{Gik} und c_{Lak}	25
3.13	Spezifische Glukoseverbrauchsrate q_{Gik}	26

3.14	Spezifische Laktatbildungsrate q_{Lak}	26
3.15	Zählreihen.....	26
3.16	Maximale Zelldichte in einer T-Flasche.....	27
3.17	Lysispuffer.....	27
3.18	Bioreaktoren.....	28
3.18.1	Vario 1000.....	28
3.18.2	Biostat B.....	28
3.18.3	Temperierung.....	29
3.18.4	Begasung.....	30
3.18.5	Durchmischung.....	31
3.18.6	pH-Messung und Regelung.....	31
3.18.7	$p\text{O}_2$ -Messung und Regelung.....	31
3.18.8	Inbetriebnahme der Bioreaktoren.....	32
3.18.9	Druckhaltetest.....	33
3.18.10	Sterilisation.....	33
3.18.11	Sterillauf.....	34
4	Kultivierungsversuche.....	35
4.1	Vorversuche im Vario 1000.....	35
4.1.1	Fed-Batch.....	35
4.1.2	Kontinuierlicher Betrieb.....	38
4.1.2.1	Versuch mit 100 ml Kulturvolumen.....	39
4.1.2.2	Versuch mit 400 ml Kulturvolumen.....	42
4.2	Hauptversuch im Biostat B.....	44
4.2.1	Batch-Prozess.....	44
4.2.2	Zellernte und Zellyse.....	46
5	Ergebnisse und Diskussion.....	47
5.1	Zählreihen.....	47
5.2	Maximale Zelldichte in einer T-Flasche.....	53
5.3	Vorversuche im Vario 1000.....	56
5.3.1	Fed-Batch.....	56
5.3.2	Kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml.....	64
5.3.2.1	Viabilitätsbestimmung der gelagerten Zellen.....	69
5.3.3	Kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml.....	72
5.3.3.1	Viabilitätsbestimmung der gelagerten Zellen.....	77

5.4	Fazit aus den vorangegangenen Versuchen.....	81
5.5	Hauptversuch.....	83
5.5.1	Batch im Biostat B.....	83
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	90
6.1	Zusammenfassung.....	90
6.2	Ausblick.....	91
7	Literaturverzeichnis.....	92
8	Anhang.....	94
8.1	Symbole und Formelzeichen.....	94
8.2	Abkürzungen.....	95
8.3	Materialien und Geräte.....	97
8.4	Chemikalien.....	98
8.5	Kultivierungsdaten.....	99

1 Einleitung

In der Medizin werden proteomische Untersuchungen schon seit einiger Zeit zur genaueren Erforschung unterschiedlichster Krebserkrankungen eingesetzt. Die Medizin erhofft sich dadurch tiefere Einblicke in die molekularen Zusammenhänge von Krebserkrankungen.

Unter Proteomik versteht man die umfassende Analyse des Proteoms, der Gesamtheit aller Proteine eines Organismus. Das Translatom, die Ausstattung an Proteinen unter bestimmten Bedingungen fällt ebenfalls unter den Begriff Proteomik. In der Proteomforschung geht es neben der Funktions- und Expressionsanalyse von Proteinen auch darum, Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu finden. Die dabei auftretenden Protein-Protein-Interaktionen können wichtige Informationen über die Funktion des zu untersuchenden Proteins liefern, mit denen Rückschlüsse auf zelluläre Stoffwechselwege und Regulationskaskaden gezogen werden können, an denen das Protein beteiligt ist (1).

Da das Proteom ein dynamisches System darstellt und auf sich ändernde Umweltbedingungen sensibel reagiert, lassen sich durch den Vergleich von Proteinmuster verschiedener Zustände Veränderungen in Bezug auf die Expression einzelner Proteine feststellen und quantitativ auswerten. So können beispielsweise Proteinmuster von Krebszellen, oftmals werden hierbei homogene Zellpopulationen (Krebszelllinien) verwendet, die *in vitro* einerseits mit einem Wirkstoff behandelt werden und andererseits unbehandelt bleiben, miteinander verglichen und analysiert werden. Die Präsenz oder das Fehlen bestimmter Proteine in der Gesamtheit aller Proteine kann interessante Hinweise auf den Wirkmechanismus des Medikaments bzw. neue Ansätze für die Therapie einer Krankheit liefern. Mithilfe der Proteomforschung sind auf diesem Weg schon viele klinisch relevante Proteine identifiziert worden. Sind solche Proteine einmal identifiziert, müssen sie genauer erforscht werden. Um genauere Untersuchungen mit einem Zielprotein durchführen zu können muss dieses in ausreichender Menge und in möglichst reiner und biologisch aktiver Form vorliegen (2).

Grundsätzlich bieten sich für die Produktion klinisch relevanter Proteine verschiedene Expressionssysteme an, wie z.B. Bakterien, Hefen oder tierische Zellen. Tierische Zellen eignen sich besonders dann, wenn man daran interessiert ist, dass die Zielproteine bei ihrer Entstehung richtig gefaltet und möglichst korrekt glykosiliert

werden sollen, bzw. auch dann, wenn man an zellspezifischen Interaktionspartnern wie z.B. Proteinen aus dem Proteom des Expressionssystems interessiert ist (1).

Die Zellkulturtechnik bietet in diesem Zusammenhang verschiedene Möglichkeiten (Kultivierungssysteme) an, über die tierische Zellen unter möglichst optimalen Wachstumsbedingungen vermehrt werden können. So können tierische Zellen beispielsweise mithilfe statischer Kultivierungssysteme z.B. in Zellkulturflaschen oder mithilfe von einfachen dynamischen Systemen wie Schüttelkolben oder Roller bottles in Brutschränken herangezüchtet werden. Diese Möglichkeiten eignen sich für die Herstellung kleinerer Zellmengen, nicht jedoch wenn es darum geht größere Zellmengen herzustellen.

Wenn es darum geht größere Zellmengen herzustellen, ist es erforderlich in größere Systeme wie z.B. Bioreaktoren überzugehen. Grundsätzlich stehen für die Produktion tierischer Zellen unterschiedliche Bioreaktortypen und Betriebsweisen zur Verfügung. In Abhängigkeit der charakteristischen Eigenschaften und Wachstumsbedingungen der zu kultivierenden Zellen und der prozessspezifischen Bedingungen, muss ein geeigneter Bioreaktor und eine Betriebsweise ausgewählt werden, die den gestellten Anforderungen an den Prozess gerecht werden (3).

Hintergrund

Die Diplomarbeit entstand in Zusammenarbeit mit dem Labor für Systembiologie und molekulare Onkologie (Arbeitsgruppe Telomer- und Stammzellbiologie) des universitären Cancer Center Hamburg (UCCH), das zum Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) gehört und dem Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik an der Technischen Universität in Hamburg-Harburg.

Das UKE gehört zusammen mit anderen Partnern einem Konsortium an, das im Rahmen eines gemeinsamen interdisziplinären Forschungsprojekts, neuartige medikamentöse Therapieansätze in Bezug auf die chronische myeloische Leukämie (CML) entwickeln soll.

Bislang gibt es keinen medikamentösen Therapieansatz, der zu einer Heilung dieser Krebserkrankung führen würde. Deshalb wird nach neuen potentiellen Zielsubstanzen gesucht, die zu einer verbesserten Therapie dieser Krankheit führen könnten. In diesem Zusammenhang ist es einer Forschungsgruppe des UKE gelungen, mithilfe proteomischer Untersuchungen, neuartige Zielsubstanzen aufzuspüren. Zwei potentielle Zielstrukturen (intrazelluläre Proteine), die in diesem

Zusammenhang näher untersucht werden sollen, sind die beiden Isoformen des eukaryontischen Initiationsfaktors, 5A und 5A-2 (eIF5A und eIF5A-2). Diese intrazellulär wirksamen Translationsfaktoren, spielen eine wichtige Funktion in Bezug auf die Zellproliferation und kommen in entarteten, leukämischen Zellen, die sich unkontrolliert vermehren in besonders hohen Konzentrationen vor (4).

Diese Zielstrukturen könnten möglicherweise einen neuen Therapieansatz für die CML liefern und sollen deshalb im Detail erforscht werden. Neben den Zielproteinen selbst sollen des Weiteren aber auch Proteininteraktionen dieser Zielsubstanzen untersucht werden. Dazu ist es erforderlich die Zielproteine bzw. die dabei entstehenden Proteinkomplexe in ausreichender, möglichst reiner und nativer Form herzustellen und zu gewinnen.

Die dafür notwendigen Expressionssysteme wurden mithilfe gentechnischer Methoden am UKE entwickelt. Es handelt sich hierbei um murine CML-positive pro-B Suspensionszellen (BA/F3 p210), in die jeweils die cDNA eines der Zielproteine (eIF-5A und eIF-5A2) sowie, die damit fusionierte DNA für den sog. „TAP-Tag“ (Tandem-Affinity-Purification-Tag) stabil transfiziert wurden. Mithilfe des „TAP-Tags“ vereinfacht sich die spätere Aufreinigung der Zielstrukturen (Proteinkomplexe) aus dem Gemisch aller anderen Proteine wesentlich.

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Zellkultur-Prozess für die Zellproduktion von Suspensionszellen (BA/F3 p210 und BA/F3 p210 eIF5A-2) entwickelt und etabliert werden, der es möglich machen sollte, reproduzierbare Kultivierungen durchzuführen. Die vom UKE geforderte Zellzahl lag dabei bei 10^{10} Zellen. Die Zellen sollten sich bei Abbruch der Kultivierung in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und eine möglichst hohe Viabilität aufweisen. Bei den Zielproteinen eIF5A und eIF5A-2 handelt es sich Proteine, die intrazellulär vorliegen.

Im Vorfeld der Kultivierungsversuche sollte das Wachstumsverhalten (u.a. die Wachstumsrate, spezifische Glukoseverbrauchsrate, spezifische Laktatbildungsrate) der entsprechenden Zelllinien mithilfe statischer T-Flaschenkultivierung untersucht werden, um mit den dabei gewonnenen Informationen eine Vergleichsbasis für später folgende Kultivierungen in den Bioreaktoren zu schaffen. Die Vorversuche, die im wesentlichen darauf abzielten eine geeignete Betriebsweise für den Bioreaktor zu

finden, sollten in einem kleinen Labor-Rühr-Bioreaktor (Vario 1000, Medorex) mit einem Arbeitsvolumen von ca. 300 ml durchgeführt werden.

Aus den dabei gewonnenen Ergebnissen sollte ein abschließender Zellkulturprozess entwickelt werden, der in reproduzierbarer Form die gewünschte Zellqualität und Zellzahl liefern sollte. Für eine Maßstabsvergrößerung (Scale-up) stand hierfür ein 5-L Labor-Bioreaktor (Biostat B, Sartorius) zur Verfügung.

Da die Zellkultivierung im Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik, die Aufreinigung der intrazellulär vorliegenden Zielproteine jedoch am UKE, also räumlich voneinander getrennt erfolgen sollte, sollte im Rahmen dieser Diplomarbeit im Weiteren noch auf die sich der Zellernte anschließenden Prozesse wie Zellabtrennung und Zellyse (Freisetzung der Zielproteine) eingegangen werden und eine möglichst gute Lösung in Bezug auf den Ablauf gefunden werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne Erkrankung pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen. In den meisten Fällen wird die Krankheit durch eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 verursacht, was zur Bildung des Philadelphia-Chromosoms (verkürztes Chromosom 22) führt. Das Philadelphia-Chromosom wurde erstmals 1960 in Philadelphia von Nowell und Hugerford als konstant auftretende Chromosomenveränderung von Tumorzellen beschrieben (5).

Das Philadelphia-Chromosom ist bei mehr als 90% aller CML-Patienten zu finden und wird deshalb auch als charakteristisches Merkmal der CML angesehen. In Deutschland liegt die Inzidenz, also die Anzahl an Neuerkrankungen etwa bei 1 - 2 Personen pro 100.000 Personen und Jahr. Die Wahrscheinlichkeit an CML zu erkranken nimmt mit zunehmendem Alter zu. Sie wird daher als Alterserkrankung eingestuft, auch wenn andere Altersklassen davon betroffen sein können (5).

Das bei der reziproken Translokation entstehende Fusionsgen wird BCR-ABL (Breakpoint Cluster Region - Abelson Tyrosinkinase) Fusionsgen genannt und kodiert das BCR-ABL-Onkoprotein. Das darin enthaltene ABL-Gen, das normalerweise auf dem Chromosom 9 sitzt kodiert eine Tyrosinkinase, die wichtige Funktionen in Bezug auf die Wachstumsregulation der Zelle übernimmt. Durch Bildung des BCR-ABL-Fusionsgens werden die Eigenschaften dieser Tyrosinkinase erheblich verändert und deren Funktion gestört. Sie weist eine dauerhaft erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität auf und stimuliert eine Reihe unterschiedlicher Signalwege, die die Zelle dazu veranlassen sich unkontrolliert zu vermehren. Das BCR-ABL Onkoprotein kann dabei in Abhängigkeit von der Bruchstelle des BCR-Gens, das auf dem Chromosom 22 sitzt, in drei verschiedenen Varianten (p190, p210, p230) auftreten, die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichts voneinander unterscheiden lassen (6).

Der typische Verlauf der CML lässt sich in drei Krankheitsphasen aufteilen, die chronische Phase, die akzelerierte Phase und die Blastenkrise. Die erste Phase, die chronische Phase ist zu Beginn mit unspezifischen Symptomen, wie z.B. Müdigkeit, Kraftlosigkeit und Appetitlosigkeit gekennzeichnet. In dieser Phase kommt es zur vermehrten Bildung von weißen Blutkörperchen (Leukozytose) und zu einer

Vergrößerung der Milz (Splenomegalie). Meist wird eine Diagnose zufällig im Rahmen routinemäßiger Blutbilduntersuchungen gestellt. Der Großteil der Diagnosen fällt dabei in den Bereich der chronischen Phase, in der die medikamentöse Behandlungsaussicht gut ist.

Bleibt in der chronischen Phase eine Behandlung aus, so geht diese nach ca. 3 - 6 Jahren in die akzelerierte Phase über. In dieser Phase ist die fortschreitende Leukozytose von einem zunehmenden Mangel an Erythrozyten (Anämie) und Thrombozyten (Thrombozytopenie) gekennzeichnet. Im peripheren Blut und dem Knochenmark liegt der Anteil an Blasten zwischen 15 - 29%.

Nach wenigen Monaten bis zwei Jahren folgt das dritte Stadium, die Blastenkrise. In der Blastenkrise steigt der Anteil an Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark auf über 30% an. Die Krankheit ändert in dieser Phase ihren Verlauf und gleicht nun einer akuten myelischen Leukämie (AML). Nach Beginn der Blastenkrise bleiben den Betroffenen meist nur wenige Monate, bis die Krankheit, wenn sie unbehandelt bleibt, zum Tode führt (5).

2.2 Medikamentöse Therapie mit Imatinib

Ein häufig eingesetzter medikamentöser Therapieansatz in Bezug auf die Behandlung von CML zielt auf die selektive und kompetitive Inhibierung des Onkoproteins, der BCR-ABL-Tyrosinkinase mittels Imatinib (Glivec® oder Gleevec® in den USA, Novartis) ab. Imatinib stellt dabei den Prototyp der zielgerichteten Therapie der CML und wurde im Jahr 2001 von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen und wird seitdem zur Behandlung von CML eingesetzt (6).

Imatinib zählt zu den sog. „Small-Molecules-Inhibitors“ und ist derzeit der einzige Wirkstoff dieser Art, der in Deutschland für die medikamentöse Therapie der CML zugelassen ist. Die Wirkung von Imatinib beruht dabei auf der Verdrängung des natürlichen Substrats Adenosintriphosphat (ATP) aus der Bindungstasche der BCR-ABL-Tyrosinkinase. Die BCR-ABL-Tyrosinkinase wird dadurch daran gehindert Substrate zu phosphorylieren, also zelluläre Proteine zu aktivieren, wodurch die krankhaft gesteigerte Vermehrung entarteter Zellen unterdrückt wird. Imatinib hemmt dabei nicht nur die BCR-ABL-Tyrosinkinase sondern auch andere zelluläre Tyrosinkinasen wie z.B. die ABL-Tyrosinkinase, was aber in gesunden Zellen meist ohne Folgen bleibt (5).

Die Einführung von Imatinib revolutionierte aufgrund der spezifischen Inaktivierung der krankmachenden BCR-ABL-Tyrosinkinase die medikamentöse Therapie von CML und steigerte die Lebenserwartung betroffener Patienten deutlich. Die Anwendung von Imatinib führt vor allem in einem frühen Stadium (chronische Phase) der Krankheit zu erfolgsversprechenden Ergebnissen. Wird mit der Imatinib-Therapie in einem fortgeschrittenen (Akzelerationsphase) oder späten Stadium (Blastenschub) der Krankheit begonnen, so wird eine sich relativ schnell ausbildende Resistenzentwicklung gegen Imatinib beobachtet, was eine Umstellung der Therapie erforderlich macht (7).

In Bezug auf die Resistenzentwicklung stellen Punktmutationen im BCR-ABL-Gen, sowie eine übermäßige Expression des BCR-ABL Onkoproteins häufige Ursache für eine dar Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib dar (6).

Mittlerweile werden andere Tyrosinkinase-Inhibitoren in klinischen Studien getestet. Dabei handelt es sich um sogenannte Tyrosinkinase-Inhibitoren der zweiten Generation, die eine ganze Reihe besonders häufig vorkommender BCR-ABL-Mutationen abfangen können und durch eine höhere Wirksamkeit gekennzeichnet sind als Imatinib. Sie stellen damit eine medikamentöse Alternative zu Knochenmarkstransplantationen dar. Allerdings sind diese Medikamente nur für Patienten mit vorliegender Imatinibresistenz bzw. Imatinibunverträglichkeit innerhalb von Studien zugelassen, also noch nicht auf dem Markt (8).

2.3 Potentielle Zielstrukturen für kombinatorische Therapieansätze

Da bei der Therapie mit Imatinib vor allem in der zweiten und dritten Krankheitsphase eine, sich relativ schnell ausbildende Resistenzentwicklung zu beobachten ist, wird nach weiteren potentiellen Zielstrukturen gesucht, die in Kombination mit Imatinib zur Entwicklung einer verbesserten Therapie führen könnten. Die Angriffspunkte dieser Substanzen können der Wirkung von Imatinib vor- oder nachgeschaltet sein, bzw. einen Wirkmechanismus aufweisen, der mit dem des Imatinibs nicht in direktem Kontakt steht.

Erfolgsversprechende Zielsubstanzen, die für neuartige Therapieansätze verwendet werden könnten, wurden im Rahmen proteomischer Untersuchungen bereits identifiziert. Dabei wurden mithilfe molekularbiologischer Untersuchungen globale Proteinexpressionsmuster von BCR-ABL positiven Zellen (Zelllinie: K562) verglichen, die einerseits mit Imatinib behandelt wurden und andererseits unbehandelt blieben.

Die hierbei aufgetretenen, differenziell exprimierten Proteine wurden mithilfe massenspektroskopischer Untersuchungen identifiziert und sind nun Gegenstand weiterer Untersuchungen. Zwei davon sind die intrazellulären Proteine eukaryontischer Initiationsfaktor 5A und 5A-2 (eIF5A und eIF5A-2). Die aktivierte Form von eIF5A spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die Zellproliferation (4).

Die Proteine eIF-5A und eIF5A-2 wurden in den mit Imatinib behandelten Zellen in geringeren Mengen exprimiert (herunterreguliert) als in den unbehandelten, in denen sie überexprimiert wurden. Da eIF5A das einzige bekannte Protein ist, das mittels Hypusinierung aktiviert wird stellt, die Hypusinierung als hochspezifischer Vorgang ein potentiellies Angriffsziel für eine verbesserte Therapie der CML dar (4).

Hypusinierung von eIF5A

Anhand von eIF5A wird erklärt, wie die biologische Aktivierung des Initiationsfaktors erfolgt. Es ist das einzige bekannte eukaryontische Protein, das durch posttransnationale Hypusinierung aktiviert wird. In Abb. 2.1 ist der Ablauf der Hypusinierung von eIF5A dargestellt. Für eine erfolgreiche Hypusinierung, die in zwei Schritten abläuft (Aktivierung von eIF-5A) sind die beiden zellulären Enzyme, die DHS (Deoxyhypusin-Synthase) und die DOHH (Deoxyhypusin-Hydroxylase), sowie die in Anwesenheit von Spermidin erforderlich (9).

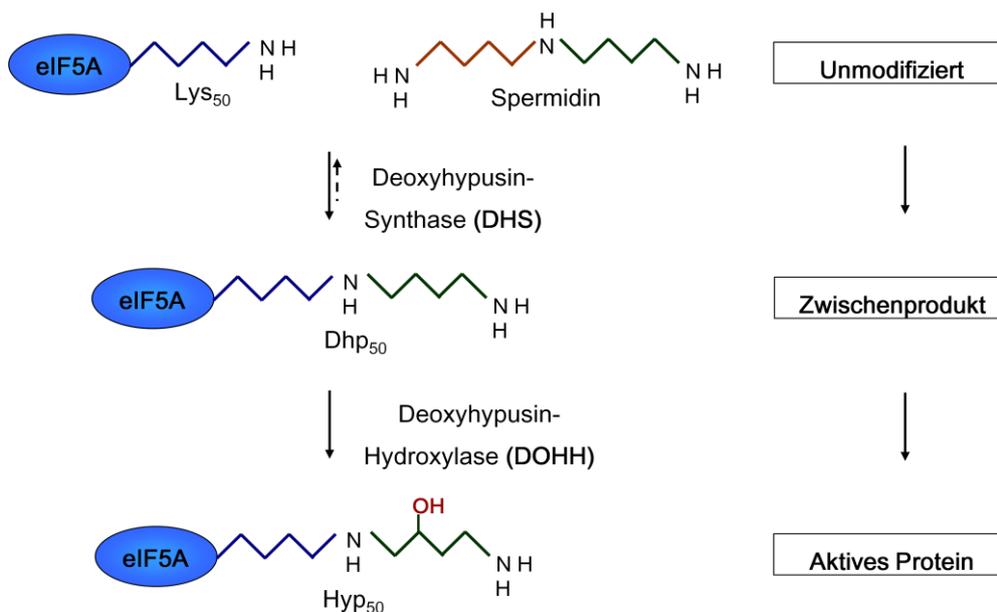


Abb. 2.1 Ablauf der Hypusinierung (Hauber *et al.*, JCI 2005)

In Versuchen, in denen BCR-ABL-positive und BCR-ABL-negative Zellen alleine mit Hypusinierungs-Inhibitoren behandelt wurden, zeigte sich in beiden Fällen ein wachstumshemmender Effekt. In Versuchen, in denen die BCR-ABL-positiven Zellen aus einer Kombination mit Imatinib und Hypusinierungs-Inhibitoren (Verhinderung der Aktivierung der Translationsfaktoren) behandelt wurden, zeigte sich ein vielversprechender synergetischer Effekt, der einen potentiellen Ansatz in der Entwicklung neuartiger therapeutischer Methoden zur Behandlung von CML darstellt und genauer untersucht werden soll. So zeigte sich beim Einsatz von Hypusinierungs-Inhibitoren in Kombination mit Imatinib eine verstärkte apoptotische Wirkung auf BCR-ABL-positive Zellen (4).

eIF-5A und eIF-5A-2

Die meisten Organismen exprimieren zwei Isoformen des Proteins, eIF-5A und eIF-5A-2, die sich genetisch oftmals ähneln, jedoch in verschiedenen Geweben und Krebszelllinien unterschiedlich stark transkribiert werden. Die Gene der beiden menschlichen Isoformen sind zu 84% identisch (9).

2.4 Aufreinigung von eIF5A und eIF5A-2 mittels TAP-Tag

Mithilfe des Tandem Affinity Purification Tags (TAP-Tag) ist es möglich Proteinkomplexe unter schonenden Bedingungen effizient aufzureinigen. Die Proteinkomplexe werden in zwei Reinigungsschritten mithilfe von zwei aufeinanderfolgenden Affinitäts-Tags aufgereinigt. Der TAP-Tag setzt sich aus Protein A (ProtA) und dem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP) zusammen. Beide „Tags“ sind durch eine TEV-Protease-Schnittstelle (Tobacco Etch Virus) miteinander verbunden (10).

Das Zielprotein, also z.B. eIF5A-2 wird zusammen mit dem TAP-Tag in den transfizierten Zellen (BA/F3 p210 eIF5A-2) exprimiert. Dazu wurden im Vorfeld die bekannten Gene der Zielproteine (cDNA) mithilfe gentechnischer Methoden markiert, also mit einem anderen DNA-Abschnitt fusioniert und in die Zelllinie BA/F3 eingebracht. Durch stabile Transfektion entstand so die neue Zelllinie BA/F3 p210 eIF5A-2. Durch die Fusion entsteht ein Hybridgen, das sowohl die Information für das Protein selbst, als auch für den TAP-Tag enthält. In Bezug auf die Fusion wird hierbei noch zwischen der N-terminalen und C-terminalen Fusion unterschieden. So ist bei der C-terminalen Fusion von Vorteil, dass eine physiologische Expression des

Zielproteins durch die Kontrolle des authentischen Promotors gewährleistet wird. Das Expressionssystem produziert das Zielprotein zusammen mit seinen beiden Markierungen (Tags), was die spätere Aufreinigung des Zielproteins und der daran angebotenen Proteine (Proteinkomplexe) wesentlich vereinfacht. Im ersten Aufreinigungsschritt bindet das ProtA an eine mit IgG-Antikörpern gekoppelte Matrix. Nach mehreren Waschschrirten wird durch Einsatz der TEV-Protease, die TEV-Protease-Schnittstelle spezifisch zerschnitten und das Zielprotein mitsamt aller an ihm gebundenen Interaktionspartner von der Matrix abgelöst. Der Überstand wird in einem zweiten Aufreinigungsschritt mit einer mit Calmodulin gekoppelten Matrix unter Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen inkubiert. Nach weiteren Waschschrirten, bei denen neben Kontaminationen auch die TEV-Protease entfernt wird, werden durch Zugabe des Chelatbildners EGTA (Ethylenglykol-Tetraessigsäure) die Zielproteine von der Matrix abgelöst und können aufgefangen werden (11).

2.5 Tierische Zellkulturprozesse

2.5.1 Charakteristika tierischer Zellen

Vergleicht man das Wachstumsverhalten tierischer Zellen mit dem von Mikroorganismen so fällt auf, dass das Wachstum tierischer Zellen durch niedrigere Wachstumsraten mit Verdopplungszeiten von 12 - 28 Stunden und durch geringere erreichbare Zelldichten gekennzeichnet ist. Tierische Zellen sind mit einem Durchmesser von ca. 10 - 30 μm aber auch größer als Mikroorganismen, deren Durchmesser in einer Größenordnung von 2 - 10 μm liegt. Der Metabolismus tierischer Zellen ist aufgrund der höheren Komplexität durch geringe Stoffwechselraten gekennzeichnet, was zu einer vergleichsweise geringeren Produktivität bzw. zu geringeren Produktkonzentrationen führt (12).

Im Vergleich zu Mikroorganismen weisen tierische Zellen eine komplexere Struktur in ihrem Aufbau auf. So beinhalten tierische Zellen verschiedene Kompartimente bzw. hochfunktionelle Zellorganellen wie z.B. das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, die wichtige Funktionen in Bezug auf postranslationale Modifikationen von Proteinen und damit auf die korrekte Prozessierung von Proteinen haben. Die Vielzahl tierischer Zelllinien wächst adhärent, d.h. die Zellen benötigen geeignete Oberflächen bzw. Anheftungsstellen um wachsen und sich vermehren zu können. Suspensionszellen hingegen wachsen und vermehren sich unabhängig von einer

geeigneten Wachstumsoberfläche und liegen im Medium meist in Form vereinzelter Zellen oder kleiner Zellaggregate vor.

Da tierische Zellen nicht, wie bei den Mikroorganismen der Fall, über eine starre und mechanisch stabile Zellwand verfügen, sondern das innere der Zelle, das Zytosol lediglich durch eine Zellmembran (Phospholipid-Doppelschicht) von der Außenwelt abgegrenzt ist, reagieren diese empfindlicher gegenüber physikalischen Einwirkungen wie Scherkräften und Schädigungen durch Luftblasen, wie sie beispielsweise im Rahmen des Sauerstoffeintrags in eine Zellsuspension häufig auftreten (13).

Der große Vorteil tierischer Zellen gegenüber Prokaryonten und Hefen liegt darin begründet, dass diese dazu befähigt sind rekombinante Proteine 3-Dimensional korrekt zu falten (insbesondere Disulfidbrücken) und wichtige posttranslationale Modifikationen durchzuführen wie z.B. Glykosylierungen und Phosphorylierungen. Die korrekte Faltung der Proteine, sowie vorgenommene posttranslationale Modifikationen sind für die biologische Funktionalität der Proteine unerlässlich (14).

Besondere Bedeutung haben rekombinante tierische Zellen in Bezug auf die Produktion klinisch relevanter hochmolekularer Proteine, die als Wirkstoffe im menschlichen Körper eingesetzt werden (1).

2.5.2 Mediuamanforderungen

Medien, die für die Kultivierung tierischer Zellen eingesetzt werden müssen alle, für das Wachstum notwendigen Substrate (Glukose, Glutamin, Aminosäuren, Salze, Vitamine, u.a.) in ausreichender Menge beinhalten. D-Glukose und L-Glutamin werden dabei als Hauptenergiequellen angesehen und spielen eine wichtige Rolle im primären Energiestoffwechsel der Zellen. Des Weiteren soll mithilfe des Mediums ein Milieu (pH-Wert und Osmolalität) geschaffen werden, das dem *in vivo* möglichst nahe kommt. Um einen physiologischen, möglichst optimalen pH-Bereich, der bei den meisten tierischen Zellen in einem Bereich zwischen 7 - 7,3 liegt einstellen und aufrechterhalten zu können, werden Puffersysteme eingesetzt. Ein häufig eingesetztes Puffersystem in Zellkulturmedien ist das Salz Natriumhydrogencarbonat. Die Einstellung des pH-Werts im Medium erfolgt dabei mithilfe der CO₂-Konzentration, die in der Gasphase vorliegt.

Dieses Puffersystem lässt sich mit folgender Reaktionsgleichung beschreiben:



Manche Medien verfügen auch über den pH-Indikator Phenolrot, der durch Farbumschlag Änderungen des pH-Werts im Medium visuell anzeigen kann. Für die tierische Zellkultur stehen zahlreiche speziell entwickelte und optimierte Medienformulierungen zur Verfügung (Grundmedien), die in Abhängigkeit der zu kultivierenden Zellen eingesetzt werden. Ein Beispiel ist RPMI-1640 Medium (wurde im Roswell Park Memorial Institute in Buffalo, New York entwickelt), das für Knochenmarks- und Hybridomazellen sowie zur Kultivierung normaler und neoplastischer Leukozyten eingesetzt wird (15).

In den meisten Fällen wird das Grundmedium durch Zugabe verschiedener Zusätze komplettiert. So wird dem Grundmedium häufig auch Serum zugesetzt, das aus unterschiedlichen Spendertieren, wie z.B. fötalen Kälbern oder Pferden gewonnen wird. Das Serum enthält viele, für die Proliferation Zellen notwendige Wachstumsfaktoren und dient auch dem Schutz gegenüber schädlicher physikalischer Einflüsse wie z.B. Scherkräften oder hydrodynamischen Spannungen (16).

Vielen Zellkulturmedien werden auch Antibiotika wie z.B. Penicillin und Streptomycin zugesetzt (Nachahmung des Immunsystems) um damit eine monoseptische Kulturführung zu vereinfachen (15)

2.5.3 Metabolismus tierischer Zellen

Der Metabolismus tierischer Zellen ist äußerst komplex und stellt ein veränderliches, dynamisches System dar. Der Metabolismus tierischer Zellen beinhaltet eine Vielzahl unterschiedliche Stoffwechselwege. D-Glukose und L-Glutamin stellen die beiden wichtigsten Hauptenergiequellen für den Stoffwechsel tierischer Zellen dar. Daneben liefern sie aber auch wichtige Rohstoffe für die Synthese zellulärer Bausteine, die für die Vermehrung der Zellen unerlässlich sind. So wird Glukose auch im Pentosephosphat-Weg für den Aufbau von Nukleotiden verwendet. Glutamin spielt als essentielle Aminosäure eine wichtige Rolle bei der Synthese zellulärer Proteine und stellt daneben eine wichtige Stickstoffquelle dar, die beispielsweise für die Synthese von Purinen und Pyrimidinen benötigt wird. In primären tierischen Zellen oder auch in Zellen, die *in vivo* vorkommen wird die Glukose im Rahmen der Glykolyse, die im

Zytosol stattfindet zu Pyruvat verstoffwechselt, wobei 2 Moleküle ATP entstehen. Pyruvat, das anschließend in die Mitochondrien eingeschleust und im Rahmen des Citratzyklus unter Anwesenheit von Sauerstoff vollständig zu CO_2 und H_2O oxidiert wird, liefert weitere 34 Moleküle ATP. Im Rahmen des vollständigen Abbaus eines Glukosemoleküls entstehen somit bei vollständiger oxidativer Umsetzung eines Glukosemoleküls 36 ATP (16).

In kontinuierlichen Zelllinien wird der Großteil der aufgenommenen Glukose im Rahmen der anaeroben Glykolyse zu Laktat und Alanin verstoffwechselt und anschließend ins Medium ausgeschleust (17).

Laktat wirkt in hohen Konzentrationen inhibierend auf das Wachstum und die Produktivität der Zellen und trägt auch zu einer Ansäuerung des Mediums bei, allerdings ist der wachstumsinhibierende Effekt von der jeweiligen eingesetzten Zelllinie abhängig. Bei vielen tierischen Zelllinien wird Laktat dabei in einem Verhältnis von 1,1 - 1,7 mol Laktat/mol Glukose gebildet. Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen kann dieses Verhältnis Werte von 2 mol Laktat/mol Glukose annehmen, da die Glukose dann ausschließlich im Rahmen der anaeroben Glykolyse verstoffwechselt wird (3).

Der Abbau von Glutamin (Glutaminolyse) liefert zusätzlich zum glykolytischen Abbau von Glukose einen wichtigen Anteil in Bezug auf die Deckung des Energiebedarfs tierischer Zellen. Im Rahmen der Glutaminolyse wird dabei Ammonium gebildet. Bei Überschreitung bestimmter Konzentrationen hat Ammonium einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum und kann bei zu hohen Konzentrationen auch zum Zelltod führen (18).

2.5.4 Apoptose und Nekrose

Der Zelltod tierischer Zellen kann über zwei unterschiedliche Wege, der Apoptose und der Nekrose eintreten. Beide Wege sind durch ihnen eigene physiologische und morphologische Merkmale gekennzeichnet und voneinander unterscheidbar. (19)

Die Apoptose, die auch programmierter Zelltod genannt wird, ist ein aktiver und genetisch kontrollierter Prozess, der durch eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Stimuli ausgelöst werden kann. Die Stimuli kommen dabei entweder aus dem extrazellulären Raum oder werden aufgrund bestimmter zellinterner Prozesse intrazellulär ausgelöst (19).

In mehrzelligen Organismen stellt die Apoptose den Gegenspieler zur Mitose dar und ist unter anderem für die Aufrechterhaltung der Zellzahl und der Größe von Geweben zuständig (Homöostase). Andere wichtige Funktionen übernimmt sie in der Embryonalentwicklung, der Metamorphose und im Immunsystem. Der apoptotische Untergang der Zelle erfolgt in mehrzelligen Organismen (*in vivo*) unter strengster Kontrolle ohne Beschädigung der umliegenden Zellen, d.h. eine Entzündungsreaktion bleibt aus (20).

In Kultivierungssystemen wie z.B. einem Bioreaktor (*in vitro*) können Stressbedingungen für Zellen, wie z.B. Substratmangel, zu hohe Konzentrationen an toxischen Metaboliten oder auch Scherkräfte und hydrodynamische Spannungen dazu führen, dass die Apoptose eingeleitet wird. Voraussetzung für das Einleiten und den ordnungsgemäßen Ablauf der Apoptose ist das Vorhandensein der Möglichkeit auf die vorliegende Stresssituation reagieren zu können. Anders als bei mehrzelligen Organismen, in denen apoptotische Zellen aus dem Zellverband gezielt durch Phagozytose entfernt und damit aktiv recycelt werden, entlässt die sich in einem Bioreaktor befindliche, apoptotische Zelle nach Integritätsverlust der Membran ihren zytosolischen Inhalt in die sie umgebende Zellsuspension (21).

Die Nekrose ist ein passiver Vorgang, der im Wesentlichen dann auftritt, wenn die Zellen in einem ungewöhnlich hohem Maße Stress ausgesetzt sind und sie keine Möglichkeit haben in angemessener Weise auf diesen Stress zu reagieren, was den pathologischen Untergang der Zellen zur Folge hat. In mehrzelligen Organismen geht die Nekrose immer mit einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes einher und wird daher als unkontrollierter Zelltod bezeichnet (20).

In einem Bioreaktor kann es in vielerlei Hinsicht zu einem nekrotischen Anstieg des Stressaufkommens für Zellen kommen, der zu einem höheren Anteil nekrotisch absterbender Zellen führt. Mögliche Ursachen für den nekrotischen Untergang der Zellen sind hierbei wie auch schon bei der Apoptose der Fall z.B. Substratmangel, zu hohe Konzentrationen an toxischen Metaboliten, Scherkräfte oder hydrodynamische Spannungen (21).

2.6 Kultivierungssysteme für tierische Zellen

Tierische Zellen können in unterschiedlichen Kultivierungssystemen kultiviert werden. Unterteilt werden die Kultivierungssysteme dabei in statische und in dynamische Systeme (22).

2.6.1 Statische Kultivierungssysteme

Unter statischen Kultivierungssystemen werden Kultivierungssysteme verstanden, in denen Zellen in ruhendem Medium kultiviert werden. Zu den statischen Kultivierungssystemen zählen Petrischalen, T-Flaschen, Wannenstapel oder auch Multiwellplatten. Die T-Flaschen werden hauptsächlich für die Stammhaltung und die Generierung kleinerer Zellmengen, z.B. für die Züchtung einer Vorkultur eingesetzt. T-Flaschen bestehen meist aus Polystyrol und stellen Einwegsysteme dar. In Abhängigkeit des vorliegenden Zelltyps (adhärente Zellen/Suspensionszellen) stehen geeignete T-Flaschen zur Verfügung. Für adhärente Zellen werden die Oberflächen oftmals auch behandelt um eine bessere Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. T-Flaschen werden in befeuchteten Brutschränken meist unter Standardkultivierungsbedingungen (37°C, 5% CO₂) bebrütet. Die Systeme sind einfach in ihrer Handhabung, Prozessparameter, wie z.B. der pH-Wert oder die gelöste Sauerstoffkonzentration lassen sich jedoch nicht kontrollieren (22).

2.6.2 Dynamische Kultivierungssysteme

Als dynamisch Kultivierungssysteme werden all diejenigen Kultivierungssysteme zusammengefasst, bei denen das Medium bzw. die Zellsuspension aktiv durchmischt wird. Aktive Durchmischung bedeutet, dass für die Durchmischung Energie aufgebracht werden muss. Grundsätzlich kann die Durchmischung auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. In diesem Zusammenhang wird zwischen mechanisch, hydraulisch und pneumatisch betriebenen Systemen unterschieden. Neben vielen anderen Bioreaktoren, die in der Zellkultur eingesetzt werden wie z.B. Blasensäulenreaktoren oder Festbett-Bioreaktoren stellen Rührkesselreaktoren häufig eingesetzte Systeme dar (22).

2.6.2.1 Rührkesselbioreaktor

Rührkesselreaktoren sind sowohl im Labormaßstab als auch im industriellen Maßstab im Einsatz. Sie sind einfach zu betreiben und erlauben eine direkte Kontrolle der Zellzahl bzw. eine gute Prozesskontrolle. Rührkesselreaktoren sind vielseitig einsetzbar und werden für die Kultivierung sowohl prokaryontischer als auch und eukaryontischer Zellen eingesetzt. Tierische Zellen, die in diesen Systemen kultiviert werden liegen entweder in suspendierter Form vor oder befinden sich adhärent wachsend auf sog. Microcarriern, die ihrerseits kleine sphärische suspendierbare Objekte darstellen. Grundsätzlich sind mit einem Suspensionsreaktor Suspensionszellen als auch adhärent wachsende Zellen kultivierbar (22).

Bei der Kultivierung tierischer Zellen in Bioreaktoren werden hohe Anforderungen an die Prozesstechnik und Sterilität gestellt, da *in vitro* möglichst optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen geschaffen und aufrechterhalten werden sollen. Um die Kultivierung tierischer Zellen zu überwachen und kontrollieren zu können, werden während der Kultivierung mithilfe bestimmter Messsonden prozessspezifische Größen ermittelt, wie z.B. die Temperatur, pH-Wert und die Gelöstsauerstoffkonzentration. Weitere prozess-spezifische Größen, die während einer Kultivierung ebenfalls bestimmt und überwacht werden sind z.B. die Zelldichte, die Viabilität und Nährstoff- und Metabolitenkonzentrationen. In Bezug auf die Überwachung der Nährstoffkonzentration werden stellvertretend für alle anderen Medienkomponenten wie z.B. Vitamine, Spurenelemente und Aminosäuren in Zellkulturprozessen häufig die Konzentrationen der beiden Hauptenergiequellen, der Glukose und des Glutamins überwacht (3).

Idealerweise weisen Rührkesselreaktoren eine sehr gute Durchmischung mit niedrigen Mischzeiten auf. Mit der Mischzeit ist die Zeit gemeint, die der Reaktor benötigt, um einen vorgegebenen Homogenisierungsgrad (Mischgüte) zu erreichen. Inhomogenitäten, wie sie beispielsweise bei der Zugabe von Flüssigkeit zur pH-Korrektur auftreten können, sollen damit möglichst vermieden werden. Gleichzeitig soll die Durchmischung aber auch möglichst schonend erfolgen, um die dabei auftretenden Scherkräfte möglichst gering zu halten. Für die Durchmischung stehen unterschiedliche Rührer zur Verfügung wie z.B. Scheibenrührer, Schrägblattrührer oder Ankerrührer. Ihre Hauptaufgaben liegen dabei neben der Homogenisierung des Reaktorinhalts auch in dem Suspendieren der Zellen oder der Microcarrier und der Wärme- und Stoffübertragung, sowie im Dispergieren (23).

Ein weiterer wichtiger Punkt liegt in der Art der Begasung. Für tierische Zellkulturprozesse stehen unterschiedliche Begasungsarten wie z.B. Blasenbegasung, Oberflächenbegasung oder Membranbegasung zur Verfügung. Die Art der Begasung hat dabei einen wesentlichen Einfluss auf den Sauerstoffübergang ins Medium und damit auch auf die Sauerstoffversorgung der Zellen.

Wenn aerobe Bioprozesse durch eine hohe Sauerstoffaufnahme OUR (Oxygen Uptake Rate) gekennzeichnet sind, stellen diese besondere Ansprüche an die Sauerstoffversorgung und damit an die Sauerstofftransportrate OTR (Oxygen Transport Rate), die das Kultivierungssystem zu liefern imstande ist. Diese hängt in Rührkesselbioreaktoren im Wesentlichen von der Begasungsart, der Begasungsrate, und dem eingesetzten Rührer bzw. der Rührerdrehzahl und dem Reaktordesign ab. Während eines Prozesses wird die OTR im Rahmen wachsenden Sauerstoffbedarfs häufig durch Erhöhung der Begasungsrate und/oder der Rührerdrehzahl eingestellt (24).

2.7 Betriebsweisen von Bioreaktoren

Bei der Auslegung eines biotechnologischen Produktionsprozesses ist neben der Auswahl eines geeigneten Bioreaktorsystems für die Kultivierung der Zellen die Betriebsweise bzw. die Art der Prozessführung ein wesentlicher Aspekt (3). Die nachfolgenden Betriebsweisen beschreiben gängige Betriebsweisen von Bioreaktoren, wie sie beispielsweise auch häufig in der biotechnologischen Industrie zu finden sind.

2.7.1 Satz-Betrieb (Batch)

Beim Batch-Betrieb handelt es sich um ein technisch relativ einfach zu realisierendes Verfahren, da hierfür lediglich ein geschlossenes Behältnis (Bioreaktor) erforderlich ist, in dem ein Wachstums- oder Produktbildungsprozess als Spontanprozess abläuft. Nachdem das Medium mit einer Mindestmenge an Zellen (Inokulum) beimpft wurde, beginnt der Prozess. Das Batch-System wird als geschlossenes System angesehen, dem abgesehen von wenigen Ausnahmen nichts mehr zu- oder abgeführt wird. Ausnahmen sind hierbei die Zuführung von Gasen oder die Zugabe von Flüssigkeit zur pH-Korrektur und Schaumbekämpfung, sowie ein Volumenverlust

durch die Probenahme. Im Verlauf der Kultivierung ändern sich die Konzentrationen aller am Wachstum beteiligter Substrate, sowie die Zell- und Produktkonzentrationen. Eine Variante des normalen Batch-Betriebs stellt der repeated-Batch dar, bei dem am Ende der Kultivierung nicht der gesamte Inhalt des Bioreaktors entleert (geerntet) wird, sondern eine bestimmte Menge als Inokulum für einen weiteren Batch-Prozess im Bioreaktor zurückbleibt. Durch diese Betriebsweise entfallen Rüstzeiten für Reinigung, Sondenkalibrierung und Sterilisation, wodurch die Effektivität im Vergleich zum normalen Batch-Betrieb zunimmt (3).

2.7.1.1 Typischer Wachstumsverlauf eines Batch-Ansatzes

Durch semilogarithmische Auftragung der Zelldichte über der Zeit erhält man eine Wachstumskurve, die durch einen typischen Verlauf gekennzeichnet ist. In Abb. 2.2 ist der typische Wachstumsverlauf einer Batchkultur zu sehen.

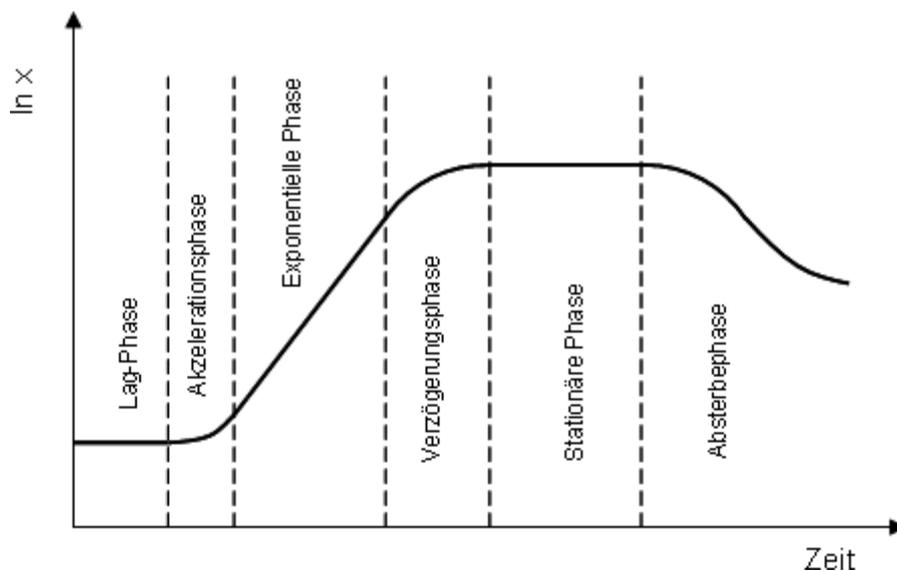


Abb. 2.2 Typischer Wachstumsverlauf eines Batch-Ansatzes

In der Anfangsphase der Kultur, die auch Lag-Phase genannt wird, vermehren sich die Zellen noch nicht, da sie sich erst auf die im Bioreaktor vorherrschenden Bedingungen einstellen müssen (Adaptionsphase). An die Lag-Phase schließt sich die Akzelerationsphase an, eine Phase, in der sich die Zellen sukzessive zu teilen beginnen und der Vermehrungsvorgang gestartet wird. In der exponentiellen Wachstumsphase gelten idealerweise die Gesetze unlimitierten Wachstums ($\mu = \mu_{\max}$). In dieser Phase stehen alle Wachstumssubstrate in ausreichender Menge zur Verfügung. Sie geht in die Retardationsphase, eine weitere Verzögerungsphase

über, die in Folge zunehmenden Substratverbrauchs, einer oder mehrerer notwendiger Substrate bzw. durch Anreicherung wachstumsinhibierender Metaboliten beginnt. Die Retardationsphase ist durch eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit gekennzeichnet. In der stationären Phase hat die Wachstumsgeschwindigkeit soweit abgenommen, dass kein Wachstum mehr erkennbar ist. In dieser Phase teilen sich manche Zellen noch, während andere schon absterben. Absterbende Zellen werden lysiert wodurch ihr zytosolischer Inhalt an das sie umgebende Medium abgegeben wird. Dadurch werden Nährstoffe (Kohlenhydrate, Aminosäuren, usw.) freigesetzt, die andere noch intakte Zellen nutzen können um sich weiterhin zu teilen (kryptisches Wachstum). Die stationäre Phase, die für tierische Zellen meist relativ kurz ist, geht schließlich in die Lysephase über, d.h. mehr und mehr Zellen werden nun lysiert und sterben ab. Da kaum noch neue Zellen nachgebildet werden geht die Gesamtpopulation unter.

2.7.2 Zulauf-Satz-Betrieb (Fed-Batch)

Der Fed-Batch-Prozess oder auch Zulaufverfahren zählt zu den teiloffenen Systemen und zeichnet sich durch eine partiell kontinuierliche Betriebsführung aus. Der Fed-Batch-Prozess kommt immer dann zum Einsatz, wenn aufgrund metabolischer Regulation ein Satzbetrieb mit hohen Anfangskonzentrationen unerwünscht ist, oder wenn die Totzeiten im Batch-Betrieb nicht tragbar sind, also bei Massenprodukten (24).

Der Fed-Batch-Prozess wird zunächst als Batch-Prozess gestartet, wobei das Anfangsvolumen üblicherweise bei $1/3 - 1/2$ des Arbeitsvolumens des Bioreaktors liegt. Um Substratlimitierungen zu vermeiden, wird nach Unterschreitung einer bestimmten Substratkonzentration Zufütterungsmedium zugegeben, was zu einer Verlängerung der Wachstumsphase und einer meist höheren Produktausbeute führt. Das Zufütterungsmedium ist dabei in den meisten Fällen ein Mediumkonzentrat, d.h. die Substrate liegen in einer höheren Konzentration vor als im Anfangsmedium. Für die Art der Zufütterung gibt es unterschiedliche Strategien wie z.B. die Impulszugabe, einen festen Zulaufstrom oder eine lineare Zunahme des Zulaufstroms (3).

2.7.3 Kontinuierlicher Betrieb ohne Zellrückhaltung

Der kontinuierlich betriebene Bioreaktor zählt zu den offenen Systemen und ist dadurch gekennzeichnet, dass einerseits laufend frisches Medium in den Bioreaktor eingeleitet wird, andererseits aber auch ständig durchwachsene Kulturflüssigkeit (Zellsuspension) aus dem Bioreaktor ausgeleitet wird. Das Arbeitsvolumen bleibt dabei konstant. Kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren liegt die Annahme zu Grunde, dass der Reaktorinhalt jederzeit homogen durchmischt ist, und die ablaufende Flüssigkeit die gleiche Zusammensetzung hat wie die im Reaktor (24).

Ein kontinuierlicher Prozess wird zunächst als Batch gestartet. Nach Unterschreitung einer bestimmten Substratkonzentration wird der kontinuierliche Prozess durch Einschalten der Zu- und Ablaufströme gestartet. Kontinuierlich betriebene Prozesse zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, dass sich in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate D (ergibt sich aus dem Quotienten des Zu- bzw. Ablaufstroms und dem konstanten Arbeitsvolumen im Bioreaktor) nach gewisser Zeit ein Fließgleichgewicht einstellt. Ein solches System wird Chemostat genannt. Das Fließgleichgewicht oder auch stationärer Zustand genannt, stellt sich erfahrungsgemäß erst dann ein, wenn das Arbeitsvolumen 3 - 5 mal ausgetauscht worden ist. Im Fließgleichgewicht sind keine Zustandsänderungen mehr erkennbar, alle Konzentrationen bleiben idealerweise konstant (3).

Wird die Verdünnungsrate in Abhängigkeit der im Bioreaktor vorliegenden Zelldichte oder einer dafür repräsentativen Größe wie z.B. der Sauerstoffaufnahme gesteuert oder geregelt, so wird das kontinuierlich betriebene System als Turbidostat bezeichnet (3).

3 Material und Methoden

3.1 Aseptische Arbeitstechnik

Alle Arbeitsschritte, die steril erfolgen sollten, wurden unter einer Sterilbank der Sicherheitsstufe 2 (Hera Safe) durchgeführt. Sofern erforderlich wurden Gefäße, Lösungen, Schläuche u.a. autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert.

3.2 Zelllinien

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelte es sich um immortalisierte, transfizierte murine pro B Zellen (Suspensionszellen), die normalerweise Interleukin 3 (IL-3) abhängig wachsen. Dadurch, dass die Zellen mit dem BCR-ABL-Gen p210 transfiziert wurden wachsen diese Interleukin 3 (IL-3) unabhängig.

Die BA/F3 p210 Zellen wurden von C.L. Sawyers (University of California, Los Angeles) hergestellt und dem UKE für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Am UKE wurden die BA/F3 p210 Zellen erneut transfiziert, so dass eine neue stabile Zelllinie entstanden ist, die die genetische Information für die Produktion des Zielproteins, sowie die Markierung (TAP-Tag) für die spätere Aufreinigung enthalten hat. Es wurden mit folgenden Zelllinien gearbeitet:

- BA/F3 p210
- BA/F3 p210 eIF5A-2

3.3 Medium

Alle Zelllinien wurden in dem Medium RPMI-1640 mit L-Glutamin bzw. Glutamax (Gibco), das folgende Zusätze (v/v) enthalten hat, kultiviert:

- 10% FCS (fötales Kälberserum, Gibco)
- 1% PenStrep (10.000 Units/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, Gibco)
- 1% NEAA 100x (nichtessentielle Aminosäuren, Gibco)
- 1% Natrium-Pyruvat (100 mM, Gibco)

3.4 Zufütterungsmedium (Fed-Batch)

Das für den Fed-Batch-Kultivierungsversuch eingesetzte Zufütterungsmedium (100 ml) setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 90 ml Medium mit Zusätzen (siehe 3.3)
- 10 ml L-Glutamin (200 mM, Gibco)
- 1,62 g D-Glukose (Sigma)

Die Glukose wurde in Glutamin gelöst, sterilfiltriert und mit dem Medium vermischt. Das Zufütterungsmedium wurde während des Kultivierungsversuchs auf einer Temperatur von 4°C gehalten.

3.5 Working Cell Bank

Da es im Verlauf der Stammhaltung der Zellen, vor allem bei hohen Passagenzahlen, zu Veränderungen auf genetischer und phänotypischer Ebene kommen kann, sollten diese nach einer gewissen Anzahl von Passagen verworfen und durch neue, mit entsprechend niedriger Passagenzahl ersetzt werden. Deshalb war es erforderlich eine Working Cell Bank (WCB) anzulegen, die einen reproduzierbaren Ausgangszustand in Bezug auf die Entwicklung des Inokulums darstellt.

Die aus der Master Cell Bank (MCB) stammenden und in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Suspensionszellen (siehe 3.2), wurden als Lebendkultur vom UKE an die Technische Universität Hamburg-Harburg transportiert. Um eine ausreichende Zellmenge für die Generierung einer WCB zu erhalten, wurde der Inhalt der T-25 Flaschen (5 ml) in neue T-75 Flaschen überführt und mit 15 ml frischem Medium komplettiert. In einem befeuchtetem Brutschrank (HeraCell, Kendro Laboratory Products, Hanau) wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre solange bebrütet, bis eine ausreichende Zelldichte vorhanden war. Nach Bestimmung der Lebendzelldichte, der in exponentieller Wachstumsphase befindlichen Suspensionszellen wurde ein entsprechendes Volumen der Zellsuspension in ein 15 ml Falcontube überführt und bei Raumtemperatur mit 1000 U/min für 10 min zentrifugiert (Minifuge, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Einfriermedium (90% (v/v) FCS (Gibco) und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck)) aufgenommen und resuspendiert. Anschließend

wurde die Zellsuspension mit einer angestrebten Zelldichte von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml auf mehrere Kryoröhrchen verteilt (1 ml pro Kryoröhrchen). Diese wurden anschließend in eine Isopropanolbox gestellt und bei einer Abkühlrate von ca. $1^\circ\text{C}/\text{min}$ auf -80°C heruntergekühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstoff-Lagerbehälter überführt und bei -196°C eingelagert.

3.6 Auftauen von Zellen

Die aus dem Flüssigstickstoff-Lagerbehälter entnommenen Kryoröhrchen wurden mithilfe eines Wasserbads bei 37°C aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcontube überführt und mit 5 ml frischem Medium gewaschen. Bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension mit 1000 U/min für 10 min zentrifugiert (Minifuge, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine T-75 Flasche (Sarstedt, USA) überführt.

3.7 Stammhaltung

Die Stammhaltung der Suspensionszellen erfolgte in T-25 Zellkulturflaschen (Sarstedt, USA) mit Filter-Schraubverschluss in einem befeuchteten Brutschrank (HeraCell, Kendro Laboratory Products, Hanau) bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre. Das Kultivierungsvolumen dieser Flaschen betrug 5 ml. Passagiert wurde alle 3 - 4 Tage, wobei sich die Zellen stets in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die hierbei angestrebte Anfangszelldichte lag bei $0,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml.

3.8 Vorkultur

Um die für das Inokulum der Kultivierungsversuche notwendige Zellzahl zu erzeugen, wurde in T-75 und T-175 Flaschen (Sarstedt, USA) passagiert. Dabei betrug das Kultivierungsvolumen in den T-75 Flaschen 20 ml und in den T-175er Flaschen 50 ml.

3.9 Zelldichte und Viabilität

Die Lebend- und Gesamtzelldichte, der in Suspension wachsenden Zellen wurde mit Hilfe der Trypanblau-Ausschlussmethode in einer Neubauer Zählkammer (Neubauer

Improved) bestimmt. Als Mikroskop diente ein inverses Phasenkontrast-Mikroskop (Nikon, Japan, 200 fache Vergrößerung).

Mit Trypanblau lassen sich tote Zellen einfärben, wodurch sich diese von vermeintlich lebenden und ungefärbten Zellen unterscheiden lassen. Die Zelldichten wurden mit folgender Formel berechnet:

$$C_x = Z \cdot V_F \cdot K \quad (3.1)$$

Das Probenvolumen der Zellsuspension betrug 100 μ l. Es wurde mit 100 μ l einer gebrauchsfertigen 0,4%igen Trypanblau-Lösung (Gibco) versetzt und nach kurzer Inkubation auf eine Zählkammer aufgebracht. Dabei wurden stets beide Kammern der Zählkammer befüllt und eine Doppelbestimmung durchgeführt und daraus der Mittelwert bestimmt. Aus dem prozentuellen Verhältnis zwischen Lebend- und Gesamtzelldichte lässt sich die Viabilität der Zellen mithilfe folgender Gleichung bestimmen:

$$\text{Viabilität}[\%] = \frac{C_{x,V}}{C_{x,G}} \cdot 100\% \quad (3.2)$$

Falls erforderlich, d.h. bei zu erwartenden Zelldichten über ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurde vor der Färbung mit Trypanblau 1:2 bzw. 1:4 mit PBS (pH 7,2) verdünnt.

3.10 Spezifische Wachstumsrate μ

Das Zellwachstum wird als eine autokatalytische Reaktion erster Ordnung angesehen. Ausgangsformel für die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ ist:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (3.3)$$

Setzt man für $\mu = \mu_{\max}$ (μ wird in der exponentiellen Wachstumsphase als Konstante angesehen) lässt sich die Gleichung nach Auftrennung der Variablen integrieren, was zu folgendem Ausdruck führt:

$$\ln \frac{C_X(t_1)}{C_{X,0}} = \mu_{\max} \cdot (t_1 - t_0) \quad (3.4)$$

Löst man nach μ_{\max} auf kommt man zu folgender Formel, die der Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate dient:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln \frac{C_X(t_1)}{C_{X,0}}}{(t_1 - t_0)} \quad (3.5)$$

Soweit nicht anders beschrieben, wurde zur Bestimmung der Wachstumsrate diese Formel eingesetzt. Diese Formel konnte für alle Batch-Kultivierungen eingesetzt werden.

3.11 Verdopplungszeit t_d

Mit Hilfe der maximalen Wachstumsrate lässt sich die Verdopplungszeit der Zellen ermitteln:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (3.6)$$

3.12 Glukose- und Laktatkonzentration c_{Glik} und c_{Lak}

Um die Zellen vom Medium abzutrennen, wurden die Proben bei 4°C und 13.000 U/min 3 min lang zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde in neue 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Jede Probe wurde zweimal gemessen. Aus den dabei gewonnenen Messergebnissen wurde der Mittelwert bestimmt.

Die Glukose- und Laktatkonzentration wurden mit einem Glukose/Laktat Analyser (YSI 2700 Select, Yellow Springs Instruments, USA) bestimmt. Die Messmethode beruht auf enzymatischen Reaktionen der Glukose- und Laktatoxidase, die auf jeweils einer Membran in immobilisierter Form vorliegen. Bei der enzymatischen Umsetzung von einem Glukose- bzw. Laktatmolekül wird jeweils ein Molekül Wasserstoffperoxid (H_2O_2) freigesetzt, welches an einer Platinelektrode oxidiert wird. Die dabei auftretende Spannung ist proportional zur jeweiligen Konzentration an

Glukose und Laktat. Mit Hilfe der einzelnen Messpunkte für die Glukose- und Laktatkonzentration ist es möglich die spezifische Glukoseverbrauchsrate und die spezifische Laktatbildungsrate zu bestimmen.

3.13 Spezifische Glukoseverbrauchsrate q_{Glk}

Die spezifische Glukoseverbrauchsrate wurde während aller Batch Versuche differentiell mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$q_{Glk} = \frac{c_{Glk}(t_1) - c_{Glk}(t_2)}{t_2 - t_1} \cdot \left(\frac{2}{C_{X,V}(t_1) + C_{X,V}(t_2)} \right) \quad (3.7)$$

3.14 Spezifische Laktatbildungsrate q_{Lak}

Die spezifische Laktatbildungsrate wurde während aller Batch Versuche differentiell mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$q_{Lak} = \frac{c_{Lak}(t_2) - c_{Lak}(t_1)}{t_2 - t_1} \cdot \left(\frac{2}{C_{X,V}(t_1) + C_{X,V}(t_2)} \right) \quad (3.8)$$

3.15 Zählreihen

Für die Erstellung der Zählreihen (Voruntersuchungen in statischer T-Flaschenkultivierung) wurde eine Anfangszelldichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro ml gewählt. Es wurden pro Zählreihe zwölf T-25 Flaschen verwendet, die mit jeweils 5 ml Zellsuspension aus dem gleichen Ansatz befüllt wurden.

Die Probenahme erfolgte einmal täglich. Dabei wurden jeweils zwei T-25er Flaschen aus dem Brutschrank entnommen. Aus jeder Flasche wurde eine Probe genommen. Die Proben wurden hinsichtlich der Lebend- und Gesamtzelldichte, der Viabilität, der Glukose- und Laktatkonzentration, der spezifischen Glukoseverbrauchsrate, der spezifischen Laktatbildungsrate, sowie der spezifischen Wachstumsrate untersucht. Es wurden Zählreihen von folgenden Zelllinien erstellt:

- BAF/3 p210
- BAF/3 p210 eI5A2

3.16 Maximale Zelldichte in einer T-Flasche

Die maximale Zelldichte (BA/F3 p210) wurde in statischer T-Flaschenkultivierung im Brutschrank bestimmt. Verwendet wurde eine T-75er Flasche. Die Flasche war zu Beginn des Versuchs mit 23 ml Zellsuspension gefüllt. Die angestrebte Anfangszellkonzentration lag bei $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Direkt zu Beginn des Versuchs, sowie jeden weiteren Tag wurden mit einer Pipette Proben aus der T-Flasche entnommen. Das Probenvolumen betrug jeweils 1 ml. Bestimmt wurde die Lebend- und Gesamtzelldichte, die Viabilität, die Glukose- und Laktatkonzentration. Um eine Substratlimitierung zu vermeiden, wurde das Medium vor Unterschreitung einer Glukosekonzentration von 2,5 mmol/L durch frisches Medium ersetzt. Die Zellsuspension wurde zu diesem Zweck in ein 50 ml Falcontube überführt und bei Raumtemperatur mit 1000 U/min 10 min lang zentrifugiert (Minifuge, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Nach Resuspendierung des Zellpellets wurde die Zellsuspension in eine neue T-75er Flasche überführt.

3.17 Lysispuffer

Der Lysispuffer wurde vom UKE bereitgestellt. Er setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 mM Tris-HCl (pH 7,6)
- 125 mM NaCl
- 5% Glycerol
- 0,2% NP-40 (nichtionisches Tensid)
- 1,5 mM MgCl₂
- 25 mM NaF

Der Lysispuffer wurde in Aliquots zu je 45 ml in Falcontubes eingefroren (-20°C), die unmittelbar vor der Zellernte aufgetaut und auf 4°C gehalten wurden.

Vor der Zellernte wurden jeweils 4,5 ml Natriumvanadat mit 45 ml des Puffers (4°C) versetzt. Zuvor musste das Natriumvanadat kurz aufgeköcht werden. Des Weiteren wurden pro Falcontube (45 ml) auch noch 0,5 ml Protease-Inhibitoren zugegeben.

- 1 mM Na₃VO₄
- Protease-Inhibitoren 100x

3.18 Bioreaktoren

3.18.1 Vario 1000

Der Vario 1000 (Medorex) ist ein autoklavierbarer und vielseitig einsetzbarer Rührbioreaktor, der im Laborbereich betrieben wird. Das Arbeitsvolumen liegt üblicherweise in einem Bereich von 100 - 150 ml. Das konische Kultivierungsgefäß (Innengefäß) besteht wie auch die zylindrische Aussenkammer aus Duran Glas, wodurch eine visuelle Kontrolle des Kultivierungsprozesses ermöglicht wird. Die Innenkammer wird über einen Doppelmantel (Raum zwischen der Außen- und Innenkammer) mit Hilfe eines Wasserbads temperiert. Der Deckel des Bioreaktors besteht aus dem Kunststoff Polyetheretherketon (PEEK) und beinhaltet mehrere Anschlussstellen, die unter anderem für die Zu- und Abluftleitung, die pH- und pO₂-Sonde und die Rührerwelle genutzt werden können. Am unteren Ende der Rührerwelle, die magnetisch gekoppelt über eine Steuereinheit betrieben wird, befindet sich der Rührer. Die pH-Wert-Messung und Regelung erfolgte mithilfe einer pH-Wert Regeleinheit (Bioengineering, Schweiz). Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff (pO₂-Konzentration) wurde mit Hilfe eines Messverstärkers gemessen (Bioengineering, Schweiz).

3.18.2 Biostat B

Der Biostat B (Sartorius) ist ein autoklavierbarer und ebenfalls vielseitig einsetzbarer Rührbioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 5 L. Der Bioreaktor der aus einem doppelwandigen Duran-Glasgefäß besteht, wird mithilfe eines Wasserbads temperiert. Der Bioreaktor ist durch einen Deckel aus Edelstahl, der eine Vielzahl von Anschlüssen beinhaltet (pH- und pO₂-Sonde, Temperaturfühler, Zuluftleitung, Rührerwelle u.a.) verschließbar. Die Rührerwelle, die mit einem dreistufigen 6-Blatt Scheibenrührer ausgestattet war, wurde von oben über einen Motor mechanisch gekoppelt betrieben. Die digitale Kontrolleinheit (DCU), über die normalerweise die Prozesssteuerung und -regelung erfolgt, wurde lediglich für die Steuerung des Rührers eingesetzt. Die pH-Wert-Regeleinheit, sowie der pO₂-Messverstärker stammten von Bioengineering (Schweiz).

3.18.3 Temperierung

Da die beiden Bioreaktoren nicht mit einem Temperaturfühler ausgestattet waren, über den eine Kontrolle der Temperatur im Bioreaktor möglich gewesen wäre, wurden geeignete Temperatureinstellungen an einem externen Wasserbad ermittelt, die zu der Kultivierungstemperatur von 37°C geführt haben.

Beide Bioreaktoren wurden über ein an den Doppelmantel angeschlossenes externes Wasserbad mit Temperaturregelung (Haake DC1) temperiert. Um die geforderte Kultivierungstemperatur von 37°C zu einzustellen, wurden in Abhängigkeit des eingesetzten Kultivierungssystems folgende Temperaturen am Wasserbad eingestellt.

Tabelle 3.1 Zeigt die Temperatureinstellungen am Wasserbad, die zu den gewünschten Kultivierungstemperaturen geführt haben

Bioreaktor	Temperatur am Wasserbad
Vario 1000	37,4°C
Biostat B	37,7°C

In beiden Fällen führten die Temperatureinstellungen bei ausreichender Pumpleistung des Wasserbads zu der geforderten Kultivierungstemperatur von 37°C.

3.18.4 Begasung

Die Kulturbrühe des Vario 1000 und des Biostat B wurde über einen Sterilfilter submers (Blasenbegasung) begast. Das zur Begasung eingesetzte Mischgas setzte sich aus Prozessluft, Stickstoff und Kohlendioxid zusammen. Die Begasungsraten wurden manuell mithilfe von Rotametern eingestellt und mit eigens dafür angefertigten Durchflussmesssäulen überprüft (siehe Abb. 3.1). Bei den Durchflussmesssäulen handelte es sich um serologische Pipetten mit Volumenskalisierung, die zum Zweck der Volumenstrommessung umfunktioniert wurden. Der Vordruck der zuführenden Gasleitungen lag bei 0,5 bar.



Abb. 3.1. Rotameter mit den dazugehörigen Durchflussmesssäulen, die für die Bestimmung und Einstellung der Begasungsraten eingesetzt wurden

Um Flüssigkeitsverluste zu minimieren, wurde die Zuluft des Vario 1000 über eine Begasungsfritte durch eine mit sterilem Wasser befüllte Flasche geleitet und befeuchtet. Das Begasungsrohr (offenes Rohr), über das das Gas direkt in die Zellsuspension eingeleitet wurde, endete knapp überhalb des Rührers, so dass die Luftblasen bei ihrem Aufstieg an die Oberfläche vom Rührer nicht zerkleinert (dispergiert) wurden.

Beim Biostat B wurde die Zellsuspension über einen Begasungsring, der sich unterhalb des Rührers befand, begast. Der Begasungsring enthielt auf der Oberseite mehrere kleine Bohrlöcher, über die Luftbläschen in die Kulturbrühe entlassen wurden. Da dieser Bioreaktor über einen Abluftkühler (ca. 10°C) verfügte, war es nicht nötig die Zuluft zu befeuchten.

3.18.5 Durchmischung

Die Durchmischung (Homogenisierung des Reaktorinhalts) erfolgte im Vario 1000 mithilfe eines Propellerrührers, der sich am Ende der Rührwelle befand, die von oben magnetisch gekoppelt über einen Motor betrieben wurde. Der Propellerrührer wurde so eingesetzt, dass sich ein nach oben gerichtetes axiales Strömungsprofil ausbildete. Im Biostat B erfolgte die Durchmischung mit Hilfe eines dreistufigen 6-Blatt Scheibenrührers (radiales Strömungsprofil) in Kombination mit Strömungsbrechern (Verbesserung der Durchmischung). Der Antriebsmotor, der über die DCU gesteuert wurde, wurde von oben mechanisch an die Rührwelle angekoppelt.

3.18.6 pH-Messung und Regelung

Der pH-Wert der Zellsuspension wurde in beiden Kultivierungssystemen (Vario 1000 und Biostat B) während der Kultivierungsversuche mit Hilfe autoklavierbarer pH-Sonden (Broadley-James, USA), die an einer Regeleinheit (Bioengineering Schweiz) angeschlossen wurden, gemessen. Vor jeder Fermentation wurden die pH-Sonden mit Kalibrierpuffer (pH-Werte: 4,01 und 7,01) kalibriert, in den Deckel eingebaut und anschließend autoklaviert. Die Regelung bzw. die Anhebung des pH-Wertes erfolgte mithilfe der pH-Wert-Regeleinheit (Bioengineering, Schweiz) durch automatische Zugabe von 0,5 M Na₂CO₃-Lösung. Eine Verringerung des pH-Werts wurde durch manuelle Einstellung (Erhöhung) der CO₂-Begasungsrate bzw. des CO₂ Partialdrucks in der Zuluft erreicht.

3.18.7 pO₂-Messung und Regelung

Die gelöstsauerstoffkonzentration der Zellsuspension wurde während der Kultivierungsversuche in beiden Bioreaktoren mithilfe von amperometrischen und autoklavierbaren Membran-Sauerstoffsonden (Clark-Typ, Mettler Toledo, Schweiz) an einem pO₂-Meßumformer (Bioengineering, Schweiz) gemessen.

Die pO₂-Sonde wurde vor dem Autoklavieren kalibriert (Zwei-Punkt-Kalibrierung). Dazu wurde der Bioreaktor mit Modellmedium befüllt. Das Modellmedium bestand aus vollentsalztem Wasser (VE-Wasser), in dem Kaliumdihydrogenphosphat gelöst wurde ($c_{(KH_2PO_4)}=0,14$ g/L). Das Modellmedium wurde auf 37°C erwärmt und bei hoher Rührerdrehzahl solange mit Stickstoff begast, bis der gelöste Sauerstoff restlos verdrängt war (ca 0%). Anschließend wurde mit Prozessluft (Sauerstoffgehalt

20,9%) bis zur Einstellung des Sauerstoff-Sättigungsgleichgewichts begast (ca 100%). Nach erfolgter Autoklavierung des Kultivierungssystems wurde das Modellmedium bei 37°C erneut mit Stickstoff begast und der Nullpunkt rekali­briert.

Die Regelung des pO_2 erfolgte durch manuelle Einstellung der Begasungsraten der Zuluft bzw. durch Erhöhung oder Verringerung der Sauerstoffkonzentration in der Zuluft.

3.18.8 Inbetriebnahme der Bioreaktoren

Die Bioreaktoren Vario 1000 und Biostat B wurden für den Betrieb vorbereitet. Hierbei ging es im Wesentlichen darum eine konstante Kultivierungstemperatur von 37°C sicherzustellen. Da die Temperierung beider Bioreaktoren über ein externes Wasserbad mit Temperaturregelung erfolgte, mussten im Vorfeld der Kultivierungsversuche in Abhängigkeit vom eingesetzten Bioreaktor die Temperatureinstellungen am Wasserbad gefunden werden, die zur Einstellung der gewünschten Kultivierungstemperatur im Bioreaktor führten. Hierzu wurden die Bioreaktoren entsprechend ihres Arbeitsvolumens mit Leitungswasser befüllt und mit laufendem Rührer, ohne Begasung über den Doppelmantel temperiert. Die Temperatur am Wasserbad wurde dabei solange gesteigert, bis sich in den Bioreaktoren eine Gleichgewichtstemperatur von 37°C eingestellt hatte. Die Temperaturmessung erfolgte hierbei mit Hilfe eines Eichthermometers. Temperaturschwankungen der Raumluft, die im Tag-Nacht-Wechsel auftraten hatten keinen Einfluss auf die Kultivierungstemperatur. Des Weiteren wurden folgende Reaktorkomponenten überprüft bzw. gewartet:

- Alle O-ringe wurden geprüft, gegebenenfalls gewechselt und eingefettet
- Einzelkomponenten wie z.B. Blindstopfen, Begasungsrohre, Probenahmeleitung, etc. wurden geprüft und gegebenenfalls ersetzt
- pO_2 -Messsystem (Membranwechsel/Elektrolytwechsel)
- pH-Messsystem (Reinigung der pH-Sonde mit Enzymlösung)
- Rührer (Gleitringdichtung im Biostat B überprüft)

3.18.9 Druckhaltetest

Der Druckhaltetest (Integritätsnachweis des Systems) wurde nach Inbetriebnahme der beiden Bioreaktoren durchgeführt um eventuelle Undichtigkeiten, der Systeme aufzudecken.

Die Bioreaktoren wurden mit allen notwendigen Anschlussteilen wie z.B. der pO_2 - und pH-Sonde (analog zum späteren Betrieb) bestückt. Alle übrigen, ungenutzten Anschlussstellen des Deckels wurden mit Blindstopfen versehen. Bis auf den Abluftleitung wurden alle zu- und abführenden Schlauchleitungen mit Schlauchklemmen verschlossen. Über den Abluftfilter wurde anschließend Prozessluft mit einem Überdruck von 0,4 bar in den Bioreaktor eingeleitet. Anschließend wurde die Abluftleitung so abgeklemmt, dass der Druck nicht entweichen konnte. Um mögliche Undichtigkeiten aufzuspüren, wurden alle Anschlussstellen mit Seifenwasser benetzt. Sofern eine Undichtigkeit vorlag war dies daran zu erkennen, dass an dieser Stelle Seifenbläschen hervortraten. War dies nicht der Fall, so war der Druckhaltetest als erfolgreich und das System als abgedichtet anzusehen.

3.18.10 Sterilisation

Die Bioreaktoren wurden vor dem Autoklavieren entsprechend ihres Arbeitsvolumens mit Modellmedium befüllt (Siehe 3.18.7). Nachdem alle für den Kultivierungsversuch notwendigen Bauteile (Reaktorzubehör) an den Bioreaktor angeschlossen wurden und der Bioreaktor bis auf die Abluftleitung verschlossen war (alle Zuleitungen wurden verschlossen bzw. mit Schlauchklemmen abgeklemmt, noch offene Anschlüsse wurden mit Blindstopfen versehen), wurde der Bioreaktor in einen Autoklaven überführt und unter Einsatz eines entsprechenden Referenzgefäßes (beim Autoklavieren des Biostat B wurde eine mit 5 L VE-Wasser gefüllte Flasche als Referenzgefäß eingesetzt, beim Vario 1000 waren es ca. 300 ml VE-Wasser in einer entsprechend kleineren Flasche) in gespanntem und gesättigtem Dampf sterilisiert.

Der Vario 1000 (300 ml Modellmedium) wurde bei 121°C für 20 min sterilisiert. Der Biostat B (5 L Modellmedium) wurde aufgrund des größeren Volumens bei 121°C für 35 min sterilisiert.

Das restliche Reaktorzubehör wie z.B. die Probenahmeflasche, Inokulumflasche, Waschflasche (mit VE-Wasser gefüllte Flasche zur Befeuchtung der Zuluft), Flasche für die Lauge, Auffangflaschen bzw. Ernteflaschen, Silikonschläuche usw. wurden

separat im Autoklaven sterilisiert und nach der Sterilisation an den Bioreaktor angeschlossen.

3.18.11 Sterillauf

Bevor die beiden Bioreaktoren für die Kultivierungsversuche eingesetzt werden konnten, mussten diese nach dem Autoklavieren hinsichtlich ihrer Sterilität untersucht werden. Nachdem alle für den Sterillauf notwendigen Komponenten wie z.B. Zuluftflasche, Mediumflasche, Probenahmeflasche u.a. an den Bioreaktor angeschlossen wurden, wurde das Modellmedium aus dem Bioreaktor entfernt und durch antibiotikafreies Medium ersetzt, das Phenolrot als pH-Indikator enthielt. Bei dem dabei eingesetzten Medium handelte es sich um bereits abgelaufenes DMEM-Medium (Dulbecco's modified Eagle's Medium), das sich für diesen Zweck jedoch noch gut eignete. Die Bioreaktoren wurden während des Sterillaufs mit der Kultivierungstemperatur von 37°C betrieben. Begast wurde mit einem Gasgemisch, das aus 95% Prozessluft und 5% CO₂ bestand. Die Begasungsrate bewegte sich dabei unabhängig vom eingesetzten Bioreaktor in einem Bereich von 0,005–0,05 vvm. Die Rührerdrehzahl betrug im Vario 1000 während der gesamten Dauer des Sterillaufs 140 U/min, im Biostat B 100 U/min. Der Sterillauf erstreckte sich über einen Zeitraum von 3 - 4 Tagen. Dabei wurde die gelöste Konzentration an Sauerstoff, sowie der pH-Wert überwacht. Über die Probenahmeflasche wurde täglich eine Probe genommen und hinsichtlich ihrer Glukose- und Laktatkonzentration untersucht.

War das Medium nach dem Sterillauf immer noch klar und rot, so konnte davon ausgegangen werden, dass keine Kontamination vorlag und das System steril geblieben ist.

4 Kultivierungsversuche

4.1 Vorversuche im Vario 1000

4.1.1 Fed-Batch

Für den Fed-Batch Versuch wurde die Zelllinie BA/F3 p210 verwendet. Die angestrebte Anfangslebenszellendichte lag bei $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Das Kulturvolumen betrug zu Beginn des Versuchs 345 ml. Die Rührerdrehzahl wurde über die Steuerungseinheit auf 150 U/min eingestellt. Die angestrebte Konzentration an gelöstem Sauerstoff betrug 30 - 50% des bei der Kalibrierung ermittelten Sättigungswerts der Gelöstsauerstoffkonzentration. Der pH-Wert wurde geregelt und sollte sich in einem Bereich zwischen 6,9 - 7,4 bewegen (Sollwert 7,2). Die Kultivierungstemperatur, die über das Wasserbad eingestellt wurde, betrug 37°C.

Das Zufütterungsmedium sollte vor Unterschreitung einer Glukosekonzentration von 2 mmol/L mit einer kalibrierten Schlauchpumpe (Medorex) satzweise zugegeben werden. Dabei sollte die Glukosekonzentration im Kulturmedium nach Zugabe des Zufütterungsmediums auf einen Bereich zwischen 7 - 9 mmol/L angehoben werden. Für den Versuch wurden 100 ml Zufütterungsmedium bereitgestellt. Das Volumen an Zufütterungsmedium, das mit der kalibrierten Schlauchpumpe zugegeben wurde, wurde mithilfe folgender Gleichung ermittelt:

$$V_{Zu} = V_{alt} \cdot \frac{c_{Glk,neu} - c_{Glk,alt}}{c_{Glk,Zu} - c_{Glk,neu}} \quad (4.1)$$

Um zu vermeiden, dass es über Nacht zu einer Glukoselimitierung kommt, wurde das Zufütterungsmedium quasi-kontinuierlich zugegeben, d.h. die Pumpe wurde so programmiert, dass sie sich nach festgelegten Pausenzeiten immer wieder einschaltete und für einen bestimmten Zeitraum eine definierte Menge des Zufütterungsmediums in den Bioreaktor gefördert hat. Das Volumen an Zufütterungsmedium, das so über Nacht bis zum nächsten Morgen zugegeben wurde, wurde im Vorfeld mit Hilfe folgender Rechnung bestimmt:

$$V_{Zu,Nacht} = \frac{\frac{c_{Glk}(t_2) - c_{Glk}(t_1)}{t_2 - t_1} \cdot V(t_1) \cdot \Delta t_{Nacht}}{c_{Glk,Zu}}} \quad (4.2)$$

Die Probennahme erfolgte jeden Tag mindestens zweimal (morgens und nachmittags). Dabei wurde bei jeder Probenahme ein Vorlauf genommen, der verworfen wurde. Insgesamt wurden bei jeder Probennahme, zusammen mit dem Vorlauf ca. 5 ml Zellsuspension entnommen.

Die spezifische Glukoseverbrauchsrate wurde nach erfolgter Zugabe einer definierten Menge an Zufütterungsmedium mit folgender Gleichung bestimmt:

$$q_{Glk} = \frac{c_{Glk}(t_1) \cdot V_{alt} - ((c_{Glk}(t_2) \cdot (V_{Zu} + V_{alt})) - (c_{Glk,Zu} \cdot V_{Zu}))}{t_2 - t_1} \cdot \left(\frac{2}{C_X(t_1) \cdot V_{alt} + C_X(t_2) \cdot (V_{alt} + V_{Zu})} \right) \quad (4.3)$$

Die spezifische Laktatbildungsrate wurde nach erfolgter Zugabe einer definierten Menge an Zufütterungsmedium mit folgender Gleichung bestimmt:

$$q_{Lak} = \frac{((c_{Lak}(t_2) \cdot (V_{Zu} + V_{alt})) - (c_{Lak,Zu} \cdot V_{Zu})) - c_{Lak}(t_1) \cdot V_{alt}}{t_2 - t_1} \cdot \left(\frac{2}{C_X(t_1) \cdot V_{alt} + C_X(t_2) \cdot (V_{alt} + V_{Zu})} \right) \quad (4.4)$$

Die Wachstumsrate wurde nach erfolgter Zugabe einer definierten Menge an Zufütterungsmedium mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\mu = \frac{\ln \frac{C_X(t_2) \cdot \left(\frac{V_{alt} + V_{Zu}}{V_{alt}} \right)}{C_X(t_1)}}{t_2 - t_1} \quad (4.5)$$

Der schematische Versuchsaufbau für den Fed-Batch Versuch ist in nachfolgender Abb. 4.1 dargestellt. Während der Kultivierung wurden im Bioreaktor der pH-Wert und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff gemessen und geregelt. Die Kultivierungstemperatur wurde über ein an den Doppelmantel angeschlossenes Wasserbad eingestellt.

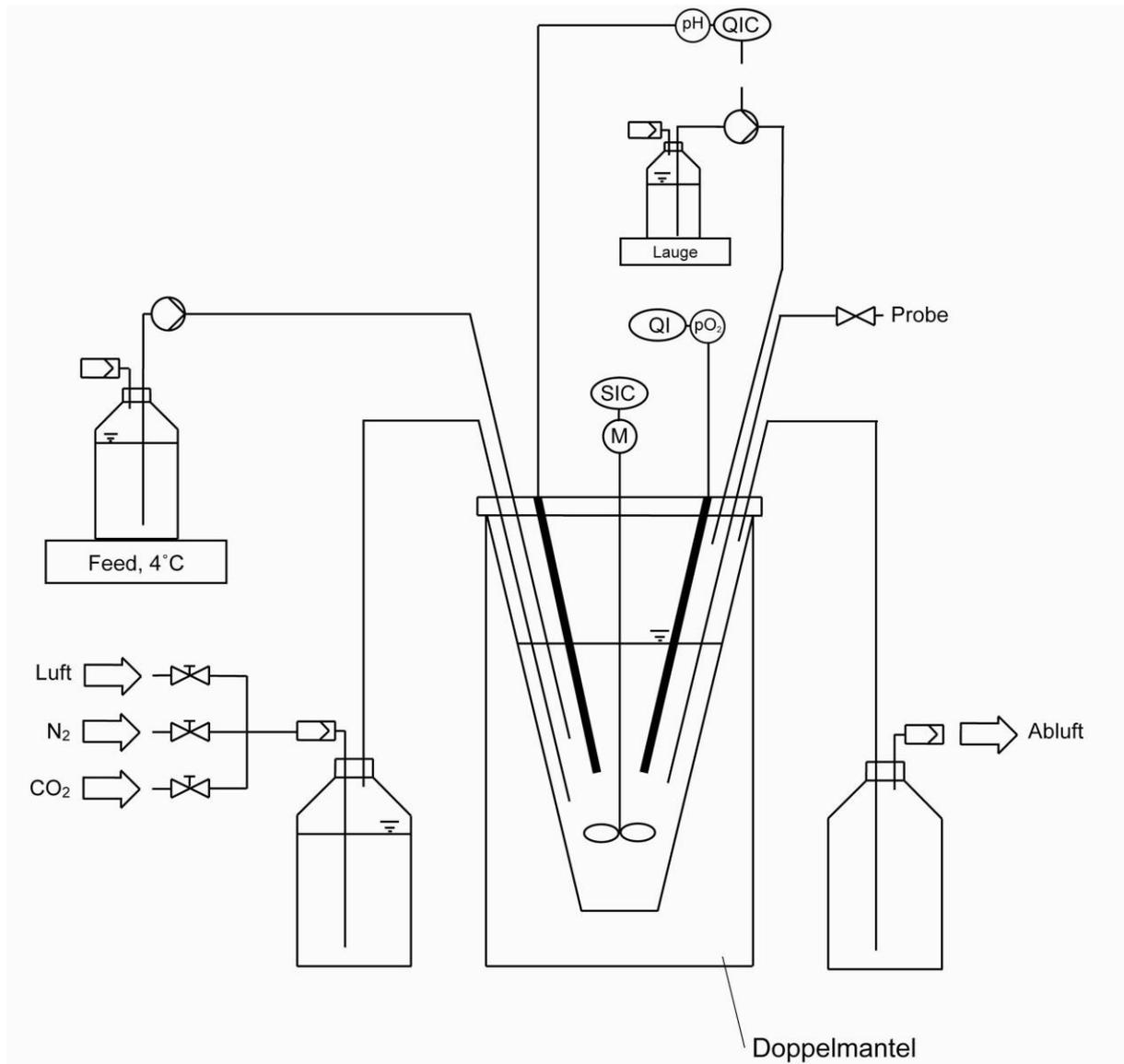


Abb. 4.1 Schematischer Versuchsaufbau für den Fed-Batch Versuch im Vario 1000.
Die Kultivierungstemperatur wurde mithilfe eines an den Doppelmantel angeschlossenen Wasserbads eingestellt.

In diesem Versuch wurden die Zellen nach Beendigung der Kultivierung nicht weiter verwendet, d.h. im Anschluß erfolgte keine Abtrennung der Zellen und auch keine Zellyse. Die Zellen wurden durch anschließendes Autoklavieren inaktiviert.

4.1.2 Kontinuierlicher Betrieb

Im Vario 1000 wurden zwei Kultivierungsversuche im kontinuierlichen Betrieb durchgeführt. Im ersten Versuch wurde die BA/F3 p210 Zelllinie eingesetzt. Dabei betrug das konstante Kulturvolumen 100 ml. Im zweiten Versuch wurde die BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie eingesetzt. Das konstante Kulturvolumen betrug in diesem Versuch 400 ml.

Die Verdünnungsrate D wurde in beiden Versuchen mithilfe der maximalen Wachstumsrate μ_{\max} , die während der, der kontinuierlichen Betriebsweise vorangehenden Batch-Phase ermittelt wurde (der Versuch wurde jeweils als Batch gestartet), bestimmt. Im Versuch mit 100 ml betrug die Verdünnungsrate 80% der maximalen Wachstumsrate. Im Versuch mit 400 ml betrug die Verdünnungsrate 95% der maximalen Wachstumsrate.

Der Zulaufstrom F wurde während des kontinuierlichen Betriebs mit folgender Formel bestimmt:

$$F = D \cdot V \quad (4.6)$$

Die spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate der kontinuierlich geführten Prozesse wurde unter der Annahme eines Fließgleichgewichts ($\mu(D)=D$) mit Hilfe folgender Gleichungen bestimmt:

$$q_{Glk}(D) = \frac{c_{Glk,0} - \bar{c}_{Glk}(D)}{X_v(D)} D \quad (4.7)$$

$$q_{Lak}(D) = \frac{\bar{c}_{Lak} - c_{Lak,0}(D)}{X_v(D)} D \quad (4.8)$$

Die Wachstumsrate $\mu(t)$ wurde während der kontinuierlichen Betriebsweise des Bioreaktors mit folgender Formel bestimmt:

$$\mu = \frac{\ln \frac{C_X(t_2)}{C_X(t_1)}}{(t_2 - t_1)} + D \quad (4.9)$$

In Abb. 4.2 ist der schematische Versuchsaufbau des Vario 1000 bei kontinuierlichem Betrieb dargestellt.

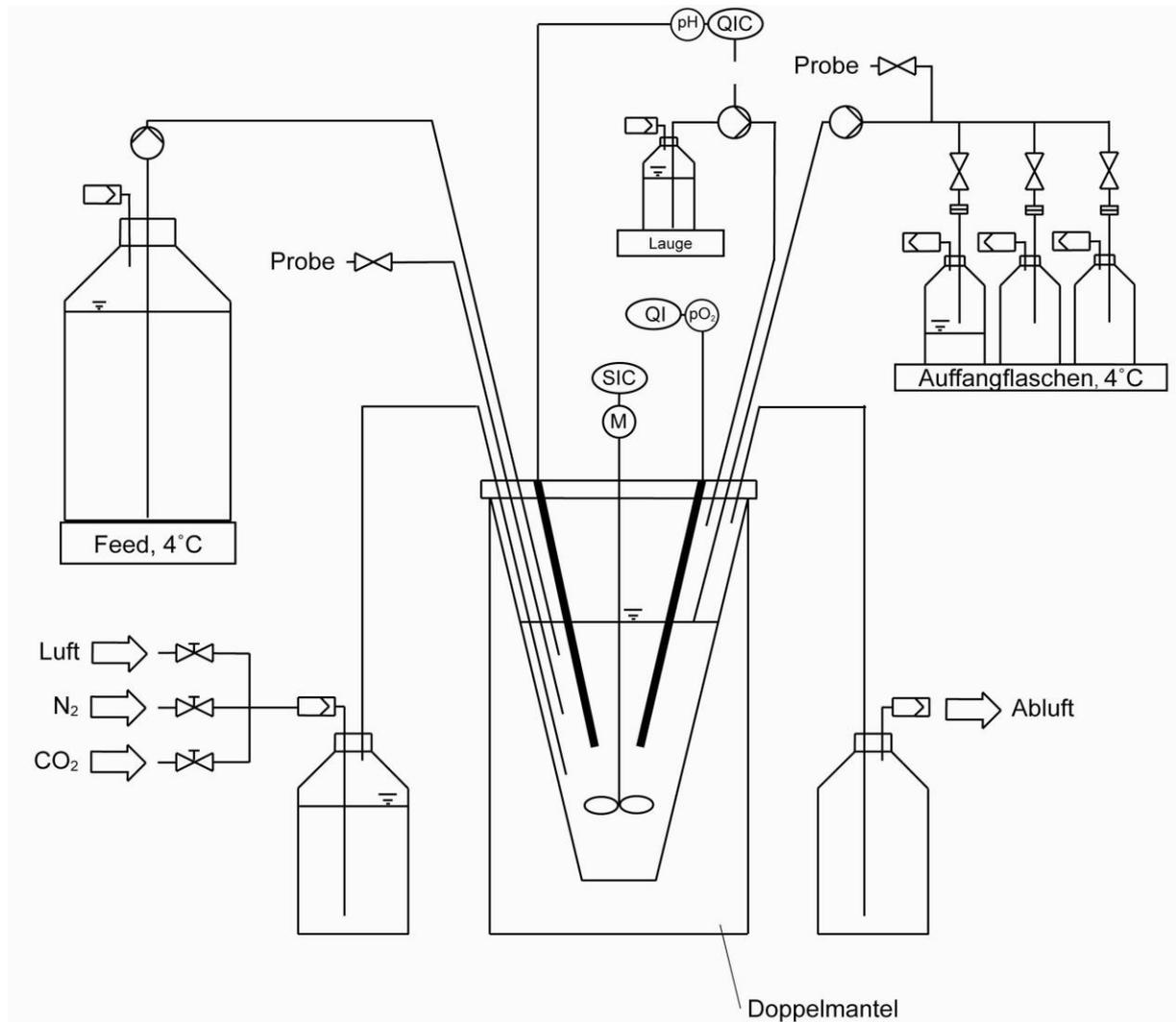


Abb. 4.2 Schematischer Versuchsaufbau für die kontinuierliche Betriebsweise im Vario 1000. Das frische Medium wurde bei 4°C gekühlt, ebenso die aufgefangene Zellsuspension in den Ernteflaschen

4.1.2.1 Versuch mit 100 ml Kulturvolumen

Für diesen Versuch wurde die Zelllinie BA/F3 p210 verwendet. Der Prozess wurde zunächst mit einem Kultivierungsvolumen von 115 ml als Batch gestartet. Die dabei angestrebte Zellkonzentration betrug $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Die angestrebte Konzentration an gelöstem Sauerstoff betrug 30 - 50% des bei der Kalibrierung ermittelten Sättigungswerts der Gelöstsauerstoffkonzentration. Der pH-Wert wurde geregelt und

sollte sich in einem Bereich zwischen 6,9 - 7,4 bewegen (Sollwert 7,2). Die Kultivierungstemperatur, die über das Wasserbad eingestellt wurde, betrug 37°C.

Die Rührerdrehzahl betrug während des gesamten Versuchs durchgehend 150 U/min. Während des Batchs wurden die Proben mithilfe einer Probenahme flasche direkt aus dem Bioreaktor entnommen. Dabei wurden zusammen mit dem Vorlauf bei jeder Probe ca. 5 ml aus dem Bioreaktor entnommen. Während des kontinuierlichen Betriebs wurden die Proben aufgrund des geringen Kultivierungsvolumens von 100 ml (größere Volumenänderungen des Kultivierungsvolumens sollten vermieden werden) direkt aus der Ablaufleitung entnommen, in die zu diesem Zweck im Vorfeld ein Probenahmeanschluss gelegt wurde. In Abb. 4.3 ist der Probenahmeanschluss, über den die Proben während des kontinuierlichen Betriebs mithilfe steriler Einwegspritzen entnommen wurden, dargestellt.



Abb. 4.3 Foto vom Probenahmeanschluss

Das Volumen an frischem Medium für den Zulauf betrug ca. 400 ml, also das etwa 4-fache des konstanten Kulturvolumens.

Nach Absinken der Glukosekonzentration auf unterhalb von 2 mmol/L wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet. Die Schlauchpumpe (Medorex) wurde eingeschaltet und frisches Medium in den Bioreaktor eingeleitet. Um das Kulturvolumen während des kontinuierlichen Betriebs konstant auf 100 ml zu halten, wurde über ein Ablaufrohr, dessen offenes Ende auf entsprechender Höhe des Kultivierungsgefäßes eingesetzt war, kontinuierlich Zellsuspension abgepumpt. Die Pumprate des Ablaufs wurde so eingestellt, dass sie in etwa dem doppelten der Pumprate des Zulaufs entsprach. An die Ablaufleitung waren insgesamt drei 200 ml Schottflaschen angeschlossen, die der Reihe nach mit Zellsuspension befüllt wurden. Während die Flaschen mit Zellsuspension befüllt wurden, standen diese in einer mit Eis gefüllten Styroporbox, so dass die darin aufgefangene Zellsuspension heruntergekühlt wurde. Sobald eine Flasche voll war, wurde die Pumpe für den Ablauf kurzzeitig ausgeschaltet. Danach wurde die Zulaufleitung der befüllten Flasche abgeklemmt, so

dass diese steril vom System abgetrennt werden konnte. Die befüllten Flaschen wurden anschließend im Kühlraum (4°C) gelagert.

Nach Beendigung des Kultivierungsversuchs sollten die unterschiedlich lang gelagerten Zellen der Flaschen 1 - 3 hinsichtlich ihrer Viabilität, bzw. der Integrität der Zellmembran untersucht werden.

4.1.2.2 Versuch mit 400 ml Kulturvolumen

Verwendet wurde für diesen Versuch die Zelllinie BA/F3 p210 eIF5A-2. Der Prozess wurde zunächst mit einem Kulturvolumen von 420 ml als Batch gestartet. Die angestrebte Anfangszellkonzentration betrug $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Die Rührerdrehzahl betrug während des gesamten Versuchs durchgehend 170 U/min. Die angestrebte Konzentration an gelöstem Sauerstoff betrug 30 - 50% des bei der Kalibrierung ermittelten Sättigungswerts der Gelöstsauerstoffkonzentration. Der pH-Wert wurde geregelt und sollte sich in einem Bereich zwischen 6,9 - 7,4 bewegen (Sollwert 7,2). Die Kultivierungstemperatur, die über das Wasserbad eingestellt wurde betrug 37°C . In der Zeit, in der der Versuch als Batch lief, wurden die Proben über eine Probenahmeflasche direkt aus dem Bioreaktor entnommen. Das Probenvolumen betrug dabei zusammen mit dem Vorlauf jeweils 5 ml.

In Abb. 4.4 ist ein Foto des Versuchs für die kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml Kultivierungsvolumen im Vario 1000 zu sehen.

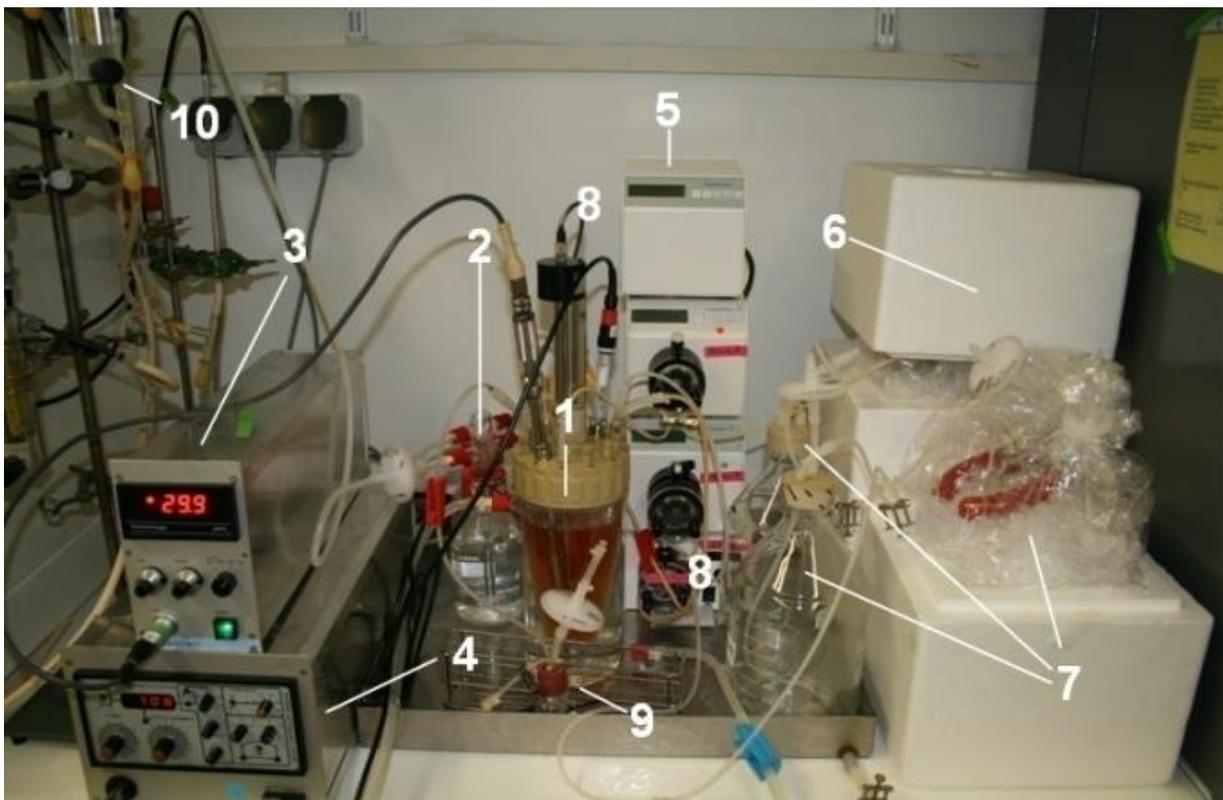


Abb. 4.4 Ein Foto vom Versuchsaufbau kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml mit allen wesentlichen Elementen (1) Vario 1000, (2) Zu- und Abluftflasche, (3) pO_2 -Messverstärker, (4) pH-Mess- und Regeleinheit, (5) Steuerungseinheit für den Rührer, (6) gekühltes Medium für den Zulauf, (7) Auffangflaschen für die Zellsuspension, (8) Schlauchpumpen für Zu- und Ablauf, sowie die Base, (9) Probenahmeflasche, (10) Rotameter mit Durchflussmesssäule

Der kontinuierliche Betrieb sollte vor Unterschreitung einer Glukosekonzentration von 2 mmol/L durch Aktivierung der Zu- und Ablaufpumpe gestartet werden. Um das Kulturvolumen während des kontinuierlichen Betriebs konstant auf 400 ml zu halten, wurde über ein Ablaufrohr, dessen offenes Ende auf entsprechender Höhe eingesetzt war, kontinuierlich Zellsuspension abgepumpt. Die Pumprate des Ablaufs war dabei deutlich höher eingestellt, als die des Zulaufs. Die abgepumpte Zellsuspension wurde über die Ablaufleitung in gekühlte 2 L Schott-Auffangflaschen geleitet (die Flaschen wurden in einer mit Eis gefüllten Styroporbox gelagert). Insgesamt waren drei Auffangflaschen angeschlossen. Proben des kontinuierlichen Betriebs wurden über die, in die Ablaufleitung eingebaute Probenahmeleitung (Abb.4.3) entnommen. Insgesamt standen für den Zulauf etwa 3,5 L Medium zur Verfügung. Für diesen Versuch stand damit für die Zufütterung das ca. 9-fache Volumen des konstanten Arbeitsvolumens zur Verfügung.

In diesem Versuch wurde die Pumprate für den Zulauf im Verlauf der Kultivierung geringfügig verändert um damit auf Änderungen der Glukosekonzentration zu reagieren. Die Glukosekonzentration sollte auf ca. 2 mmol/L gehalten werden und den Wert nach Möglichkeit nicht unterschreiten.

Nach Beendigung des Versuchs sollten die Zellen aus den drei Auffangflaschen abzentrifugiert und in kaltem und sterilem PBS (pH 7,2) gewaschen werden. Anschließend sollten die Zellen in gekühltem Zustand ins UKE transportiert werden um dort weiterverarbeitet zu werden.

4.2 Hauptversuch im Biostat B

4.2.1 Batch-Prozess

Insgesamt wurden im Biostat B drei Batch-Prozesse durchgeführt (Nr.1 - Nr.3). Die Batch-Versuche wurden mit der Zelllinie BA/F3 p210 eIF5A-2 durchgeführt. In der nachfolgenden Abb. 4.5 ist der schematische Aufbau für die Batch-Versuche dargestellt.

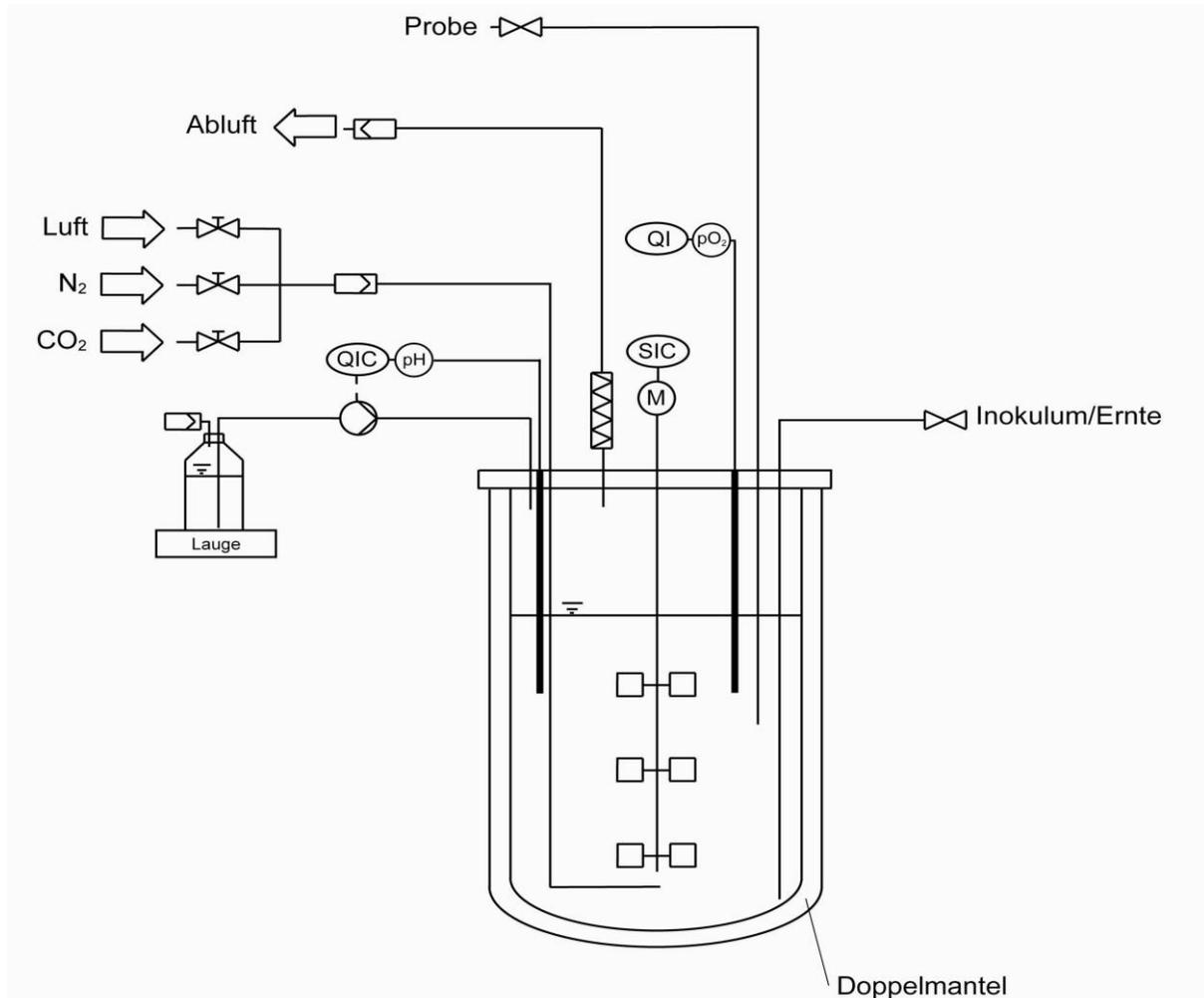


Abb. 4.5 Schematischer Aufbau für den Versuch Batch-Prozess im Biostat B. Die Kultivierungstemperatur wurde über ein an den Doppelmantel angeschlossenes Wasserbad eingestellt

Die Rührerdrehzahl lag während aller drei Batch-Prozesse durchgehend bei 100 U/min. Die Begasung wurde erst nach Unterschreitung eines bestimmten pO_2 -Werts, der bei ca. 50% des Sauerstoffsättigungswerts lag, aktiviert. Die angestrebte Konzentration an gelöstem Sauerstoff betrug 30 - 50% des bei der Kalibrierung ermittelten Sättigungswerts der Gelöstsauerstoffkonzentration. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff wurde ausschließlich mithilfe der Begasungsrate manuell über

Rotameter eingestellt und möglichst konstant gehalten. Die CO₂-Konzentration in der Zuluft betrug etwa 5% und wurde bei starkem Anstieg des pH-Werts manuell über den entsprechenden Rotameter erhöht.

Der pH-Wert wurde geregelt und sollte sich in einem Bereich zwischen 6,9 - 7,4 bewegen (Sollwert 7,2). Die Kultivierungstemperatur, die über das Wasserbad eingestellt wurde, betrug 37°C. In Abb. 4.6 ist der Versuchsaufbau einer der drei Batch Versuche dargestellt.

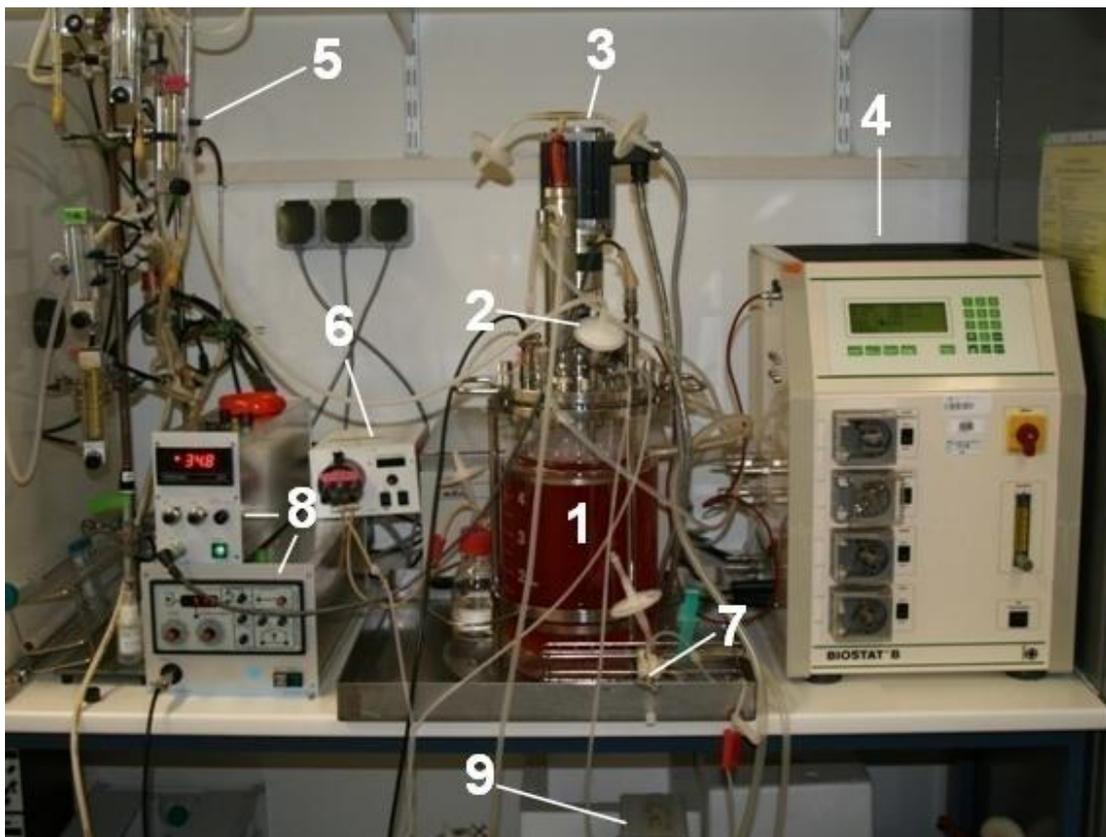


Abb. 4.6 Foto vom Versuchsaufbau für die Batch-Kultivierungsversuche im (1) Biostat B (2) Zuluftfilter, (3) Abluftkühler mit Abluftfiltern, dahinter der Motor für den Rührer, (4) DCU, (5) Rotameter mit Durchflussmesssäulen, (6) Schlauchpumpe für die Base, (7) Probenahme-flasche, (8) pO₂- und pH-Messung, (9) unter dem Tisch befindet sich das Wasserbad für die Temperierung des Bioreaktors

4.2.2 Zellernte und Zellyse

Nach Abbruch der Batch-Prozesse (Biostat B) wurde vor der Zellernte die Begasung durch Schließung der Rotameter gestoppt. Die Zuluft- und Probenahmeleitung wurden mit einer Schlauchklemme abgeklemmt und somit verschlossen. Der Schlauch, über den die Zuluft in den Bioreaktor eingeleitet wurde, wurde an den Abluftfilter angeschlossen, so dass durch Öffnen einer der Rotameter ein Druck im Inneren des Bioreaktors aufgebaut werden konnte. Über die Hauptleitung (ein am unteren Ende offenes Rohr, das bis auf den Boden des Bioreaktors hinunterreichte) konnte die Zellsuspension mithilfe des im Bioreaktor anliegenden Drucks aus dem Bioreaktor befördert werden (insteril). Der Rührer wurde erst ausgeschaltet, nachdem der Bioreaktor vollständig entleert war. Die Zellsuspension wurde auf insgesamt zwölf sterile Zentrifugen-Flaschen mit einem Nennvolumen von 500 ml (Beckman Coulter) aufgeteilt und in der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter) bei Raumtemperatur und 600 x g 12 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets durch Zugabe von kaltem und sterilem PBS (4°C, pH 7,2) resuspendiert bzw. gewaschen. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen gekühlt (auf Eis) gelagert. Zum Waschen der Pellets, die aus 5 L Zellsuspension gewonnen wurden, wurden 2,5 L PBS, also die Hälfte des Ausgangsvolumens eingesetzt. Die gewaschenen Zellen wurden erneut zentrifugiert (Avanti J-25, 4°C, 600 x g, 12 min). Danach wurde das Zellpellet im Lysispuffer (4°C) resuspendiert und 15 min unter gelegentlichem schütteln inkubiert (4°C). Dabei wurde pro $5 \cdot 10^7$ Zellen 1 ml Lysispuffer eingesetzt. Danach wurde das Lysat auf 16 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und erneut zentrifugiert (Biofuge Stratos (Heraeus) 4°C, 30.000 x g, 60 min). Das geklärte Lysat, indem sich die Zielproteine befanden, wurde anschließend auf mehrere 50 ml Falcontubes aufgeteilt, in einer Styroporbox auf Eis gelegt und schnellstmöglich ins UKE transportiert und dort weiterverarbeitet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Zählreihen

In den nachfolgenden Diagrammen ist der Wachstumsverlauf der beiden Zelllinien (BAF3 p210 und BA/F3 p210 eIF5A-2), die in T-25er Flaschen kultiviert wurden, graphisch dargestellt. Die LZD lag zu Beginn des Versuchs bei $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

Wachstumsverlauf

In Abb. 5.1 und Abb. 5.2 ist der Verlauf der LZD sowohl in semilogarithmischer als auch in normaler Auftragung dargestellt. Betrachtet man den Wachstumsverlauf der Zellen in semilogarithmischer Auftragung fällt auf, dass keine bzw. bei den BA/F3 p210 eIF5A-2-Zellen (rot) eine nur kurze Verzögerungsphase (Lag-Phase) erkennbar ist und die Zellen scheinbar ohne Unterbrechung in der exponentiellen Phase weitergewachsen sind.

Die exponentielle Wachstumsphase erstreckte sich unter der Annahme, dass keine Lag-Phase stattgefunden hat bei der BA/F3 p210 Zelllinie (blau) über einen Zeitraum von ca. 96 Stunden.

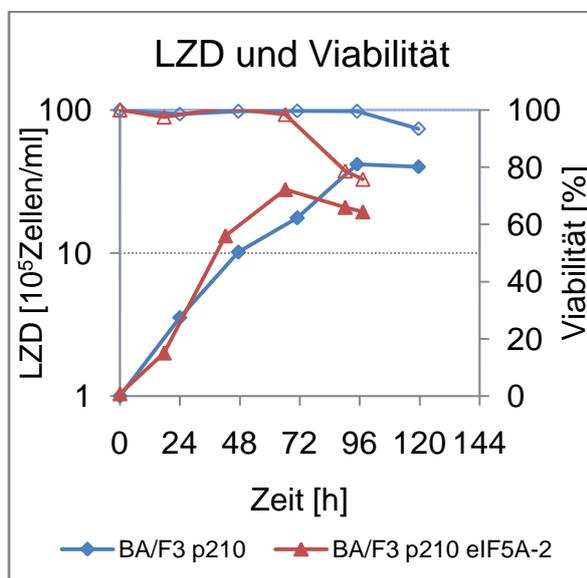


Abb. 5.1 LZD und Viabilität in semilogarithmischer Darstellung im Versuch Zählreihen

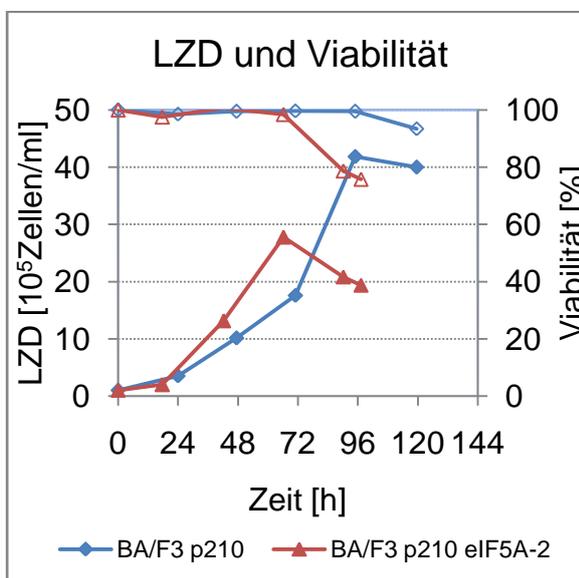


Abb. 5.2 LZD und Viabilität im Versuch Zählreihen

Die maximale LZD von $4,18 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit einer Viabilität von 99,5% wurde am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, nach 96 Stunden erreicht. Nach ca. 120

Stunden befanden sich die Zellen bereits in der Lysephase, was daran erkennbar war, dass die Viabilität der Zellpopulation auf ca. 93% zurückgegangen ist.

Obwohl die für die Zählreihe eingesetzten Zellen der BAF3 p210 eIF5A-2 Zelllinie aus der exponentiellen Wachstumsphase kamen, hat ihr Wachstumsverlauf eine Lag-Phase aufgewiesen, die auf ca. 10 Stunden geschätzt wurde. Die exponentielle Wachstumsphase erstreckte sich über einen Zeitraum von ca. 56 Stunden und fiel damit deutlich kürzer aus, als bei den BAF3 p210 Zellen.

Die maximale Zelldichte, die nach 66 Stunden ermittelt wurde betrug bei der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie $2,8 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei einer Viabilität von 98,4%. Nach 90 Stunden befanden sich die Zellen bereits in der Lysephase. Die Viabilität war zu diesem Zeitpunkt bereits auf einen Wert von ca. 79% gesunken und sank innerhalb von weiteren 7 Stunden noch weiter auf 75 % ab. Die Viabilität sank damit bei der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie schneller ab als bei der BA/F3 p210 Zelllinie.

Wachstumsrate

In Abb. 5.3 sind die Verläufe für die Wachstumsraten der beiden Zelllinien dargestellt. Die maximale Wachstumsrate der BA/F3 p210 Zelllinie wurde innerhalb der ersten 24 Stunden ermittelt und betrug 0,053 1/h und entspricht damit einer Verdopplungszeit von annäherungsweise 13 Stunden.

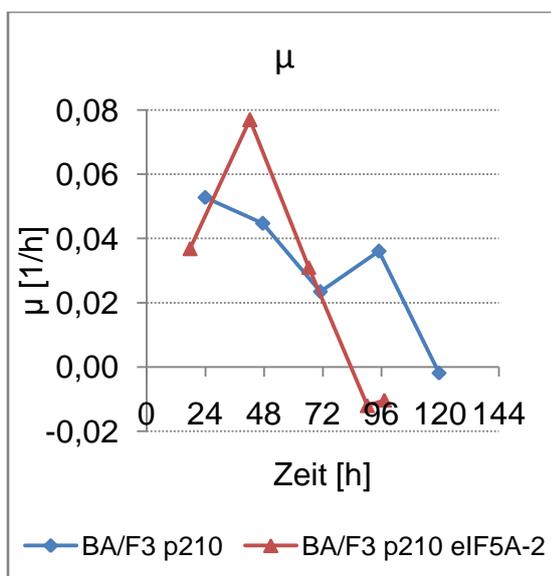


Abb. 5.3 Wachstumsrate im Versuch
Zählreihen

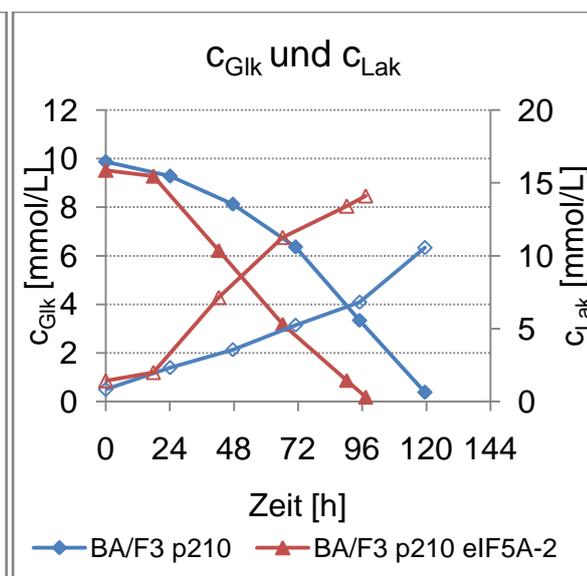


Abb. 5.4 Glukose- und Laktatkonzentration
im Versuch Zählreihen

Die maximale Wachstumsrate, die während der Kultivierung der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie ermittelt wurde, lag bei 0,77 1/h, was einer Verdopplungszeit von etwa 9

Stunden entspricht. Möglicherweise hat die Überexpression des Zielproteins eIF5A-2 einen stimulierenden Einfluss auf die Zellproliferation und damit auch auf die Wachstumsgeschwindigkeit der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zellen.

Glukose- und Laktatkonzentration

Die Verläufe der Glukose- und Laktatkonzentration sind in Abb. 5.4 dargestellt. Betrachtet man den Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration der BA/F3 p210 Zellen, so fällt auf, dass die Zunahme der Laktatkonzentration abgesehen vom letzten Wert, der nach 120 Stunden aufgenommen wurde über die Zeit annäherungsweise linear verläuft. Die Abnahme der Glukosekonzentration verläuft jedoch entsprechend der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen. Die Grenzkonzentration an Glukose unterhalb derer von einer Glukoselimitierung ausgegangen werden konnte, wurde anhand der Ergebnisse auf einen Bereich von 2 - 2,5 mmol/L geschätzt.

Betrachtet man den Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zellen, kann man erkennen, dass eine Lag-Phase vorlag, die wie eingangs schon erwähnt auf einen Zeitraum von 10 Stunden geschätzt wurde. Nach ca. 18 Stunden beginnt die Glukosekonzentration in annäherungsweise linearer Form abzunehmen. Die Glukose ist bei den BA/F3 p210 eIF5A-2 Zellen trotz der Lag-Phase um etwa 24 Stunden früher aufgezehrt als bei den BA/F3 p210 Zellen. Die Laktatkonzentration lag am Ende des Versuchs bei 14,1 mmol/L und war damit deutlich höher als die maximale Laktatkonzentration der BA/F3 p210 Zelllinie, die bei 10,55 mmol/L lag.

Durch den Vergleich der Verläufe der Glukosekonzentration und der Wachstumskurve wurde für die Zelllinie BA/F3 p210 eIF5A-2 eine, das Wachstum limitierende Glukosekonzentration ermittelt, die wie auch schon bei der anderen Zelllinien in einem Bereich von 2 - 2,5 mmol/L lag.

Spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate

Die Verläufe der spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate sind in Abb. 5.5 dargestellt. Bei den BA/F3 p210 Zellen lag die spezifische Glukoseverbrauchsrate zu Beginn der Kultivierung, innerhalb der ersten 24 Stunden auf dem Höchstwert von ca. $0,1 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$, was mit der für diesen Zeitraum ermittelten maximalen Wachstumsrate übereinstimmt. Im weiteren Verlauf sank die spezifische Glukoseverbrauchsrate mehr und mehr ab und erreichte in einem Bereich zwischen dem Ende der exponentiellen Phase und dem Beginn der Lysephase mit ca. $0,031 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ ihren Tiefpunkt.

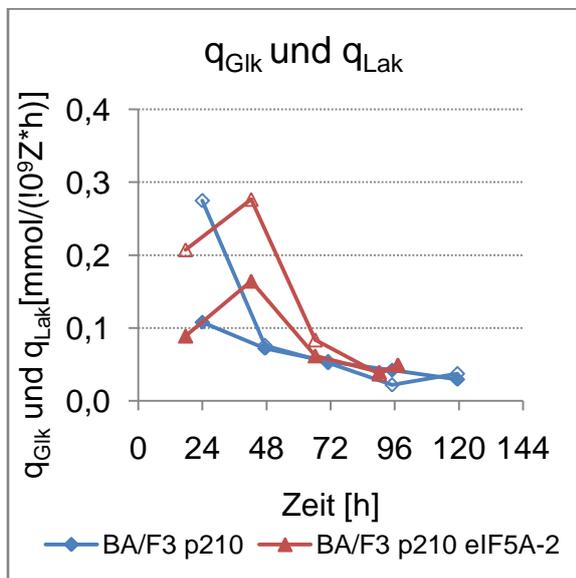


Abb. 5.5 spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate im Versuch Zählreihen

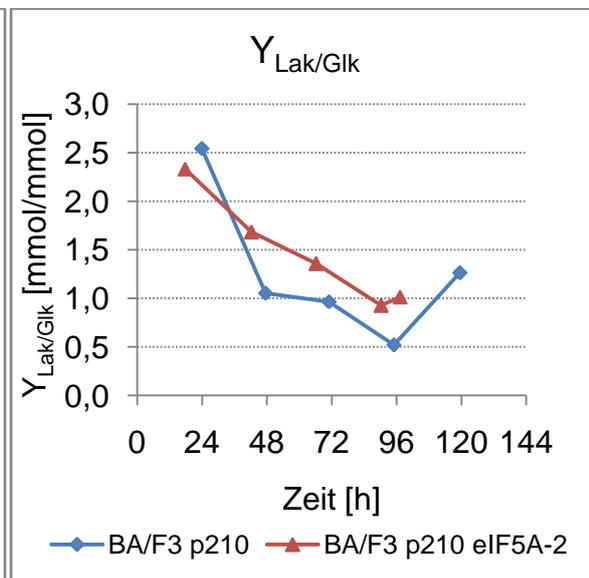


Abb. 5.6 Ausbeutekoeffizient für Lak/Glk im Versuch Zählreihen

Die spezifische Laktatbildungsrate lag bei den BA/F3 p210 Zellen zu Beginn der Kultivierung bei knapp unterhalb von $0,3 \text{ mmol Lak} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$, glich sich im weiteren Verlauf aber mehr und mehr der spezifischen Glukoseverbrauchsrate an, so dass diese nach 48 Stunden etwa auf gleicher Höhe verliefen.

Bei der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie lag die spezifische Glukoseverbrauchsrate zu Beginn der Kultivierung, d.h. innerhalb der ersten 18 Stunden bei einem Wert von $0,090 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ und stieg innerhalb der nächsten 25 Stunden auf den Höchstwert von $0,16 \text{ mmol/L Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ an, was sich wiederum mit der in diesem Zeitraum ermittelten maximalen Wachstumsrate deckt. Im weiteren Verlauf sank sie dann wieder ab. Ihren Tiefpunkt erreichte sie gegen Ende der

exponentiellen Wachstumsphase, bzw. in der Lysephase mit einem Wert von etwa $0,04 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$.

Die spezifische Laktatbildungsrate der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zellen lag zu Beginn bei einem Wert von $0,2 \text{ mmol Lak} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$, stieg im weiteren Verlauf dann auf einen Wert von $0,27 \text{ mmol Lak} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ an und glich sich im weiteren Verlauf immer mehr der spezifischen Glukoseverbrauchsrate an.

Lak/Glk-Ausbeutekoeffizient

In Abb. 5.6 sind die Verläufe des Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lak/Glk}}$ dargestellt. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak/Glk}}$ der BA/F3 p210 Zelllinie lag zu Beginn bei ca. 2,5 mmol/mmol. Aus einem mmol Glukose können maximal jedoch nur 2 mmol Laktat entstehen. Da Glukose nicht das einzige Substrat darstellt, aus dem im Rahmen des Stoffwechsels Laktat entsteht, könnten möglicherweise auch andere Stoffwechselwege aktiv gewesen sein. Diese könnten zur zusätzlichen Bildung von Laktat geführt haben, was den hohen Wert für den Ausbeutekoeffizienten erklären würde. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm der Ausbeutekoeffizient immer mehr ab und lag innerhalb der restlichen exponentiellen Phase zwischen 1 und 0,5 mmol/mmol. Zwischen dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase und dem Beginn der Lysephase stieg der Ausbeutekoeffizient auf einen Wert von 1,3 mmol/mmol an, was möglicherweise mit der einsetzenden Zelllyse bzw. einer verminderten Laktatverwertung der Zellen in Zusammenhang steht.

Der Ausbeutekoeffizient der $Y_{\text{Lak/Glk}}$ der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie lag zu Beginn bei 2,3 und war damit, wie auch schon bei den BAF3 p210 Zellen relativ hoch. Im weiteren Verlauf sank er immer mehr ab und erreichte innerhalb der Lysephase mit 0,9 mmol/mmol den Tiefpunkt, um im weiteren Verlauf wieder leicht anzusteigen.

Zusammenfassung aus den Ergebnissen zum Versuch Zählreihen:

Die Ergebnisse, die im Versuch Zählreihen gemacht wurden, zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich des Wachstumsverhaltens, vor allem im Hinblick auf die dabei erreichten maximalen LZD taten sich Unterschiede auf.

Insgesamt zeigt die BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie eine höhere spezifische Glukoseverbrauchsrate als die BA/F3 p210 Zelllinie. Die BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie verbraucht daher mehr Glukose als die andere Zelllinie.

Vermutlich beeinflusst die Überexpression des Zielproteins eIF5A-2 den Primärstoffwechsel der Zellen, was dazu führt, dass die Zellen größere Mengen an Glukose benötigen. Außerdem lag die Laktatkonzentration am Ende der Versuche bei den BA/F3 p210 eIF5-A Zellen mit einem Wert von 14,3 mmol/L deutlich höher als bei den BA/F3 p210 Zellen, bei denen die Laktatkonzentration bei 10,55 mmol/L lag.

Die Zellen der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie wachsen anhand der Ergebnisse zwar schneller als die der BA/F3 p210 Zelllinie, erreichten aber eine geringere maximale LZD. So lag die LZD bei vergleichbar hoher Viabilität bei der BA/F3 p210 Zelllinie bei $4,18 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie lag jedoch nur bei $2,8 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

Die Grenzkonzentration für Glukose wurde für beide Zelllinien ermittelt und auf einen Bereich von 2 - 2,5 mmol/L geschätzt. Es konnte davon ausgegangen werden, dass bei beiden Zelllinien unterhalb dieses Konzentrationsbereichs eine Glukose-limitierung einsetzt.

Anhand der Ergebnisse, die die Zählreihen geliefert haben, wäre für die Produktion von $1 \cdot 10^{10}$ Zellen der BA/F3 p210 Zellen in T-25er Flaschen, ausgehend von einer maximalen LZD von $4,18 \cdot 10^6$ Zellen/ml, ein Kultivierungsvolumen von insgesamt 2084 ml notwendig gewesen. Dafür wären 417 T-25er Flaschen (5 ml), 105 T-75er Flaschen (20 ml) oder 42 T-75er Flaschen (50 ml) notwendig gewesen. Aufgrund der hierbei erzielten, hohen maximalen LZD wurde in Erwägung gezogen, die Zellen in Roller bottles zu kultivieren.

Bei den BA/F3 p210 eIF5A-2 Zellen zeigte sich trotz vergleichsweise schnelleren Wachstums eine deutlich geringere, maximal erreichbare LZD von $2,8 \cdot 10^6$ Zellen/ml, d.h. hierbei wäre für die Produktion von $1 \cdot 10^{10}$ Zellen ein Kultivierungsvolumen von 3572 ml notwendig gewesen, was 715 T-25er Flaschen (5 ml) entspricht, bzw. 179 T-75er Flaschen (20 ml) oder 72 T-175er Flaschen (50 ml).

Abschließend muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die hier gewonnenen Ergebnisse statistisch nicht abgesichert sind. Um sie statistisch annähernd abzusichern hätte jede Zählreihe mindestens dreimal durchgeführt werden müssen.

5.2 Maximale Zelldichte in einer T-Flasche

Wachstumsverlauf

Anhand der hohen LZD, die für die BA/F3 p210 Zelllinie im Versuch Zählreihen ermittelt wurde, wurde für diese Zelllinie die maximale LZD ermittelt, die in einer T-75er Flasche erreichbar ist. Die maximale erreichbare LZD wurde nur für die BA/F3 p210 Zelllinie ermittelt. Die maximale erreichbare LZD, die in diesem Versuch ermittelt wurde, lag bei $4,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml und war damit nur geringfügig höher als die bei der Zählreihe ermittelte maximale LZD von $4,18 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

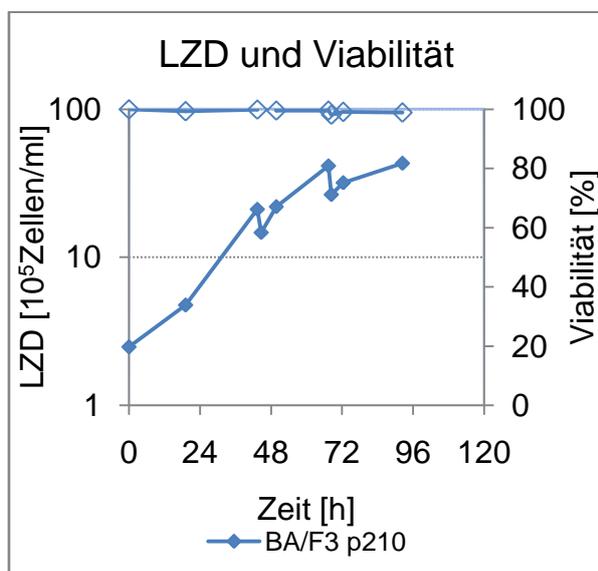


Abb. 5.7 LZD und Viabilität in semilogarithmischer Darstellung im Versuch maximale LZD in einer T-Flasche

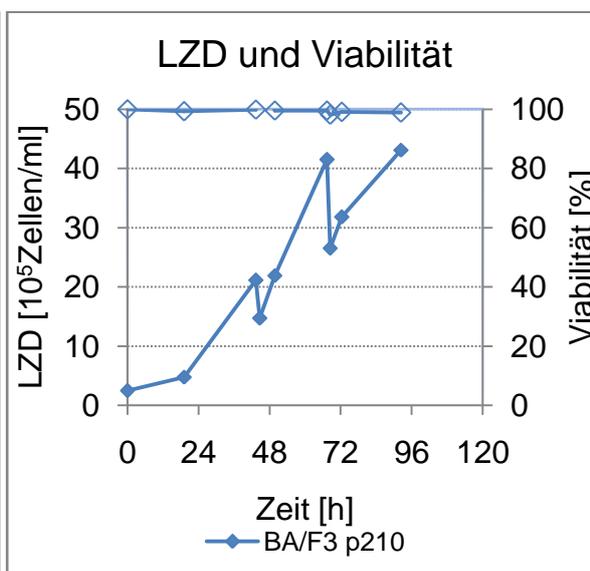


Abb. 5.8 LZD und Viabilität im Versuch maximale LZD in einer T-Flasche

Betrachtet man den Verlauf der Wachstumskurve (Abb. 5.8) und auch den Verlauf der Wachstumskurve bei semilogarithmischer Auftragung (Abb. 5.7), so fällt auf, dass eine Lag-Phase vorliegt, deren zeitliche Dauer nicht exakt bestimmbar ist. Die Lag-Phase wurde auf 10 Stunden geschätzt. Aus dem Verlauf der LZD ist auch zu erkennen, dass zweimal Medium ausgetauscht wurde. Dabei zeigte sich, dass die LZD nach Austausch des Mediums deutlich geringer war als die LZD, die vor dem Mediumwechsel ermittelt wurde. Das lag daran, dass sich das Volumen in der T-75er Flasche bei jeder Probenahme um jeweils 1 ml reduzierte und damit das Ausgangsvolumen von 23 ml verringert wurde. Nach Zentrifugation der Zellsuspension wurde das Zellpellet in jeweils 23 ml frischem Medium resuspendiert, also wieder auf das Ausgangsvolumen angehoben, wodurch sich eine Verdünnung der

LZD ergab. Beim zweiten Mediumwechsel ist der sich ergebende Verdünnungseffekt zu groß. Vor dem Mediumwechsel liegt die LZD noch überhalb von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Nach dem Mediumwechsel beträgt die LZD jedoch nur noch $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Möglicherweise ist es im Rahmen des Mediumwechsels z.B. beim Abnehmen des Überstands zu Zellverlusten gekommen.

Glukose- und Laktatkonzentration

In Abb. 5.9 ist der Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration dargestellt. Betrachtet man den Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration, ist zu erkennen, dass die Glukosekonzentration, abgesehen vom Ende des Versuchs, nie niedriger als 2 mmol/L war. Sie lag also nicht unterhalb der Glukosegrenzkonzentration von 2 mmol/L, die im Vorversuch (Zählreihen) ermittelt wurde. Daraus ergibt sich, dass sich die Zellen die gesamte Zeit über, abgesehen von der Verzögerungsphase (Lag-Phase) und dem Ende des Versuchs in der exponentiellen Wachstumsphase befunden haben.

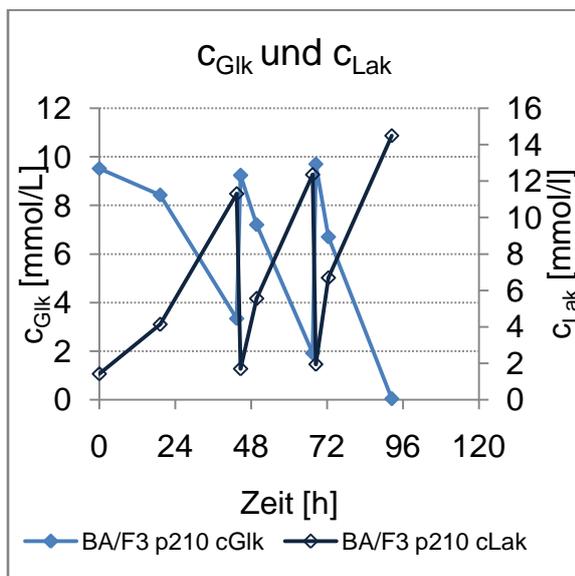


Abb. 5.9 Glukose- und Laktatkonzentration im Versuch maximale LZD in einer T-Flasche

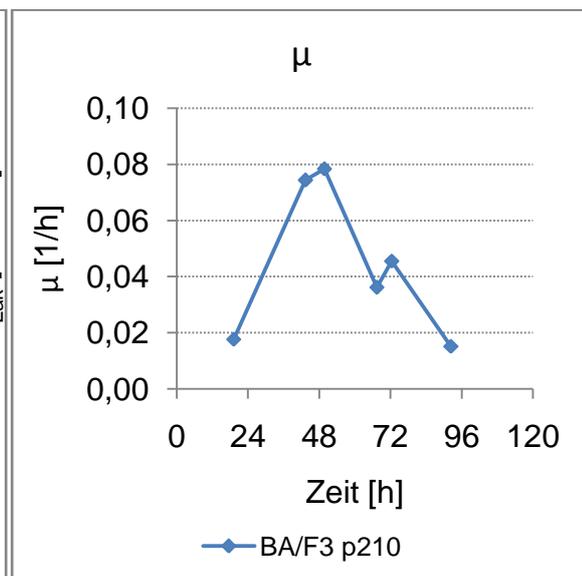


Abb. 5.10 Wachstumsrate im Versuch maximale LZD in einer T-Flasche

Wachstumsrate

Abb. 5.10 zeigt den Verlauf der Wachstumsrate. Die maximale Wachstumsrate, die nach dem ersten Mediumwechsel ermittelt wurde, lag bei $\mu_{\max} = 0,078$ 1/h.

Zusammenfassung des Versuchs maximale LZD in einer T-Flasche:

Die maximale LZD in einer T-Flasche lag bei $4,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml und konnte im Vergleich zu den Ergebnissen der Zählreihe nicht wesentlich gesteigert werden. Wäre die LZD deutlich zu steigern gewesen, hätte man die geforderte Zellzahl von 10^{10} Zellen möglicherweise auch mithilfe von Roller bottles herstellen können. Da die LZD nur geringfügig gesteigert wurde, wurde von dieser Möglichkeit abgesehen.

5.3 Vorversuche im Vario 1000

5.3.1 Fed-Batch

Wachstumsverlauf

In Abb. 5.11 und Abb. 5.12 ist der Wachstumsverlauf in semilogarithmischer Auftragung bzw. der Wachstumsverlauf der BAF3 p210 Zellen dargestellt. Betrachtet man den Verlauf der LZD in semilogarithmischer Darstellung ist zu erkennen, dass keine Lag-Phase vorlag. Die LZD lag zu Beginn Versuch bei $0,12 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

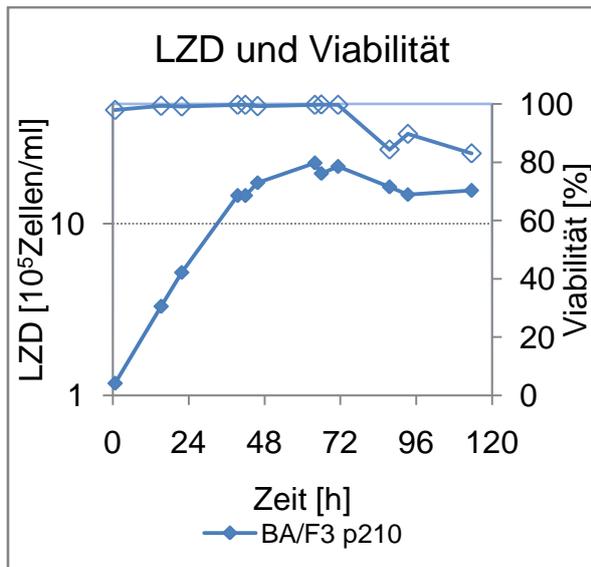


Abb. 5.11 LZD in semilogarithmischer Auftragung und Viabilität im Versuch Fed-Batch

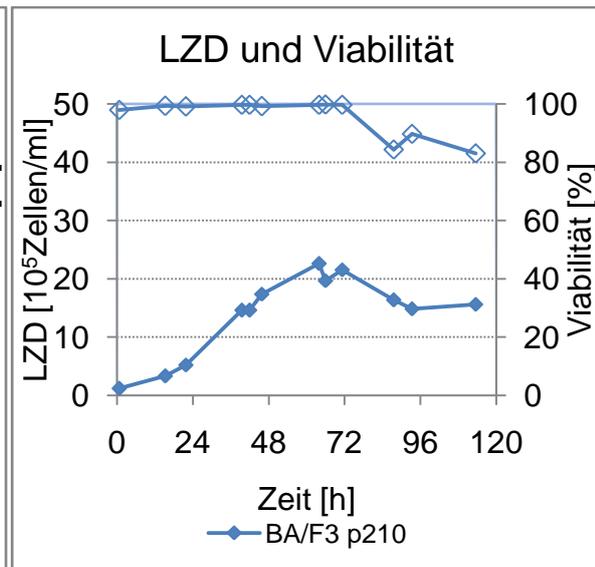


Abb. 5.12 LZD und Viabilität im Versuch Fed-Batch

Nach 39,5 Stunden betrug die Zelldichte ca. $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die maximale LZD, die in diesem Versuch nach 64 Stunden ermittelt wurde, lag bei $2,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Nach 71,3 Stunden beginnt die Lysephase, was daran zu erkennen ist, dass die Viabilität von diesem Zeitpunkt ab deutlich abgenommen hat.

Glukose- und Laktatkonzentration

In Abb. 5.13 ist der Verlauf der Glukose und Laktatkonzentration dargestellt. Die Glukosekonzentration nahm nach Beginn des Versuchs relativ schnell ab und erreichte nach 39,5 Stunden mit 1,29 mmol/L ihren Tiefpunkt, der deutlich unterhalb der festgelegten Glukosegrenzkonzentration von 2 mmol/l lag. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass zu diesem Zeitpunkt eine Glukoselimitierung vorlag. Nach 41,5 Stunden wurde das erste Mal satzweise zugefüttert, um die Glukosekonzentration wieder auf ca. 7 - 9 mmol/L anzuheben.

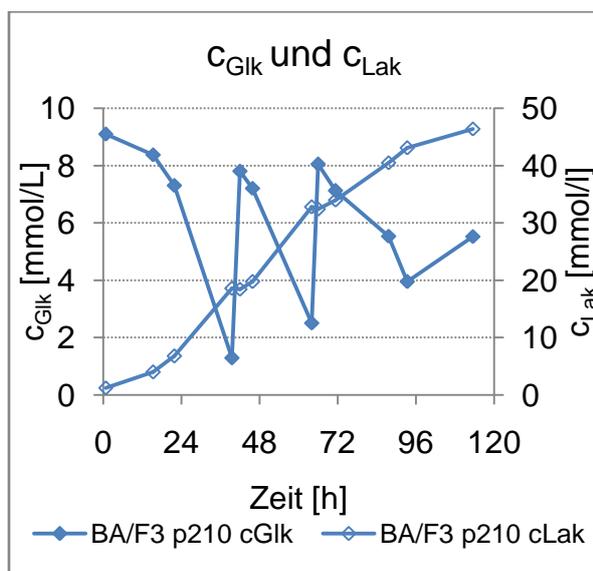


Abb. 5.13 Glukose- und Laktatkonzentration im Versuch Fed-Batch

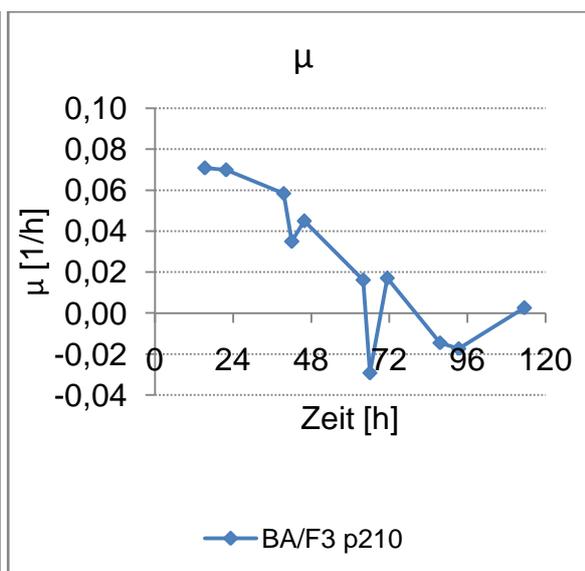


Abb. 5.14 Wachstumsrate im Versuch Fed-Batch

Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der Abnahme der Glukosekonzentration im Versuch Fed-Batch mit der, in der statischen Kultivierung der BA/F3 p210 Zellen, so fällt auf, dass die Glukose im Fed-Batch-Versuch, bei dynamischer Kultivierung deutlich schneller verbraucht wurde. So lag die Glukosekonzentration der BA/F3 p210 Zellen bei statischer Kultivierung (Zählreihen) nach 96 Stunden immer noch bei 3,3 mmol/L, bei einer LZD von $4,18 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Außerdem ist die Zellausbeute in Bezug auf die eingesetzte Glukose in dynamischer Kultivierung deutlich geringer als die in statischer Kultivierung.

Zu Beginn der Lysephase, also nach 71,3 Stunden, betrug die Glukosekonzentration 7,1 mmol/L und die Laktatkonzentration 34 mmol/L. Ob diese Laktatkonzentration einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen bzw. einen die Zellyse fördernden Effekt hatte, ist fraglich.

Da es sich bei dem Zufütterungsmedium nicht um ein Mediumkonzentrat handelte, in dem alle Mediumkomponenten in konzentrierter Form vorliegen, sondern lediglich Glukose und Glutamin in konzentrierter Form enthalten waren, ist davon auszugehen, dass es zu einer Substratlimitierung anderer wichtiger Mediumkomponenten wie z.B. Aminosäuren oder Vitaminen gekommen ist. Möglicherweise führt auch die Kombination aus einer oder mehrerer Substratlimitierungen und der Anreicherung toxischer Metabolite wie z.B. Laktat und Ammonium zu einer vermehrt einsetzenden Zelllyse. Ausgeschlossen werden kann jedoch eine Glukoselimitierung, da die Glukosekonzentration zu diesem Zeitpunkt bei 7,1 mmol/L lag.

Wachstumsrate

Die maximale Wachstumsrate (Abb. 5.14) betrug zu Beginn der Kultivierung, also innerhalb des Batchs, d.h. innerhalb der ersten 24 Stunden 0,07 1/h, was einer Verdopplungszeit von 9,9 Stunden entspricht. Im Vergleich zur statischen Kultivierung (μ_{\max} (Zählreihe) = 0,053 1/h) sind die BA/F3 p210 Zellen damit im Vario 1000 schneller gewachsen.

Im weiteren Verlauf sank die Wachstumsrate dann mehr und mehr ab und erreichte nach 66 Stunden erstmals einen negativen Wert von -0,03 1/h. Betrachtet man den Verlauf der Wachstumsrate so fällt auf, dass der negative Wert heraussticht und wahrscheinlich einen Fehler darstellt, zumal die Viabilität der Zellen in diesem Bereich bei 99,7% unverändert hoch lag. Vermutlich wurde aufgrund eines Fehlers, der im Rahmen der Probenahme oder der Zellzählung erfolgte, eine zu geringe LZD ermittelt, die zu einer negativen Wachstumsrate geführt hat.

Spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate

Abb. 5.15 zeigt den Verlauf der spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate. Betrachtet man die spezifische Glukoseverbrauchsrate der ersten 41,5 Stunden erkennt man, dass sich diese in einem Bereich von $0,2 - 0,4 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ bewegt hat. Danach ist die spezifische Glukoseverbrauchsrate auf Werte unterhalb von $0,2 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ zurückgegangen.

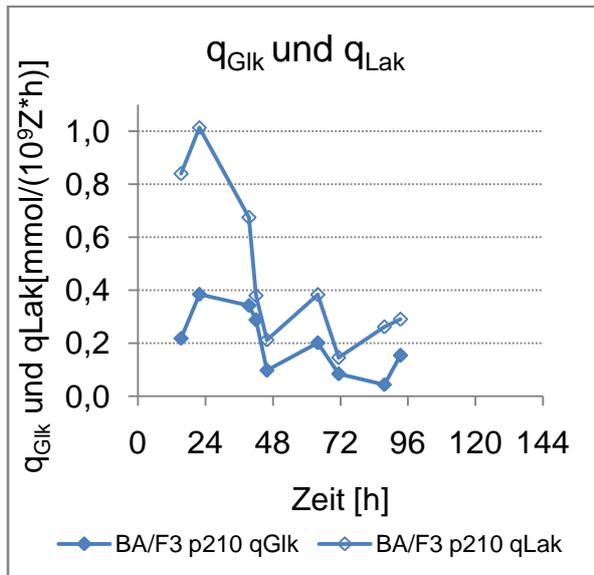


Abb. 5.15 spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate im Versuch Fed-Batch

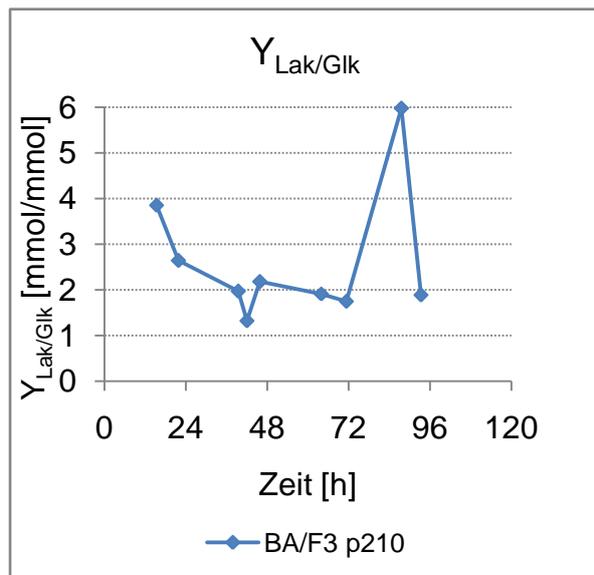


Abb. 5.16 Ausbeutekoeffizient Lak/Glk im Versuch Fed-Batch

Im Vergleich zur statischen Kultivierung scheinen die Zellen im Vario 1000 deutlich mehr Glukose zu verbrauchen, nämlich um den Faktor 2 - 3. Die höhere spezifische Glukoseverbrauchsrate hängt möglicherweise mit der in dynamischen Kultivierungssystemen höheren Grundbelastung zusammen. Die höhere Grundbelastung wird dabei im Wesentlichen auf hydrodynamische Spannungen, die im Rahmen der Blasenbegasung, sowie während des Rührens auftretender Scherkräfte zurückgeführt. So könnten zellschädigende Mechanismen dazu beigetragen haben, dass die Zellen leichter oder schneller abgestorben sind.

Die Zellen, die aufgrund der höheren Grundbelastung im Bioreaktor abgestorben sind haben bis zu dem Zeitpunkt ihres Absterbens Glukose verbraucht. Im Laufe der Zeit zersetzten sich die abgestorbenen Zellen im weiter. Folglich sind sie bei der Zellzählung nicht mehr aufgetaucht und konnten somit nicht erfasst werden. Das bedeutet aber gleichzeitig auch, dass theoretisch der Anteil sichtbarer Zelltrümmer

hätte zunehmen müssen. Bei der routinemäßigen Zellzählung, die mithilfe des Mikroskops erfolgte, wurde diese Beobachtung allerdings nicht gemacht.

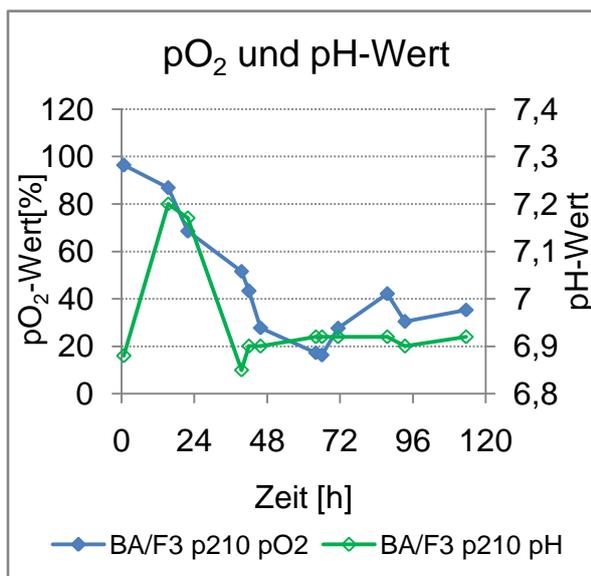
Lak/Glk-Ausbeutekoeffizient

In Abb. 5.16 ist der Verlauf des Ausbeutekoeffizienten $Y_{Lak/Glk}$ dargestellt. Der Ausbeutekoeffizient lag zu Beginn der Kultivierung (innerhalb der ersten 40 Stunden), wie auch schon bei der statischen Kultivierung (Zählreihe) deutlich über 2 mmol/mmol. Er pendelte sich im weiteren Verlauf in einem Bereich von 1,7 - 2 mmol/mmol ein. Nach 87,5 Stunden zeigte sich jedoch ein starker Ausschlag, der bei 6 mmol/mmol liegt. Dieser ungewöhnlich hohe Wert steht möglicherweise mit der zu diesem Zeitpunkt erstmals deutlich abgesunkenen Zellviabilität in Zusammenhang, die auf eine einsetzende Lysephase hindeutet. Die spezifische Glukoseverbrauchsrate hat zu diesem Zeitpunkt den Tiefstwert von $0,044 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht.

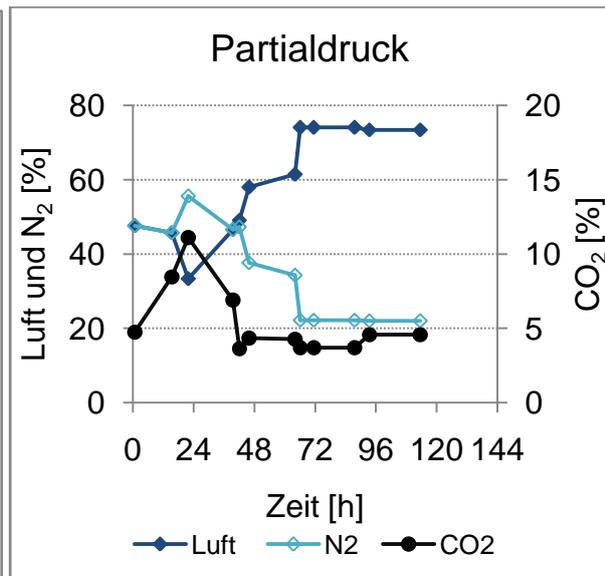
pO₂ und pH-Wert

In Abb. 5.17 ist der Verlauf des pO₂- und pH-Werts dargestellt. In diesem Versuch wurde von Beginn an mit einem Gasmisch begast. Der pO₂-Wert lag zu Beginn des Versuchs bei 96,4% und nahm im weiteren Verlauf mit zunehmender Zelldichte immer weiter ab und wurde schließlich in einem Bereich von 15 - 40% des Sättigungswerts gehalten.

Der pH-Wert stieg zu Beginn des Versuchs stark an. Infolge dieses Anstiegs wurde die CO₂-Begasungsrate solange erhöht, bis der pH-Wert wieder abnahm. Allerdings wurde bei der Abnahme des pH-Werts der physiologische pH-Bereich kurzzeitig verlassen. Der pH-Wert lag nach 39,5 Stunden bei 6,85. Die CO₂-Konzentration in der Zuluft wurde daraufhin abgesenkt und lag im weiteren Verlauf der Kultivierung durchgehend unterhalb von 5%. Im weiteren Verlauf der Kultivierung bewegte sich der pH-Wert relativ auf einem Wert von 6,9.



**Abb. 5.17 pO₂ und pH-Wert im Versuch
Fed-Batch**



**Abb. 5.18 Partialdruck im Versuch
Fed-Batch**

Partialdruck

In Abb. 5.18 ist der Partialdruck, der für die Kultivierung eingesetzter Gase dargestellt. Der Partialdruck der Zuluft betrug zu Beginn der Kultivierung 47% und wurde, da der pO₂-Wert schneller absinken sollte auf 33% reduziert. Schließlich wurde der Anteil an Zuluft mit zunehmender Zelldichte schrittweise angehoben. Im Gegenzug wurde der Partialdruck für Stickstoff reduziert. Im weiteren Verlauf wurde der Anteil an Luft im Begasungsstrom erhöht und lag in der zweiten Hälfte des Versuchs durchgehend bei 74%.

Begasung

Die Begasungsrate bewegte sich während dieses Versuchs zwischen 0,015 - 0,029 vvm (siehe Abb. 5.19).

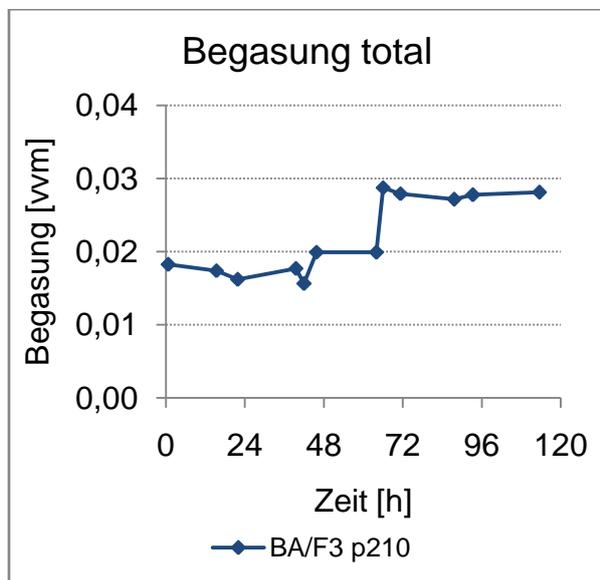


Abb. 5.19 Begasung total im Versuch

Fed-Batch

Zusammenfassung aus dem Versuch Fed-Batch:

Der Versuch Fed-Batch lieferte wichtige Informationen über das Wachstumsverhalten der BA/F3 p210 Zellen im Vario 1000. Da dieser Versuch nur einmal durchgeführt wurde sind die hier ermittelten Ergebnisse statistisch nicht abgesichert.

Bei diesem Versuch, der als Batch gestartet wurde, betrug die LZD am Ende des Batches, nach 39,5 Stunden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei einer Viabilität von 99,7%. Die Glukosekonzentration betrug zu diesem Zeitpunkt 1,29 mmol/L und lag damit unterhalb der Glukosegrenzkonzentration von 2 mmol/L. Die Unterschreitung der Glukosegrenzkonzentration hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen, führte jedoch zu einer Wachstumslimitierung der Zellen, was auch durch die Abnahme der Wachstumsrate erkennbar war.

Im weiteren Verlauf des Versuchs konnte durch Zufütterung die maximale LZD auf $2,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml gesteigert werden. Die Viabilität betrug dabei 99,7%. Dieser Wert wurde nach 64 Stunden erreicht. Nach 71,3 Stunden hat die Lysephase begonnen.

Insgesamt war die erreichbare LZD im Vario 1000 damit deutlich geringer als in statischer T-Flaschenkultivierung. Gleichzeitig wurde das Medium weniger gut

ausgenutzt, d.h. trotz Zufütterung wurde eine maximale LZD erreicht, die nur knapp überhalb der Hälfte der maximalen LZD lag, die in statischer Kultivierung ermittelt wurde.

Die spezifische Glukoseverbrauchsrate war bei dynamischer Kultivierung deutlich höher als die bei statischer Kultivierung. Diese war vor allem innerhalb der ersten 39,5 Stunden mit Werten von $0,2 - 0,4 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ um den Faktor 2 - 3 höher als bei der entsprechenden Zelllinie in statischer Kultivierung. Eine mögliche Ursache für die höhere spezifische Glukoseverbrauchsrate ist in dem, bei dynamischer Kultivierung insgesamt höheren Stressaufkommens für die Zellen zu sehen. Das höhere Stressaufkommen wird dabei im Wesentlichen auf die Scherkräfte, die während der Durchmischung auftreten und die hydrodynamischen Spannungen, die während der Blasenbegasung auftreten zurückgeführt. Möglicherweise könnte durch geeignetere Einstellungen der Rührerdrehzahl und durch Änderung des Begasungssystem in Bezug auf den Sauerstoffeintrag ins Medium eine höhere LZD erreicht werden.

Die Wachstumsrate der Zellen war in dynamischer Kultivierung deutlich höher als die Wachstumsrate, die im Versuch Zählreihen für die entsprechende Zelllinie ermittelt wurde. So lag die Wachstumsrate im Vario 1000 innerhalb der Batch-Phase durchgehend über $0,06 \text{ 1/h}$ und lag damit über der Wachstumsrate, die im Versuch Zählreihen ermittelt wurde, die bei etwa $0,04 \text{ 1/h}$ lag.

Im Rahmen der Prozessführung zeigte sich, dass die Glukosekonzentration, die sich während dieses Versuchs zwischen $2 - 8 \text{ mmol/L}$ bewegen sollte mit der gewählten Art der Zufütterung (satzweise bzw. quasikontinuierliche Zugabe an Zufütterungsmedium über Nacht) relativ gut zu realisieren war.

Möglicherweise wäre durch den Einsatz eines Mediumkonzentrats, das alle Mediumkomponenten in konzentrierte Form enthält bzw. auch durch eine andere Zufütterungsstrategie eine noch höher maximale LZD erreicht worden. Der Zeitpunkt, an dem kein exponentielles Wachstum mehr vorlag, konnte in diesem Versuch nicht bestimmt werden.

5.3.2 Kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Wachstumsverlauf

In den folgenden zwei Abbildungen (Abb. 5.20 und Abb. 5.21) ist der Wachstumsverlauf der BAF3 p210 Zellen in semilogarithmischer und normaler Auftragung, bei kontinuierlicher Kulturführung mit einem konstanten Arbeitsvolumen von 100 ml zu sehen. Betrachtet man den Verlauf der LZD in semilogarithmischer Darstellung wird ersichtlich, dass keine Lag-Phase vorhanden war. Die Anfangskonzentration an lebenden Zellen lag bei $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Es wurde deshalb eine hohe Anfangszellkonzentration gewählt, da die LZD beim Start des kontinuierlichen Betriebs möglichst nahe an der LZD liegen sollte, die sich im Fließgleichgewicht ergeben hätte. Die Pumpen für Zu- und Ablauf wurden nach 26,5 Stunden gestartet. Zu diesem Zeitpunkt betrug die LZD $0,95 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

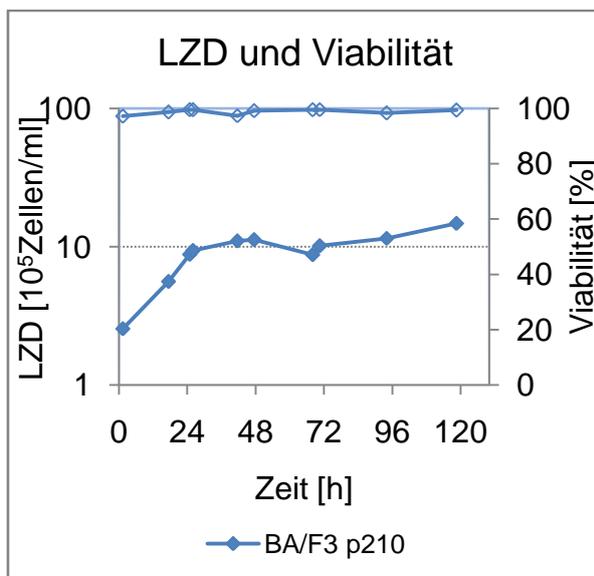


Abb. 5.20 LZD und Viabilität in semilogarithmischer Auftragung im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

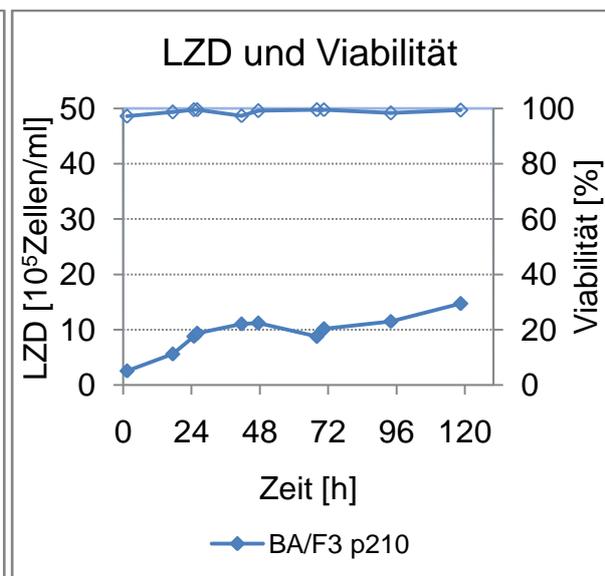


Abb. 5.21 LZD und Viabilität im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Nachdem die Pumpen für den Zu- und Ablauf gestartet wurden, stieg im weiteren Verlauf der Kultivierung die LZD zunächst auf Werte knapp unterhalb von $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml an. Nach 68 Stunden wurde mit einer LZD von $0,875 \cdot 10^6$ Zellen/ml das Minimum erreicht. Danach stieg die LZD wieder an und erreichte am Ende der Kultivierung nach 118,5 Stunden die maximale LZD von $1,47 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die Viabilität lag, abgesehen vom Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise, bei der sie auf 97% abgesunken ist, über die gesamte Dauer des kontinuierlichen Betriebs bei

annäherungsweise 99%. Anhand des Wachstumsverlauf ist der Zeitpunkt, zu dem das Fließgleichgewicht eingetreten ist nicht exakt bestimmbar bzw. ist es unklar ob sich ein Fließgleichgewicht eingestellt hat.

Glukose- und Laktatkonzentration

In Abb. 5.22 ist der Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration dargestellt. Die Glukosekonzentration lag zu Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise, die nach 26,5 Stunden gestartet wurde bei 3,5 mmol/L, also deutlich überhalb der Glukosegrenzkonzentration. Nach Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise nahm die Glukosekonzentration trotz Zufütterung weiter ab und erreichte nach 47,4 Stunden ihren Tiefpunkt, der bei 1,8 mmol/L lag. Im weiteren Verlauf nahm die Glukosekonzentration wieder leicht zu und erreichte gegen Ende der Kultivierung eine Konzentration von ca. 2,5 mmol/L.

Die Laktatkonzentration lag zu Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise bei 12,5 mmol/L. Sie stieg im weiteren Verlauf wieder an und erreichte nach 70,5 Stunden bei 17,3 mmol/L ihren Höchstwert. Von da an sank die Laktatkonzentration wieder leicht ab und erreichte nach 118,5 Stunden mit 14,7 mmol/L ihren Tiefwert.

Während sich die Glukose- und Laktatkonzentrationen aufeinander zubewegten, stieg merkwürdigerweise im gleichen Zeitraum die LZD wieder an. Ein Umstand, der möglicherweise auf eine Anpassungsreaktion des Stoffwechsels der Zellen hindeutet.

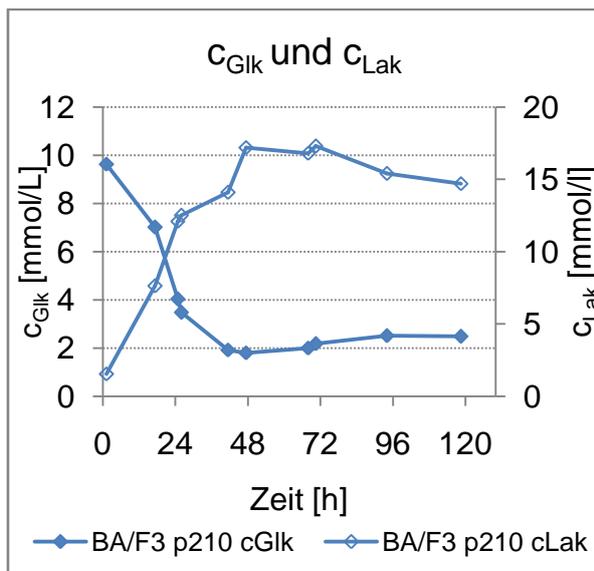


Abb. 5.22 Glukose- und Laktatkonzentration im Versuch kontinuierliche Betriebsweise

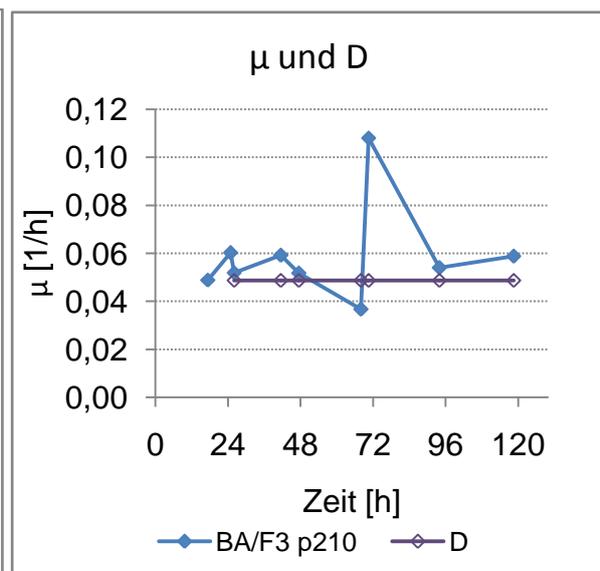


Abb. 5.23 Wachstumsrate und Verdünnungsrate im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Wachstumsrate und Verdünnungsrate

In Abb. 5.23 ist der Verlauf der Wachstumsrate sowie die eingestellte Verdünnungsrate dargestellt. Die Wachstumsrate lag zu Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise bei 0,052 1/h und bewegte sich im weiteren Verlauf relativ nahe an der eingestellten Verdünnungsrate, die über den gesamten Verlauf der Kultivierung auf einem Wert von 0,048 1/h eingestellt war. Die Verdünnungsrate wurde mithilfe der aus der Batch-Phase dieses Versuchs ermittelten maximalen Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,06$ 1/h bestimmt und sollte 80% davon betragen. Nach 70,5 Stunden zeigte sich für die Wachstumsrate allerdings ein starker Sprung. Sie lag zu diesem Zeitpunkt bei 0,011 1/h. Dieser übermäßig starke Anstieg wird auf einen Fehler, der möglicherweise im Rahmen der Probenahme bzw. Probenvorbereitung aufgetreten sein könnte, zurückgeführt.

Spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate

In Abb. 5.24 ist der Verlauf der spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate dargestellt. Im Verlauf der kontinuierlichen Betriebsführung lag die spezifische Glukoseverbrauchsrate relativ stabil bei einem Wert von $0,35 \text{ mmol Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$, was auf ein mögliches Fließgleichgewicht hindeutet.

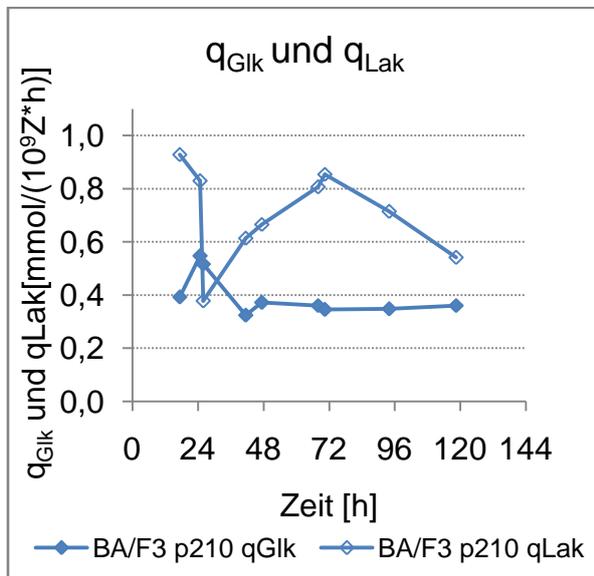


Abb. 5.24 spezifische Glukosverbrauchs- und Laktatbildungsrate im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

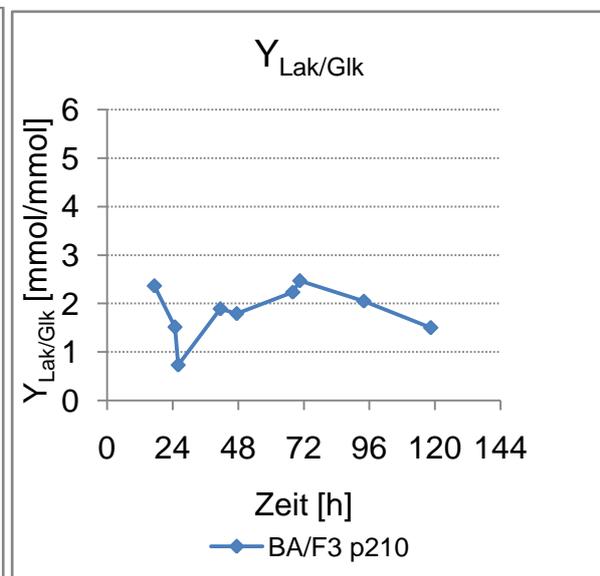


Abb. 5.25 Ausbeutekoeffizient im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Die spezifische Laktatbildungsrate lag zu Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise bei einem Wert von $0,378 \text{ mmol Lak} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$, der auch den minimalen Wert dieses Versuchs darstellt. Im weiteren Verlauf der Kultivierung stieg die Laktatbildungsrate interessanter Weise wieder an und erreichte nach 70,5 Stunden mit $0,085 \text{ mmol Lak} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ ihr Maximum. Danach sank die spezifische Laktatbildungsrate wieder ab.

Lak/Glk-Ausbeutekoeffizient

In der Abb. 5.25 ist der Verlauf des Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lak/Glk}}$ dargestellt. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak/Glk}}$ lag zu Beginn der Kultivierung bei $2,4 \text{ mmol/mmol}$ und sank innerhalb der Batch-Phase auf den Tiefstwert von $0,7 \text{ mmol/mmol}$ ab. Nachdem die kontinuierliche Betriebsweise gestartet wurde, stieg der Ausbeutekoeffizient wieder an und erreichte analog zum Verlauf der spezifischen Laktatbildungsrate nach 70,5 Stunden den Höchstwert von $2,5 \text{ mmol/mmol}$. Danach nahm der Ausbeutekoeffizient wieder ab und lag am Ende der Kultivierung bei $1,5 \text{ mmol/mmol}$.

pO₂ und pH-Wert

In Abb. 5.26 ist der Verlauf des pO₂- und pH-Werts dargestellt. Der pO₂-Wert lag zu Beginn des Versuchs bei 92,2% und nahm im weiteren Verlauf immer weiter ab und bewegte sich schließlich relativ konstant bei 40% des Sättigungswerts.

Der pH-Wert ist zu Beginn des Kultivierungsversuchs innerhalb des Batches auf 7,25 angestiegen, sank dann wieder ab und bewegte sich innerhalb der kontinuierlichen Betriebsweise konstant auf einem Wert von 7,11.

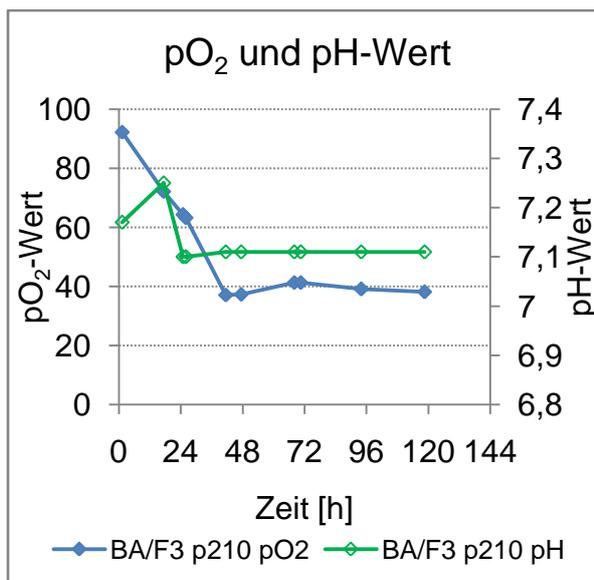


Abb. 5.26 pO₂ und pH-Wert im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

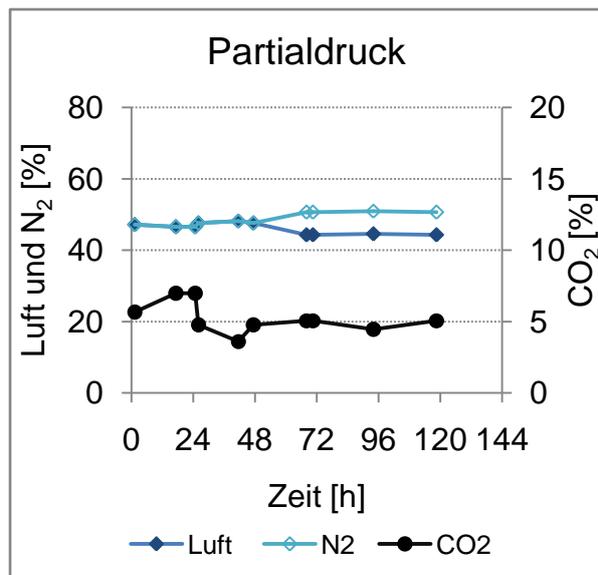


Abb. 5.27 Partialdruck der verschiedenen Gase im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Partialdruck

Die Zusammensetzung des Gasmisches, mit dem während der Kultivierung begast wurde, ist in Abb. 5.27 dargestellt. Infolge des Anstiegs des pH-Werts zu Beginn der Kultivierung, wurde vorübergehend die CO₂-Konzentration der Zuluft auf 7% erhöht.

Begasungsrate

In Abb. 5.28 ist die Begasungsrate dargestellt. Die Begasungsrate bewegte sich während dieses Versuchs zwischen 0,015 – 0,017 vvm.

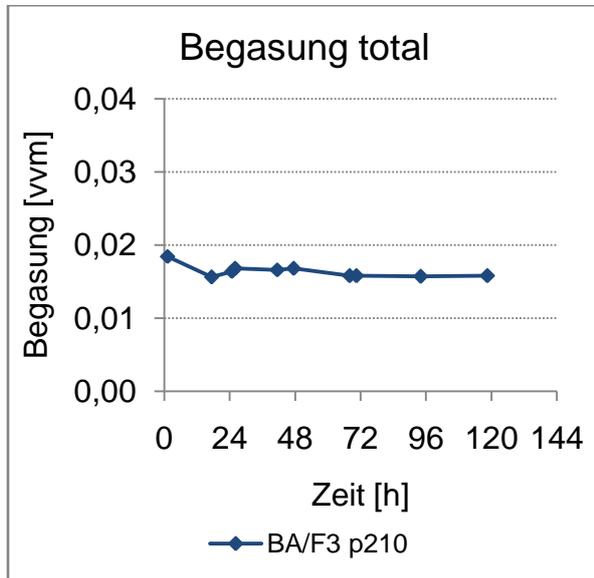


Abb. 5.28 Begasung im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

5.3.2.1 Viabilitätsbestimmung der gelagerten Zellen

Im Laufe des Versuchs kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml wurden insgesamt drei 200 ml Schottflaschen mit Zellsuspension befüllt. Die Flaschen befanden sich, während sie mit Zellsuspension aus dem laufenden Prozess befüllt wurden, in einer mit Eis gefüllten Styroporbox, so dass die Zellsuspension heruntergekühlt wurde. Sobald eine Flasche befüllt war, wurde diese unter Beibehaltung der Sterilität vom System abgetrennt und durch eine neue Flasche ersetzt, die wiederum befüllt wurde. Die kontinuierliche Betriebsweise erstreckte sich über einen Zeitraum von 92 Stunden. In Tabelle 5.1 (siehe Seite 70) sind die Zeiträume innerhalb der kontinuierlichen Betriebsweise dargestellt, in denen die Flaschen (1 - 3) der Reihe nach befüllt wurden. Die befüllten Flaschen wurden bei 4°C im Kühlraum gelagert.

Tabelle 5.1 Die in bestimmten Zeiträumen aufgefangene Zellsuspension während des Versuchs kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Dauer [h]	Aufgefangenes Volumen [ml]	Flasche Nr.
0 - 41,5	199	1
41,5 - 86,5	216	2
86,5 - 92	26	3

Nach Beendigung des Versuchs wurden am folgenden Tag die Zellen der unterschiedlichen Flaschen resuspendiert und hinsichtlich ihrer Viabilität untersucht. In der folgenden Tabelle 5.2 sind die Ergebnisse aus der Bestimmung der Viabilität (Integritätsnachweis der Zellmembran) der Zellen der unterschiedlichen Auffangflaschen dargestellt.

Tabelle 5.2 Ergebnisse aus der Viabilitätsbestimmung der gelagerten Zellen aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Flasche Nr.	Viabilität [%]	Zellen mit intakter Zellmembran [10^5 Zellen/ml]
1	97,2	10,7
2	98,1	10,5
3	99	12,7

Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Art der Zelllagerung keinen erheblichen Viabilitätsverlust (Integritätsverlust der Membran) zur Folge hatte. Allerdings zeigte sich für die erste Flasche, die befüllt wurde die niedrigste Viabilität, die aber immer noch bei 97,2% lag. Die Lagerungszeit hatte möglicherweise einen Einfluss auf die Integrität der Zellmembran.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Versuchs kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml:

Bei diesem Versuch, der als Batch gestartet wurde, betrug die LZD am Ende des Batchs (nach 26 Stunden) $0,935 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei einer Viabilität von 99,5%. Die Glukosekonzentration betrug zu diesem Zeitpunkt 3,23 mmol/l. Nach 118,5 Stunden wurde die maximale LZD von $1,47 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht. Die Viabilität betrug zu diesem Zeitpunkt 99,3%.

Da die Glukosekonzentration während der zweiten Hälfte der kontinuierlichen Betriebsführung wieder leicht angestiegen ist und die Laktatkonzentration abgenommen hat ist fraglich, ob hierbei von einem Fließgleichgewicht gesprochen werden kann, zumal im gleichen Zeitraum die LZD wieder angestiegen ist. Üblicherweise ist für Prozesse mit kontinuierlicher Betriebsweise das 3 - 5-fache des konstanten Arbeitsvolumens an Zufütterungsmedium notwendig, damit sich ein Fließgleichgewicht einstellen kann. In diesem Versuch wurde das etwa 4-fache Volumen an frischem Medium durch den Bioreaktor geleitet. Möglicherweise wäre eine größere Menge an Medium für den Zulauf notwendig gewesen, um ein Fließgleichgewicht einzustellen.

Im Vergleich zur Batch-Phase (der Fed-Batch-Versuch wurde als Batch gestartet) des Fed-Batch-Versuchs, die gegen Ende nach 39,5 Stunden eine LZD von $1,47 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei einer Glukosekonzentration von 1,23 mmol/L aufgewiesen hat, scheint die Ausbeute an Zellen in der Batch-Phase des Versuch mit kontinuierlicher Betriebsweise geringer zu sein.

Die Glukosekonzentration, die sich während der kontinuierlichen Betriebsweise im Bioreaktor einstellte, bewegte sich zwischen 1,8 mmol/L und 2,5 mmol/L. Die Glukosekonzentration nahm mit zunehmender Dauer ausgehend vom Mindestwert von 1,8 mmol/L immer wieder leicht zu und erreichte am Ende des Versuchs 2,48 mmol/L.

Die spezifische Glukoseverbrauchsrate war in diesem Versuch (dynamische Kultivierung) wiederum höher als die in statischer Kultivierung. Diese bewegte sich im kontinuierlichen Betrieb durchgehend in einem Bereich von 0,375 - 0,377 mmol Glk $\cdot 10^{-9}$ Zellen $\cdot h^{-1}$ und lag damit um den Faktor 2 - 4 höher als bei der entsprechenden Zelllinie, die in T-Flaschen kultiviert wurde. Eine mögliche Ursache für die höhere spezifische Glukoseverbrauchsrate ist wiederum in dem, bei dynamischer Kultivierung insgesamt höheren Stressaufkommens der Zellen, zu sehen. Die Rührerdrehzahl bewegte sich auch in diesem Versuch durchgehend bei 150 U/min. Im Vergleich zum Fed-Batch-Betrieb, der bei gleicher Rührerdrehzahl betrieben wurde und bei dem das Kulturvolumen ca. 350 ml betrug, war der volumenbezogene Leistungseintrag (Durchmischung) im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml vergleichsweise höher.

Die Kühlung und Lagerung der Zellen hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Integrität der Zellmembran, die ermittelten Viabilitäten bewegten sich auf gleicher Höhe, wie die Viabilität, die während des laufenden Versuchs ermittelt wurde.

5.3.3 Kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Wachstumsverlauf

In den folgenden Diagrammen (Abb. 5.29 und Abb. 5.30) ist der Wachstumsverlauf der BAF3 p210 eIF5A-2 Zellen bei kontinuierlicher Kulturführung mit einem konstanten Arbeitsvolumen von 400 ml dargestellt. Betrachtet man den Verlauf der LZD in semilogarithmischer Auftragung ist zu erkennen, dass keine Lag-Phase vorhanden war. Die Anfangskonzentration an lebenden Zellen lag bei $0,19 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die Pumpen für Zu- und Ablauf wurden nach 35 Stunden gestartet. Zu diesem Zeitpunkt betrug die LZD $1,19 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei einer Viabilität von 97,5%.

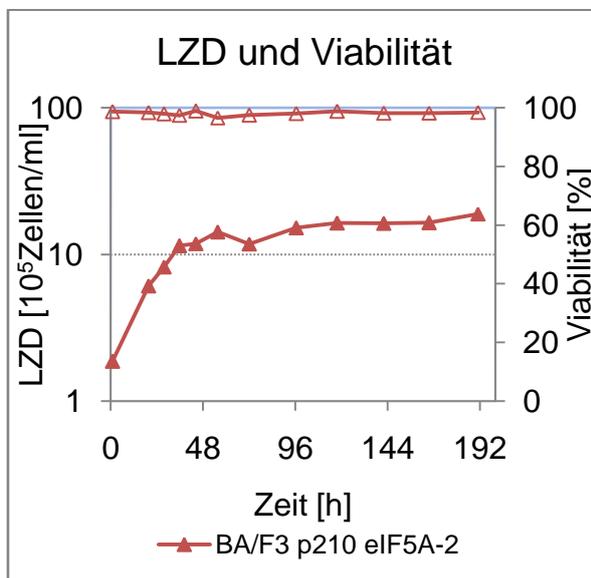


Abb. 5.29 LZD und Viabilität in semilogarithmischer Auftragung im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

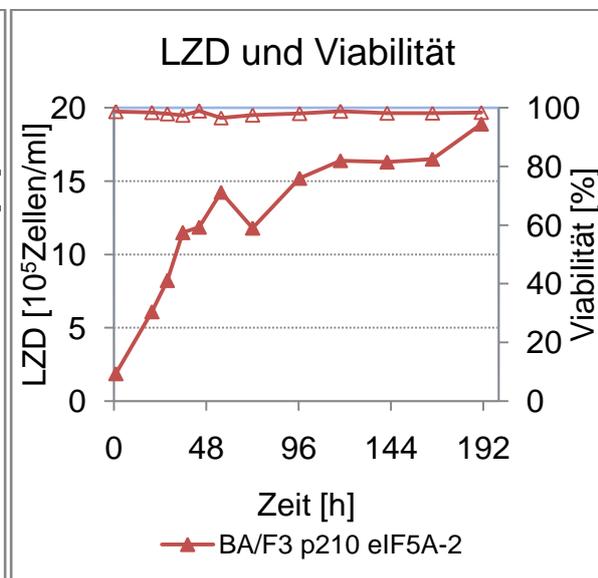


Abb. 5.30 LZD und Viabilität im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Im Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung stieg die LZD mit der Zeit immer mehr an und erreichte in einem Bereich zwischen 117,7 - 165,5 Stunden einen relativ konstanten Wert ($1,63 - 1,65 \cdot 10^6$ Zellen/ml). Gegen Ende des Versuchs stieg die LZD auf einen Wert von $1,89 \cdot 10^6$ Zellen/ml an, bei einer Viabilität von 98,4%. Die Viabilität der Zellen lag während des gesamten Versuchs überhalb von 96%.

Glukose- und Laktatkonzentration

In Abb. 5.31 ist der Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration dargestellt. Die Glukosekonzentration lag zu Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise, nach 35 Stunden bei 2 mmol/L. Damit wurde die Glukosegrenzkonzentration von 2 mmol/L während des vorangegangenen Batchs nicht unterschritten. Im weiteren Verlauf sank die Glukosekonzentration trotz kontinuierlicher Zufütterung weiter ab und erreichte nach 55,6 Stunden mit 0,73 mmol/L ihren Tiefstwert. Danach stieg die Glukosekonzentration wieder an und erreichte nach 191 Stunden mit einem Wert von 2,53 mmol/L ihren Höchstwert.

Die Laktatkonzentration lag zu Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise bei einem Wert von 14,6 mmol/L und stieg im weiteren Verlauf auf den Höchstwert von 18,9 mmol/L an. Die Laktatkonzentration bewegte sich in der Folge weiter in diesem Bereich. Nach 96,5 Stunden wurde erstmals wieder eine geringere Laktatkonzentration gemessen, die bei 16,7 mmol/L lag. Im weiteren Verlauf war zu erkennen, dass die Laktatkonzentration immer mehr abgesunken ist und am Ende des Versuchs, nach 191 Stunden mit einer Konzentration von 13,15 ihren Tiefpunkt in der kontinuierlichen Kulturführung erreichte.

Die Glukose- und Laktatkonzentration bewegten sich im Verlauf der kontinuierlichen Betriebsweise wieder aufeinander zu. Diese Beobachtung wurde auch schon im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml gemacht (siehe Seite 65).

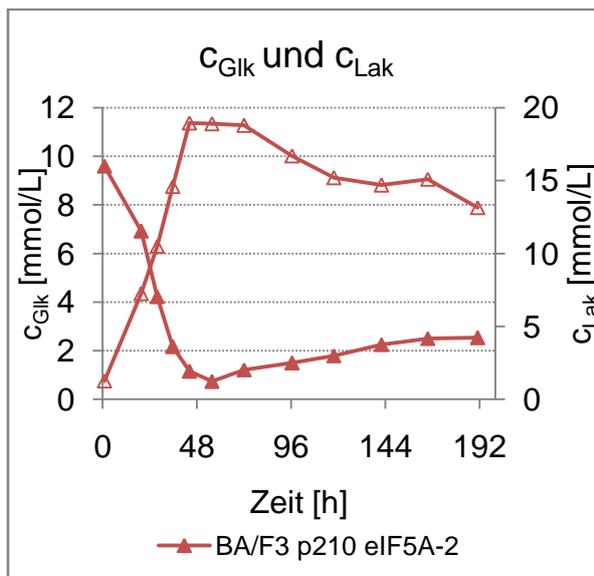


Abb. 5.31 Glukose- und Laktatkonzentration im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

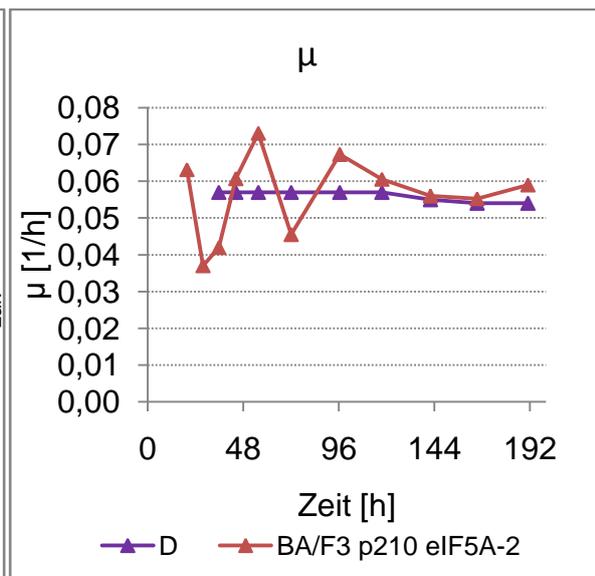


Abb. 5.32 Wachstumsrate und Verdünnungsrate im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Wachstumsrate und Verdünnungsrate

In Abb. 5.32 ist der Verlauf der Wachstumsrate und der Verdünnungsrate dargestellt. Zu Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise, nach 35 Stunden, betrug die Wachstumsrate 0,042 1/h. Nach Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise stieg die Wachstumsrate an und erreichte nach 55,6 Stunden ihren Höchstwert, der bei 0,73 1/h lag. Mit fortlaufender Dauer pendelte sie sich immer mehr ein und bewegte sich in dem Zeitraum von 142 - 165,5 Stunden auf gleicher Höhe wie die Verdünnungsrate. Am Ende des Versuchs stieg die Wachstumsrate jedoch wieder an.

Die maximale Wachstumsrate, die in der Batch-Phase dieses Versuchs ermittelt wurde betrug 0,063 1/h. Um die Glukoseausbeute zu erhöhen, wurde die Verdünnungsrate in diesem Versuch auf 95% der maximalen Wachstumsrate des Batchs eingestellt und betrug damit 0,057 1/h. Im weiteren Verlauf wurde im Rahmen der langsam ansteigenden Glukosekonzentration, die Glukosekonzentration stieg nach Überwindung des Tiefpunkts immer weiter an, die Verdünnungsrate mehrmals geringfügig verringert, um die Glukoseausbeute damit möglichst hoch zu halten. Nach 123,6 Stunden wurde die Verdünnungsrate das erste Mal geringfügig vermindert. Zu diesem Zeitpunkt lag eine Glukosekonzentration von 2,25 mmol/L vor. Am Ende des Versuchs betrug die Verdünnungsrate 0,053 1/h.

Betrachtet man den Verlauf der Wachstumsrate und der Verdünnungsrate in dem Zeitraum von 142 – 165,5 Stunden, so fällt auf, dass die Wachstumsrate und die Verdünnungsrate in diesem Bereich annäherungsweise identisch waren. Nach 165, 5 Stunden stieg die Wachstumsrate wieder an, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich bis dahin noch kein Fließgleichgewicht eingestellt hat.

Durch die Veränderung der Verdünnungsrate wurden die Bedingungen für den kontinuierlichen Betrieb verändert, so dass streng genommen nach letztmaliger Änderung der Verdünnungsrate wiederum das etwa 3 - 5-fache des konstanten Arbeitsvolumens durch den Bioreaktor hätte laufen müssen, ehe sich ein, der neuen Verdünnungsrate entsprechendes, Fließgleichgewicht eingestellt hätte.

Abschließend wird darauf hingewiesen, dass die Verdünnungsrate, die über die Schlauchpumpe eingestellt wurde, möglicherweise nicht der tatsächlichen Verdünnungsrate entsprochen hat. So können beispielsweise Abnutzungserscheinungen des Schlauchs dazu führen, dass sich die Pumprate im Verlauf der Zeit ändert.

Spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate

In Abb. 5.33 ist der Verlauf der spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate dargestellt. Die spezifische Glukoseverbrauchsrate bewegte sich zu Beginn der Kultivierung (Batch-Phase) in einem Bereich von $0,26 - 0,46 \text{ Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$.

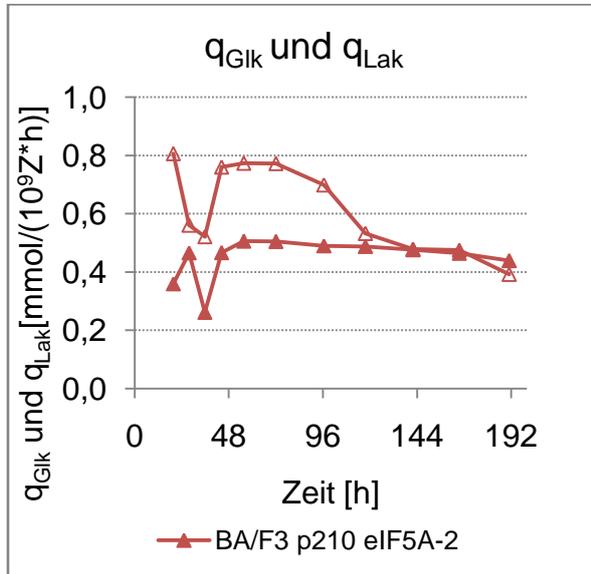


Abb. 5.33 Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

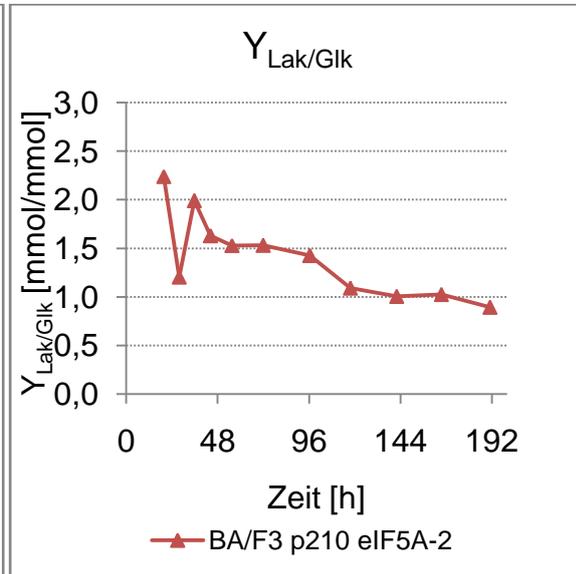


Abb. 5.34 Ausbeutekoeffizient Lak/Glk im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Im kontinuierlichen Betrieb zeigte sich am Ende des Kultivierungsverlaufs eine leichte Abnahme der spezifischen Glukoseverbrauchsrate, die möglicherweise dadurch zustande gekommen ist, dass sich die Zellen im Verlauf der Kultivierung immer besser an die vorherrschenden Bedingungen angepasst haben. So sank die spezifische Glukoseverbrauchsrate bei relativ konstanten Werten für die LZD von anfänglichen $0,5$ auf $0,45 \text{ Glk} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$.

Die spezifische Laktatbildungsrate nahm im Verlauf des Batchs immer mehr ab, stieg nach Beginn der kontinuierlichen Kultivierung wieder auf $0,76 \text{ Lak} \cdot 10^{-9} \text{ Zellen} \cdot \text{h}^{-1}$ an und hielt sich für ca. 40 Stunden auf diesem Niveau um danach immer stärker abzusinken und sich letztlich den Werten der spezifischen Glukoseverbrauchsrate anzugleichen, was einen Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lak/Glk}}$ von ca. 1 mmol/mmol zur Folge hatte.

Ausbeutekoeffizient $Y_{Lak/Glk}$

In Abb. 5.34 ist der Verlauf des Ausbeutekoeffizienten $Y_{Lak/Glk}$ zu sehen. Der Ausbeutekoeffizient lag zu Beginn der kontinuierlichen Kultivierung bei ca. 1,5 mmol/mmol, sank jedoch infolge der sinkenden spezifischen Laktatbildungsrate immer weiter ab und erreichte ca. 100 Stunden nach Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise einen Wert von etwa 1 mmol/mmol.

 pO_2 und pH-Wert

In Abb. 5.35 ist der Verlauf des pO_2 - und pH-Werts dargestellt. Der pO_2 lag zu Beginn des Versuchs bei einem Wert von 97,9% des Sättigungswerts für die Gelöstsauerstoffkonzentration.

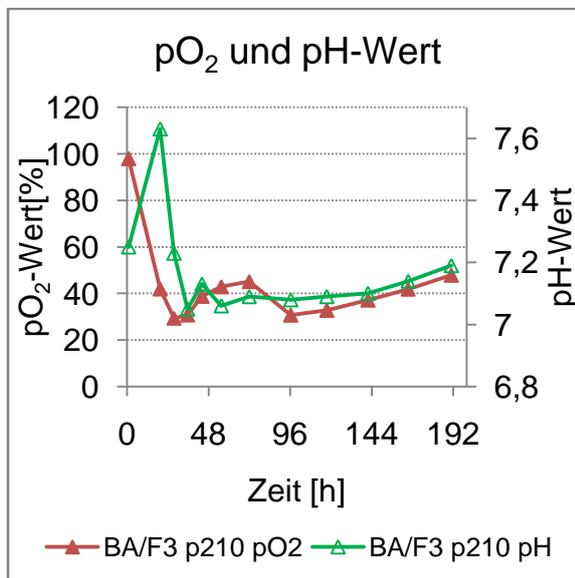


Abb. 5.35 pO_2 und pH-Wert im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

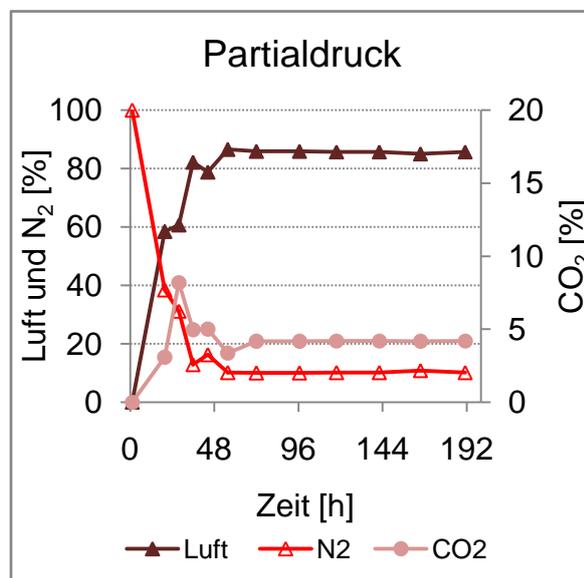


Abb. 5.36 Partialdruck der verschiedenen Gase im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Während der kontinuierlichen Betriebsweise bewegte sich der pO_2 -Wert weitestgehend in einem Bereich von 30 - 40%. Nach 96,5 Stunden betrug der pO_2 -Wert 30,7%. Danach stieg die Gelöstsauerstoffkonzentration fortlaufend an und betrug am Ende des Versuchs nach 191 Stunden 47,9%. Möglicherweise ändern die Zellen im Verlauf der kontinuierlichen Betriebsweise ihren Stoffwechsel, was zu einer geringeren Sauerstoffaufnahme der Zellen führen könnte.

Die Zusammensetzung der Zuluft änderte sich während der gesamten Dauer der kontinuierlichen Betriebsweise nicht mehr. Der Anstieg des pO_2 -Werts erfolgte im gleichen Zeitraum, in dem die spezifische Laktatbildungsrate abgenommen hat.

Der pH-Wert (Abb. 5.35) stieg innerhalb der Batch-Phase sehr stark an und erreichte nach 19,7 Stunden einen Wert von 7,63. Durch Erhöhung der CO₂-Konzentration auf Werte überhalb von 5% wurde der pH-Wert wieder verringert und betrug nach 35 Stunden, also zu Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise 7,05. Während der kontinuierlichen Betriebsweise bewegte sich der pH-Wert in einem Bereich von 7,06 - 7,19.

Begasung

In Abb. 5.37 ist der Verlauf der Begasung dargestellt. Während der Batch-Phase wurde die Begasungsrate schrittweise von 0,012 vvm auf 0,036 vvm angehoben. Während der kontinuierlichen Betriebsweise wurde die Begasungsrate von 0,039 vvm beibehalten.

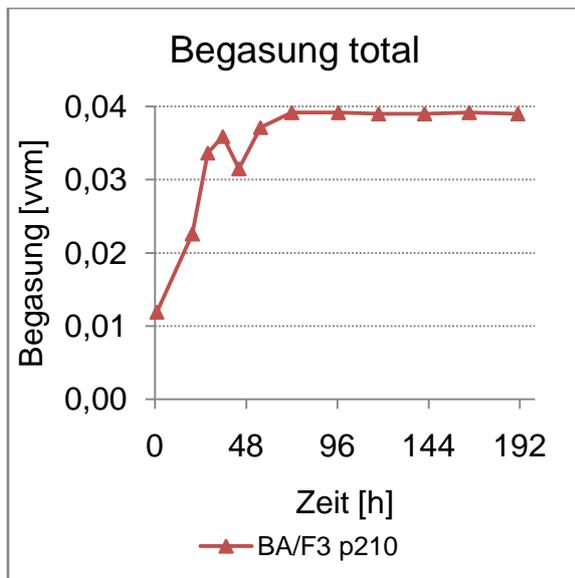


Abb. 5.37 Begasung total im Versuch
kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

5.3.3.1 Viabilitätsbestimmung der gelagerten Zellen

Im Laufe des Versuchs kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml wurden insgesamt drei Schottflaschen (jeweils 2 L) mit Zellsuspension befüllt. Die 2 L Flaschen befanden sich, während sie mit Zellsuspension aus dem laufenden Prozess befüllt wurden, in einer mit Eis gefüllten Styroporbox, so dass die Zellsuspension heruntergekühlt wurde. Sobald eine Flasche befüllt war, wurde diese steril vom System abgetrennt im Kühlraum (4°C) gelagert und durch eine neue Flasche ersetzt, die ihrerseits befüllt

wurde. Die kontinuierliche Betriebsweise erstreckte sich über einen Zeitraum von 156 Stunden. In Tabelle 5.3 sind die Zeiträume innerhalb der kontinuierlichen Betriebsweise dargestellt, in denen die Flaschen (1 - 3) der Reihe nach befüllt wurden.

Tabelle 5.3 Die in bestimmten Zeiträumen aufgefangene Zellsuspension des Versuchs kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Dauer [h]	Aufgefangenes Volumen [ml]	Flasche Nr.
0 - 83	1892	1
48 - 131	1094	2
131 - 156	382	3

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Zellen am folgenden Tag aus den drei Schottflaschen hinsichtlich ihrer Viabilität untersucht. Die Zellen, die im Laufe der Lagerung sedimentiert sind und sich auf dem Flaschenboden abgesetzt hatten durch leichtes Schütteln der Flaschen resuspendiert. Aus jeder Flasche wurde eine Probe genommen, die hinsichtlich der Viabilität und der Zelldichte (Zellen mit intakten Zellmembranen) untersucht wurde. In Tabelle 5.4 sind die Ergebnisse der Viabilitätsbestimmung dargestellt.

Tabelle 5.4 Ergebnisse aus der Viabilitätsbestimmung der gelagerten Zellen aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Flasche Nr.	Viabilität [%]	Zellen mit intakter Zellmembran [10^5 Zellen/ml]
1	nicht bestimmbar	1,6
2	nicht bestimmbar	3,5
3	87,1	12,1

Die Viabilität der Proben aus den ersten beiden Flaschen war nicht bestimmbar. Es lagen extrem viele Zelltrümmer vor und kaum noch Zellen mit intakter Zellmembran. Vergleicht man die für die verschiedenen Flaschen ermittelten Zelldichten an Zellen mit intakter Zellmembran miteinander, so ist eine klare Tendenz zu erkennen: mit zunehmender Lagerungsdauer nimmt die Anzahl an Zellen mit intakter Zellmembran ab.

Im Vergleich zum Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml wurden die Zellen aufgrund der längeren Versuchsdauer auch für einen längeren Zeitraum gelagert. Im Versuch kontinuierliche Betriebsführung mit 100 ml dauerte die kontinuierliche Betriebsweise insgesamt 92 Stunden. Im Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml hingegen dauerte die kontinuierliche Betriebsweise 156 Stunden.

Da für diesen Versuch die Zelllinie BA/F3 p210 eIF5A-2 eingesetzt wurde und nicht die BA/F3 p210 Zelllinie, könnte die Ursache aber auch darin liegen, dass die Zellen der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie bei Lagerung auf Temperaturen um 4°C eher dazu tendieren zu lysieren, also in dieser Hinsicht weniger stabil sind als die BA/F3 p210 Zellen. Diese Vermutung wird durch die in Flasche 3 schon deutlich gesunkenen Viabilität gestützt, die mit 87,1% deutlich geringer ist als die Viabilität der am längsten gelagerten Flasche 1 aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit einem Volumen von 400 ml:

Bei diesem Versuch, der als Batch gestartet wurde, betrug die LZD am Ende des Batches (nach 35 Stunden) $1,15 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei einer Viabilität von 97,5%. Die Glukosekonzentration betrug zu diesem Zeitpunkt 2,16 mmol/L. Nach 191 Stunden, am Ende des Versuchs wurde die maximale LZD von $1,89 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht. Die Viabilität betrug zu diesem Zeitpunkt 98,4%.

Durch die Veränderung der Verdünnungsrate wurden die Bedingungen für den kontinuierlichen Betrieb verändert, so dass streng genommen nach letztmaliger Änderung der Verdünnungsrate wiederum das etwa 3 - 5-fache des konstanten Arbeitsvolumens durch den Bioreaktor hätte laufen müssen, ehe sich ein, der neuen Verdünnungsrate entsprechendes Fließgleichgewicht eingestellt hätte.

Die Glukosekonzentration, die sich während der kontinuierlichen Betriebsweise im Bioreaktor einstellte, bewegte sich zwischen 0,73 mmol/L und 2,53 mmol/L. Sie stieg mit zunehmender Dauer ausgehend vom Mindestwert von 0,73 mmol/L langsam an, obwohl die LZD relativ konstant geblieben ist.

Durch schrittweise Verringerung der Verdünnungsrate wurde versucht Einfluss auf die ansteigende Glukosekonzentration zu nehmen. Die Verdünnungsrate betrug zu

Beginn des Versuchs 0,057 1/h und am Ende 0,053 1/h und wurde damit nur geringfügig verändert.

Die Wachstumsrate, die im Verlauf dieses Versuchs ermittelt wurde, lag in einem ähnlichen Bereich wie auch die, die in statischer Kultivierung ermittelt wurde.

Die spezifische Glukoseverbrauchsrate war in diesem Versuch wiederum deutlich höher als die in statischer Kultivierung und war um den Faktor 3 - 4 höher als bei der entsprechenden Zelllinie, die in T-Flaschen kultiviert wurde.

Sie bewegte sich im kontinuierlichen Betrieb durchgehend in einem Bereich von 0,5 - 0,45 mmol Glk·10⁻⁹ Zellen·h⁻¹. Dabei wurde festgestellt, dass sie mit zunehmender Dauer leicht abgesunken ist, was auf eine Anpassung auf die im Bioreaktor vorherrschenden Bedingungen hindeuten könnte.

Eine mögliche Ursache für die höhere spezifische Glukoseverbrauchsrate ist wiederum in dem, bei dynamischer Kulturführung insgesamt höheren Stressaufkommens für die Zellen zu sehen. Das höhere Stressaufkommen wird dabei im Wesentlichen auf die während der Durchmischung auftretenden Scherkräfte und die während der Blasenbegasung auftretenden hydrodynamischen Spannungen zurückgeführt. Möglicherweise könnte durch optimalere Einstellungen (Rührerdrehzahl/ Begasungssystem) in Bezug auf den Sauerstoffeintrag ins Medium Einfluss auf die spezifische Glukoseverbrauchsrate genommen werden und eine höhere LZD erreicht werden.

Die Rührerdrehzahl bewegte sich auch in diesem Versuch durchgehend bei 170 U/min. Optimalere Einstellungen hinsichtlich des pH-Werts, des pO₂-Werts oder der Temperatur hätten möglicherweise auch zu einer höheren LZD führen können.

Nach Beendigung des Versuchs wurden am Folgetag, die in Auffangflaschen (4°C) gelagerten Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität (Integrität der Zellmembran) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen der BA/F3 p210 Zelllinie größtenteils lysiert waren. In Bezug auf die Zellyse zeigte sich, dass die Zellen, die am längsten gelagert wurden, den größten Anteil lysierter Zellen aufwiesen.

5.4 Fazit aus den vorangegangenen Versuchen

Aus den Vorversuchen (Zählreihen) erschließt sich, dass es deutliche Unterschiede hinsichtlich des Wachstumsverhaltens der beiden Zelllinien gab. Diese drückten sich vor allem in der unterschiedlich hohen erreichbaren LZD aus, und diese wurden auf einen Einfluss der Überexpression des Zielproteins eIF5A-2 zurückgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Zelllinien in statischer Kultivierung das Medium besser ausnutzten als in dynamischer Kultivierung, d.h. bei gleicher eingesetzter Mediummenge wurde in statischer Kultivierung eine größere maximale LZD erreicht, als in dynamischer Kultivierung. Aufgrund der in statischer Kultivierung besseren Ausnutzung des Mediums (niedrigere spezifische Glukoseverbrauchsrate) und der hohen erreichten maximalen LZD, insbesondere der BA/F3 p210 Zelllinie, wurde zeitweise in Erwägung gezogen diese beispielsweise in Roller bottles zu kultivieren.

Im Fed-Batch Versuch wurde, die in dynamischer Kultivierung höchste maximale LZD erreicht, die bei $2,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml (BA/F3 p210) lag. Da der Zeitpunkt, an dem sich die Zellen noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, nicht bestimmbar und mit Schwierigkeiten hinsichtlich der geforderten Reproduzierbarkeit zu rechnen war, wurde diese Betriebsweise im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr eingesetzt.

Ein weiteres Kriterium war hierbei auch, dass das eingesetzte Zufütterungsmedium kein entsprechendes Mediumkonzentrat darstellte, da nur Glukose und Glutamin in konzentrierten Mengen vorlagen, alle anderen Mediumkomponenten aber nicht. Außerdem ist für die Fed-Batch Betriebsweise ein relativ hoher apparativer Aufwand erforderlich.

Trotz der Vorteile, die die kontinuierliche Betriebsweise aufweist, im Wesentlichen ist hier das Fließgleichgewicht zu nennen, wurde diese Betriebsweise für die Produktion der geforderten Zellzahl ebenfalls nicht ausgewählt.

Als generelles Problem wurde hierbei die Lagerung der Zellen angesehen. Während der Zelllagerung kam es in dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml, der mit der BA/F3 p210 eIF5A-2 Zelllinie durchgeführt wurde, zu einer vermehrten Zelllyse, was zur Folge hatte, dass die Zellen unbrauchbar waren und die Zielproteine nicht mehr aufgereinigt werden konnten.

Abgesehen davon hätte es im Bezug auf die Zelllagerung im Rahmen proteolytischer Abbaureaktionen, die durch intrazellulär vorliegende Proteasen hervorgerufen

werden, zu Veränderungen am Zielprotein, bzw. auch an den Proteinkomplexen kommen können. Trotz der niedrigen Temperatur von 4°C konnte nicht davon ausgegangen werden, dass intrazellulär vorliegende Proteasen gänzlich inaktiv waren.

Die einfachste Lösung hinsichtlich der Produktion bzw. Generierung einer Zellzahl von 10^{10} Zellen, die sich bei Abbruch in der exponentiellen Wachstumsphase befinden sollten, bestand darin, eine Batch-Kultivierung im Biostat B durchzuführen. In Bezug auf die geforderte Reproduzierbarkeit der Kultivierungen stellte die Batch-Betriebsweise aufgrund ihrer Einfachheit, in Bezug auf die Umsetzung, die geeignetste Betriebsweise dar.

Aus den Vorversuchen, die im Vario 1000 immer als Batch gestartet wurden, konnte abgeschätzt werden, wie viele Zellen man in einem 5 L Bioreaktor produzieren kann. Es wurde mit einer möglichen Zelldichte von ca. $1,5 - 1,7 \cdot 10^6$ Zellen/ml gerechnet, was bei einem Volumen von 5 L der geforderten Zellzahl von 10^{10} Zellen schon sehr nahe kommen würde. So lag die geschätzte, mit dem 5 L Bioreaktor erreichbare Zellzahl bei $0,75 - 0,85 \cdot 10^{10}$ Zellen.

5.5 Hauptversuch

5.5.1 Batch im Biostat B

Wachstumsverlauf

In Abb. 5.38 und Abb. 5.39 ist der Wachstumsverlauf der drei Batch-Kultivierungsversuche in semilogarithmischer und normaler Auftragung dargestellt. Die Anfangs-LZD betrug bei den ersten beiden Versuchen (Nr.1 und Nr.2) $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Im dritten Versuch (Nr.3) lag die Anfangs-LZD bei $1,1 \cdot 10^5$ Zellen/ml und war damit geringfügig höher als bei den beiden vorangegangenen Versuchen. Bei Betrachtung der Wachstumskurve in semilogarithmischer Auftragung, die in Abb. 5.38 dargestellt ist, kann man gut erkennen, dass alle Versuche in der exponentiellen Wachstumsphase beendet wurden und keine Lag-Phase vorlag.

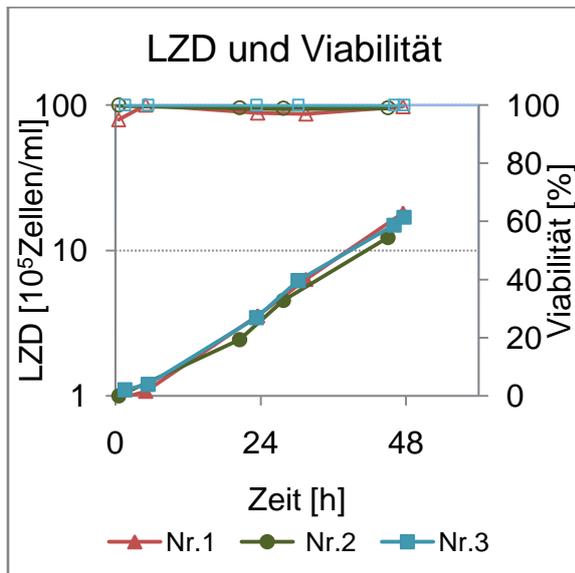


Abb. 5.38 LZD und Viabilität in semilogarithmischer Auftragung im Versuch Batch Biostat B

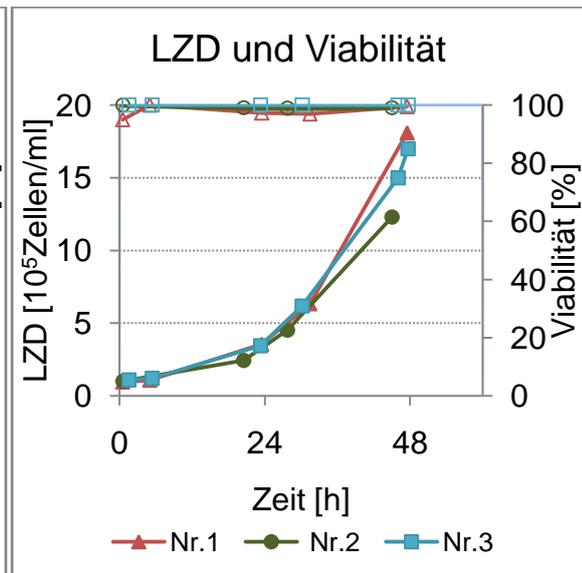


Abb. 5.39 LZD und Viabilität im Versuch Batch Biostat B

Der erste und dritte Versuch lieferten eine maximale LZD, die bei $1,81 \cdot 10^6$ Zellen/ml bzw. bei $1,7 \cdot 10^6$ Zellen/ml lag und kamen der geforderten Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml ziemlich nahe. Der zweite Versuch hingegen lieferte eine maximale LZD, die nur bei $1,23 \cdot 10^6$ Zellen/ml lag. Dabei lag die Viabilität aller drei Versuche zum Zeitpunkt des Abbruchs über 99%.

Der einzige offensichtliche Unterschied, der zwischen dem zweiten Versuch und den beiden anderen lag und damit auch für die geringere LZD verantwortlich zu sein schien, war das unterschiedliche Vorgehen in Bezug auf die Produktion des

Inokulums. Beim ersten und auch beim dritten Versuch wurden für das Inokulum Zellen eingesetzt, die schon längere Zeit (ca. 2 Wochen) in T-Flaschen kultiviert worden sind.

Das Inokulum für den zweiten Versuch sollte möglichst schnell hergestellt werden. Für die Herstellung vergingen, vom Auftauen der Zellen und der Inkulturnahme in T-Flaschen, bis hin zum fertigen Inokulum, lediglich 6 - 7 Tage. Der Zeitraum, der für die Anpassung, an die in den T-Flaschen vorherrschenden Bedingungen notwendig gewesen wäre, ist möglicherweise zu kurz ausgefallen. Deshalb war ein stabiler Zustand der Zellen nicht gewährleistet.

Glukose- und Laktatkonzentration

Im ersten Versuch betrug die Glukosekonzentration bei Abbruch 2,23 mmol/L. Beim dritten Versuch betrug die Glukosekonzentration am Ende 2,5 mmol/L. Im zweiten Versuch wurde trotz der geringeren erreichten LZD eine deutlich geringere Endkonzentration an Glukose ermittelt. Die Glukosekonzentration betrug bei diesem Versuch am Ende 1,28 mmol/L und lag damit deutlich unterhalb der Glukosegrenzkonzentration von 2 mmol/L, die als Abbruchkriterium verwendet wurde.

Die Laktatkonzentration lag bei Kultivierungsabbruch bei dem ersten Versuch bei 14,4 mmol/L und bei dem dritten Versuch bei 16,3 mmol/L. Bei dem zweiten Versuch wurde die höchste Laktatkonzentration aller drei Versuche ermittelt. Sie lag bei 17,25 mmol/L.

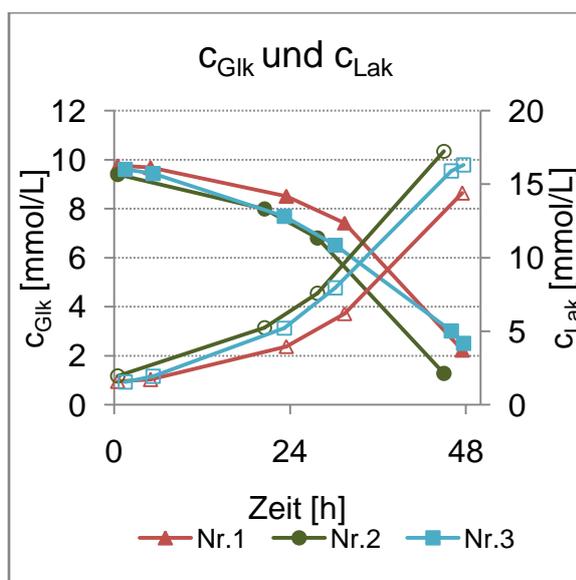


Abb. 5.40 Glukose- und Laktatkonzentration im Versuch Batch Biostat B

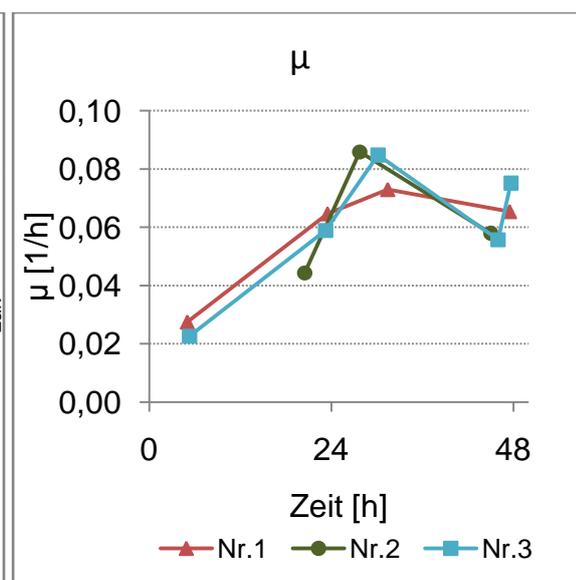


Abb. 5.41 Wachstumsrate im Versuch Batch Biostat B

Wachstumsrate

In Abb. 5.41 sind die Verläufe der Wachstumsraten für die drei Versuche dargestellt. Betrachtet man den Verlauf der Wachstumsraten, so fällt auf, dass die Wachstumsraten aller drei Versuche relativ nahe beisammen liegen. Für den zweiten Versuch konnte nicht wie angenommen eine, zu den beiden anderen Versuchen, vergleichsweise geringere Wachstumsrate festgestellt werden. Die Wachstumsrate für den zweiten Versuch weist nach 27,5 Stunden mit 0,086 1/h sogar den Höchstwert aller drei Kultivierungen auf.

Spezifische Glukose- und Laktatbildungsrate

In Abb. 5.42 sind die Verläufe für die spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate dargestellt. Betrachtet man die Verläufe der spezifischen Laktatbildungsrate, so erkennt man, dass die spezifische Laktatbildungsrate für den zweiten Versuch über den Verläufen der beiden anderen Versuchen liegt. Betrachtet man den Gesamtverlauf der spezifischen Glukoseverbrauchsrate des zweiten Versuchs, so kann man erkennen, dass dieser zumindest in der zweiten Hälfte des Batchs ebenfalls über denen der anderen liegt. Scheinbar haben die Zellen im zweiten Versuch mehr Glukose verbraucht und mehr Laktat gebildet, als in den beiden anderen Versuchen. Dieser Umstand hängt möglicherweise auch mit dem Unterschied hinsichtlich der Herstellung des Inokulums zusammen (siehe Seite 83).

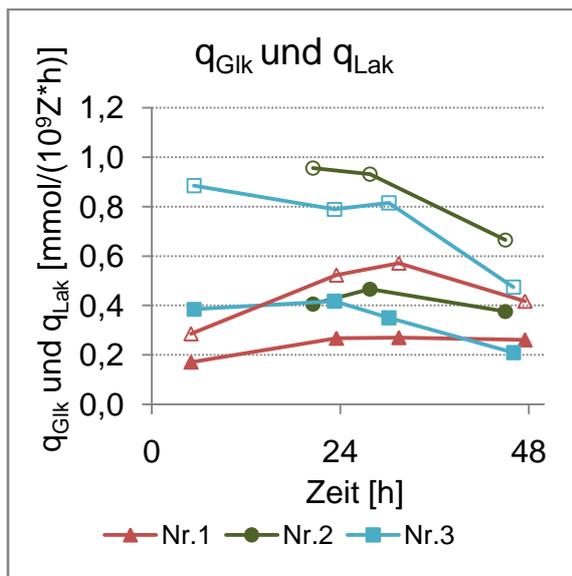


Abb. 5.42 Spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate im Versuch Batch Biostat B

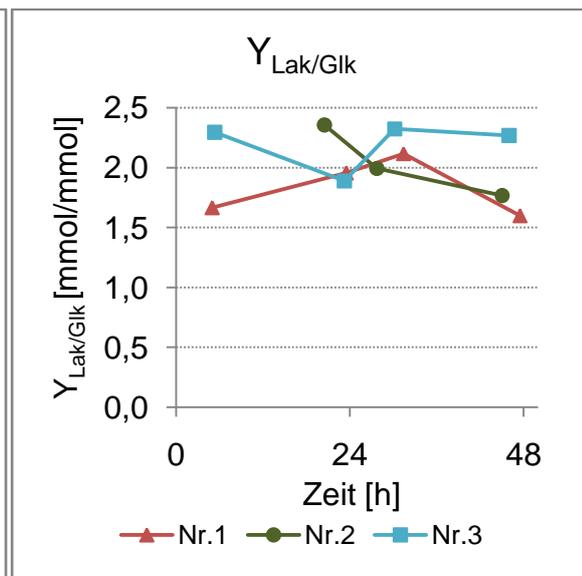


Abb. 5.43 Ausbeutekoeffizient Lak/Glk im Versuch Batch Biostat B

Lak/Glk-Ausbeutekoeffizient

In Abb. 5.43 ist der Verlauf der Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lak/Glk}}$ dargestellt. Bei Betrachtung der Ausbeutekoeffizienten ist nur eine leichte Tendenz zu erkennen. Trotzdem wird ersichtlich, dass der Ausbeutekoeffizient in der zweiten Hälfte des Batchs insgesamt abfällt. Ansonsten bewegte er sich zwischen 2,3 - 1,5 mmol/mmol.

pO₂-Wert

Der pO₂-Wert lag bei allen drei Kultivierungen (Versuch Nr.1 - Nr.3) zu Beginn annäherungsweise an der 100%-Marke (siehe Abb. 5.44). Die Begasung wurde erst gestartet, als ein pO₂-Wert von etwa 60% erreicht wurde. Begast wurde mit Mischgas, wobei die Konzentration an Sauerstoff durch Erhöhung der Begasungsrate der Prozessluft im Laufe der Kultivierung erhöht wurde. Am Ende der drei Kultivierungen lag der pO₂-Wert des ersten Versuchs nur noch bei 13%.

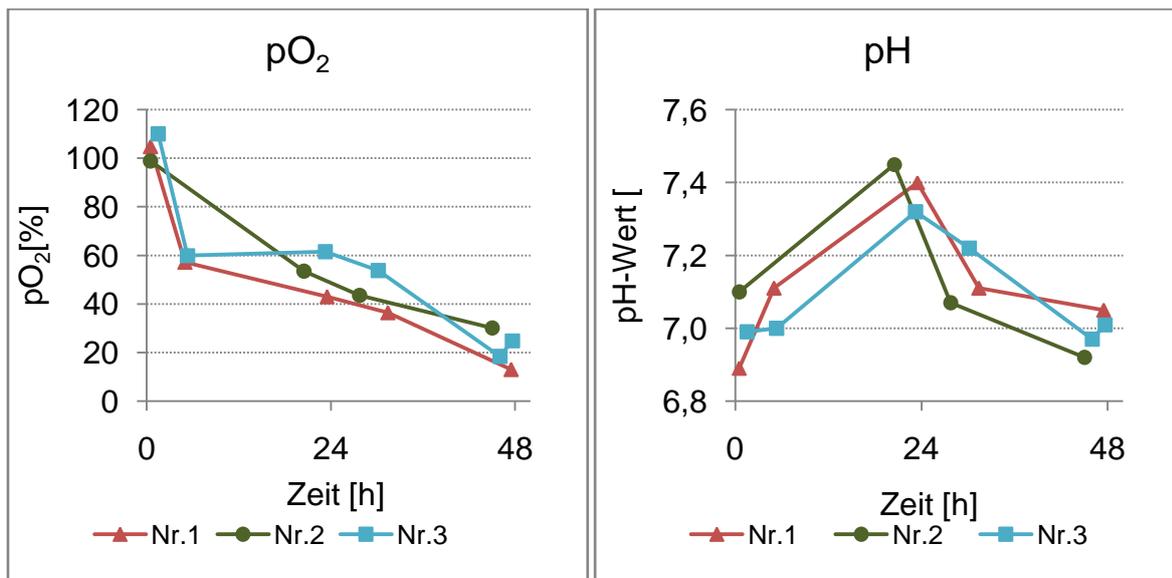


Abb. 5.44 pO₂-Wert im Versuch Batch Biostat B

Abb. 5.45 pH-Wert im Versuch Batch Biostat B

pH-Wert

Der pH-Wert zeigte für alle drei Versuche einen ähnlichen Verlauf (siehe Abb. 5.45). Zu Beginn der Versuche stieg der pH-Wert zunächst an, sank im weiteren Verlauf dann aber wieder ab. Im zweiten Versuch wurde nach 20,5 Stunden der Höchstwert für den pH-Wert aller drei Versuche ermittelt, der bei 7,45 lag. Der pH-Wert bewegte sich ansonsten bei allen drei Versuchen innerhalb der festgelegten Grenzen von 6,9 - 7,4.

Begasung

In Abb. 5.46 sind die Verläufe für die Begasung dargestellt. Die Begasung wurde erst gestartet, als der pO_2 -Wert bei ca. 50 - 60% lag. Die Begasung bewegte sich bei allen drei Versuchen, während der gesamten Versuchsdauer zwischen 0,004 - 0,009 vvm.

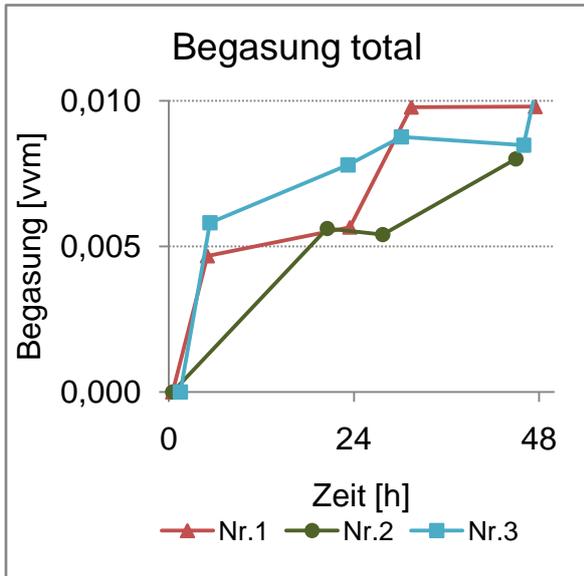


Abb. 5.46 Begasung im Versuch Batch Biostat B

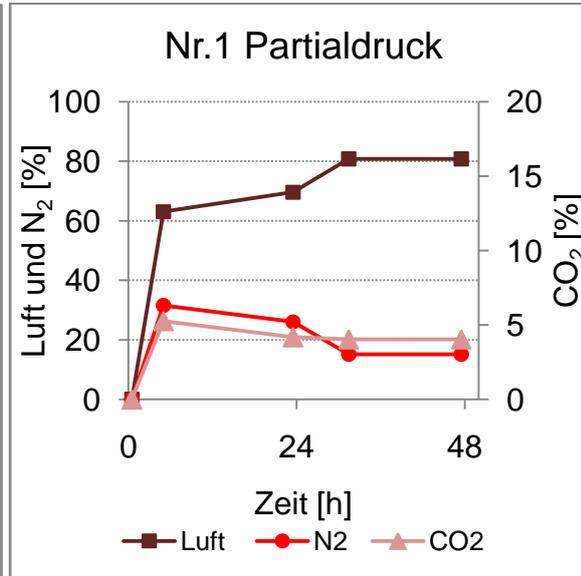


Abb. 5.47 Partialdruck für Nr.1 im Versuch Batch Biostat B

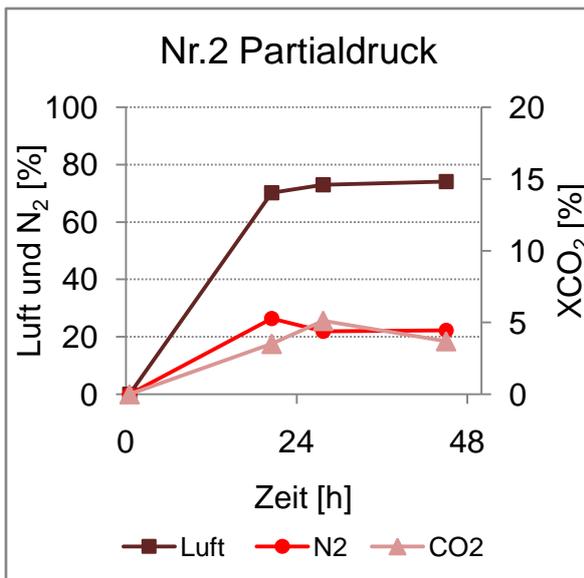


Abb. 5.48 Partialdruck für Nr.2 im Versuch Batch Biostat B

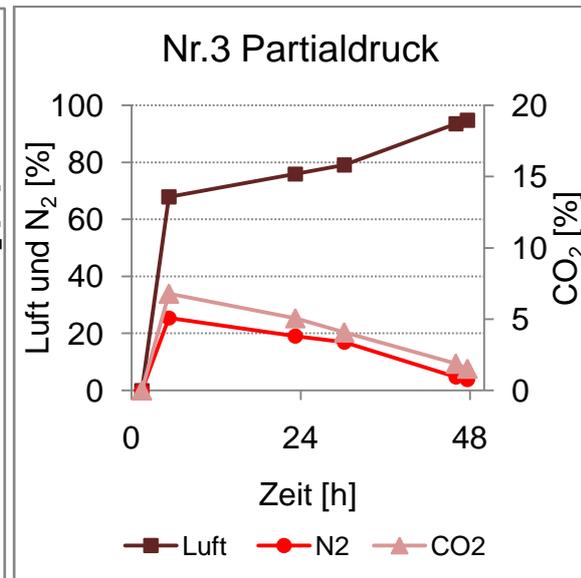


Abb. 5.49 Partialdruck für Nr.3 im Versuch Batch Biostat B

Partialdruck

In den Abbildungen (Abb. 5.47 - Abb. 5.49) ist die Zusammensetzung der Zuluft im Verlauf der Kultivierung der drei Versuche dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass bei dem ersten und dritten Versuch der Anteil an Prozessluft im Verlauf der Kultivierung leicht angehoben wurde um damit den steigenden Sauerstoffbedarf der Zellen bzw. der Gesamtheit der Zellen zu decken.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Versuch Batch Prozess (Nr.1 - Nr.3):

In Tabelle 5.4 ist die, in den drei Versuchen (Nr.1 - Nr.3) erzielte Gesamtlebendzellularzahl, die bei Abbruch des Versuchs ermittelte LZD und Viabilität, sowie das Erntevolumen enthalten.

Tabelle 5.4 Das Erntevolumen, die LZD und Viabilität bei Abbruch, sowie die erreichte Gesamtzellzahl lebender Zellen der drei Versuche (Nr.1 - Nr.3) aus dem Versuch Batch-Prozess im Biostat B

Versuch	Erntevolumen [ml]	LZD [10 ⁵ Zellen/ml]	Gesamtlebendzellzahl [10 ¹⁰ Zellen]	Viabilität [100%]
Nr.1	5050	18,1	0,91	99,5
Nr.2	5060	12,3	0,62	99,2
Nr.3	5040	17	0,86	100

Der zweite Versuch hat eine im Vergleich zu den beiden anderen Versuchen deutlich geringere Gesamtlebendzellzahl hervorgebracht. Der Grund hierfür liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in der, in diesem Versuch erfolgten, schnelleren Generierung des Inokulums. Bei zweiten Versuch vergingen vom Auftauen der Zellen bis zum Inokulum ca. 6 - 7 Tage. In dem ersten und dritten Versuchen befanden sich die Zellen, aus denen die Vorkultur entwickelt wurde dagegen schon ca. 2 Wochen in Kultur.

Die geforderte Zellzahl von $1 \cdot 10^{10}$ Zellen wurde in dem ersten und dritten Versuch annäherungsweise erreicht, bei einer Viabilität von über 99%. Die Glukosekonzentration von 2 mmol/L wurde nur im zweiten Versuch unterschritten, weshalb fraglich ist, ob sich die Zellen bei diesem Versuch noch innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Für den ersten und dritten Versuch konnte dagegen davon ausgegangen werden, dass sich die Zellen bei Abbruch innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase befunden haben.

Anhand des Vergleichs der Wachstumsverläufe und der Verläufe verschiedener Kultivierungsparameter zeigte sich (Nr.1 und Nr.3), dass die Batch-Betriebsweise auch in Bezug auf die Reproduzierbarkeit gut geeignet war. Allerdings wurde auch festgestellt, dass für die Reproduzierbarkeit von Kultivierungsergebnissen die Vorkulturführung der Zellen von besonderer Bedeutung ist.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Die Hauptaufgabe bestand in der Entwicklung und Etablierung eines Zellkulturprozesses für die Produktion von Suspensionszellen (BA/F3 p210 und BA/F3 p210 eIF5A-2). Der Zellkultur-Prozess sollte die Durchführung von reproduzierbaren Kultivierungen ermöglichen. Die geforderte Lebendzellzahl sollte bei Abbruch des Zellkulturprozesses bei $1 \cdot 10^{10}$ Zellen liegen. Die Zellen sollten sich bei Abbruch in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und eine möglichst hohe Viabilität aufweisen.

Im Vorfeld der Kultivierungsversuche, wurde das Wachstumsverhalten der entsprechenden Zelllinien mithilfe statischer Flaschenkultivierung untersucht, um mit den dabei ermittelten Werten eine Vergleichsbasis für später folgende Kultivierungen in den Rühr-Bioreaktoren zu schaffen. Zusätzlich wurde auch die Glukosegrenzkonzentration für beide Zelllinien anhand des Wachstumsverhaltens in statischer Kultivierung, bestimmt. Diese wurde als Abbruchkriterium für die folgenden Kultivierungsversuche verwendet.

Die Vorversuche, die im Wesentlichen darauf abzielten eine geeignete Betriebsweise (Batch-Betrieb, Fed-Batch und kontinuierlicher Betrieb) für die Produktion der Zellen zu ermitteln, wurden in einem kleinen Rühr-Bioreaktor (Vario 1000, Hersteller: Medorex, Arbeitsvolumen ca. 300 ml) durchgeführt.

Aus dem Vergleich der Kultivierungsergebnisse zwischen statischer und dynamischer Kultivierung der Zelllinien ergab sich, dass die Zellen in statischer Kultivierung das Medium besser ausnutzten und insgesamt höhere Lebendzell-dichten hervorbrachten.

Der Fed-Batch Betrieb brachte die höchste Lebendzell-dichte, die in dynamischer Kultivierung ermittelt wurde, hervor. Jedoch war es bei dieser Betriebsweise nicht möglich den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem sich die Zellen noch innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase befunden haben.

Beim kontinuierlichen Betrieb stellte sich heraus, dass die Zellen (BA/F3 p210 eIF5A-2) nicht lagerungsfähig waren und Verlauf der Lagerung lysierten. Außerdem war fraglich, ob die Art der Lagerung, die Zellsuspension wurde in gekühlten Flaschen aufgefangen, nicht einen negativen Einfluss auf die Zielproteine und die

Protein-komplexe haben würde, die letztlich im Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) aufgereinigt werden sollten.

Besonders im Hinblick auf die geforderte Reproduzierbarkeit der Kultivierungsergebnisse und die einfachere technische Umsetzung schien daher im Vergleich die Batch-Betriebsweise die geeignetere Betriebsweise zu sein.

Für eine Maßstabsvergrößerung (Scale-up) stand ein 5-L Labor-Bioreaktor (Biostat B, Hersteller: Sartorius) zur Verfügung, der im Hauptversuch eingesetzt wurde. Im Hauptversuch wurden drei Batch-Prozesse durchgeführt, deren Ausführung identisch sein sollte.

Dabei zeigte sich, dass die Vorkulturführung einen wesentlichen Aspekt in Bezug auf die Reproduzierbarkeit eines Kultivierungsprozesses darstellt. Da die Zellen, die aufgetaut werden um ein Inokulum zu produzieren, einen gewissen zeitlichen Vorlauf benötigen bevor sie sich für die Herstellung des Inokulums eignen.

Insgesamt zeigte der Hauptversuch, dass sich der Batch-Betrieb für die reproduzierbare Produktion der geforderten Zellzahl eignete, auch wenn dabei die geforderte Zellzahl nicht ganz erreicht wurde.

Die Zellkultivierung erfolgte im Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik. Die Aufreinigung der intrazellulär vorliegenden Zielproteine sollte jedoch am UKE erfolgen. Deshalb war es notwendig, die sich der Zellernte anschließenden Prozesse (Down-Stream-Prozesse) wie Zellabtrennung und Zellyse noch innerhalb des Instituts auszuführen, um die Weiterverarbeitung am UKE zu optimieren.

Nach dem Ernten der Zellen aus dem Hauptversuch wurden diese abzentrifugiert, gewaschen und lysiert. Das geklärte Lysat, mit den darin enthaltenen Zielproteinen wurde anschließend dem UKE übergeben.

6.2 Ausblick

Der Batch-Kultivierungsprozess, der in dieser Arbeit entwickelt und etabliert wurde, ist prinzipiell auch für die Produktion anderer BA/F3 p210 Produktionszelllinien einsetzbar, die vom UKE im Rahmen eines neuen, möglichen Therapieansatzes für die chronische myeloische Leukämie untersucht werden sollen.

Es wäre von Vorteil, wenn der gesamte Prozess inklusive der Aufreinigung der Zielproteine in einem Labor durchgeführt wird. Dadurch wäre ein schnellerer Ablauf in Bezug auf die Aufreinigung gewährleistet, der mögliche Veränderungen auf molekularer Ebene der Zielproteine minimieren würde.

7 Literaturverzeichnis

1. **Clark, David P. / Pazdernik Nanette J.** *Molekulare Biotechnologie*
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
2. **Schürrie, Karsten** *Proteomforschung*.
Bonn: BMBF Publik, 2003.
3. **Pörtner, Ralf / Haas, Volker C.** *Praxis der Bioprozesstechnik*
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
4. **Stefan Balabanov, et al.** *Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach*
Blood, 2007, S. 1701-11. Volume 109.
5. **Bertz, Janina** *Die Wirkung dualer PPAR α / γ -Liganden auf das Wachstum von Zelllinien der Chronischen myeloischen Leukämie, Dissertation.*
Berlin: Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik 2 mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der Medizinischen Fakultät der Charite, 2009.
6. **Brauer, Katharina Maria** *Einfluss der Aktivität von BCR-ABL auf die Immunogenität von Zellen der Chronisch Myeloischen Leukämie, Dissertation.*
Tübingen: Eberhard Karls Universität, Fakultät für Biologie, 2008.
7. **Riehm, Birte Elisabeth** *Therapieoptimierung der chronischen myeloischen Leukämie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib: Monozentrische Auswertung von 300 Patienten, Dissertation.*
Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität, Fakultät für Klinische Medizin.
8. **Schwab, Katrin Susanne** *Vergleichende Proteomanalyse des Knochenmarks von Patienten mit Chronisch myeloischer Leukämie und Peripheren Blutstammzellen gesunder Spender, Dissertation.*
München: Ludwig-Maximilian-Universität, 2009.
9. **Zanelli C.F. and Valentini S.R.** *Is there a role for eIF5A in translation.*
Sao Paulo State University: Amino Acids, 2007.
10. **Chen, David Li-En Jao and Kuang Yu** *Tandem Affinity Purification Revealed the Hypusin-dependent Bindung of Eukaryotic Initiation Factor 5A to the Translating 80S Rboosomal Complex.*
Department of Chemistry and Chemical Biology, The State University of New Jersey: Journal of Cellular Biochemistry, 2006. S. 583-598. Bd. 97.
11. **Hartmann, Andrea** *Untersuchung Molekularer Mechanismen der EBNA-2 vermittelten Transaktivierung, Dissertation.*
München: Ludwig-Maximilian-Universität, Fakultät für Biologie, 2007.

12. **Eibl, D. et al.** *Cell and Tissue Reaction Engineering, Mammalian Cell Culture Technologie.*
Heidelberg: Springer Verlag, 2009
13. **Chisti, Yusuf** *Animal-cell damage in sparged Bioreactors*
Tibtech, 2000. Bd.18.
14. **Storhas, W.** *Bioverfahrensentwicklung*
Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2003.
15. **Minuth, W.W. / Strehl, R. / Schumacher, K.** *Zukunftstechnologie Tissue Engineering.*
Weinheim: Wiley-VCH-Verlag, 2003.
16. **Pörtner, R.** *Cell and Tissue Engineering, Characteristics of Mammalian Cells and Requirements.*
Heidelberg: Springer Verlag, 2009. S. 20-23.
17. **Lanks K.W.** *End product of glucose and glutamin metabolism by cultured celllines: J. Cell. Physiol., 1988. S. 151-155. Bd. 135.*
18. **Irani, Noushin** *Verbesserung des Energiestoffwechsels von kontinuierlichen Zelllinien durch die Einführung einer Hefe-Pyruvat-Carboxylase.*
Braunschweig: Technische Universität Carolo-Wilhelmina, 1999. S. 187-196. Bd. 1.
19. **Biebl, Manfred** *Apoptose neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen in vivo Untersuchungen zur Regulation adulter Neurogenes, Dissertation.*
Regensburg: Universität Regensburg, Biologie und Vorläufige Medizin, 2003.
20. **Clement, Joshimol Jerry** *Immunhistochemischer Apoptosenachweis von Regulatorproteinen Beim Ulcus Cruris Venosum.*
Freiburg: Universitäts-Hautklinik der Albert-Ludwigs-Universität, 2002.
21. **Martens, Dirk Egberts** *Growth and Death of Animal cells in Bioreactors.*
Wageningen: Universität-Wageningen, Niederlande, 1996.
22. **Eibl, D. / Eibl, R.** *Cell and Tissue Reaction Engineering, Bioreaktoren für Mammalian Cells.*
Heidelberg: Springer Verlag, 2009. S. 55-81.
23. **Storhas, Winfried** *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen.*
Berlin: Springer Verlag, 1994.
24. **Chmiel, H.** *Bioprozesstechnik.*
München: Spektrum Akademischer Verlag, 2006.

8 Anhang

8.1 Symbole und Formelzeichen

C_X	Zelldichte	[Zellzahl/ml]
$C_{X,G}$	Zelldichte gesamt	[Zellzahl/ml]
$C_{X,v}$	Zelldichte lebend	[Zellzahl/ml]
$C_{X,0}$	Anfangszelldichte	[Zellzahl/ml]
c_{Glk}	Glukosekonzentration	[mmol/L]
\bar{c}_{Glk}	Gleichgewichts-Glukosekonzentration	[mmol/L]
$c_{Glk,0}$	Glukosekonzentration im Zulauf	[mmol/L]
$c_{Glk,alt}$	Glukosekonzentration vor der Zufütterung	[mmol/L]
$c_{Glk,neu}$	Einzustellende Glukosekonzentration	[mmol/L]
$c_{Glk,Zu}$	Glukosekonzentration des Zufütterungsmediums	[mmol/L]
c_{Lak}	Laktatkonzentration	[mmol/L]
\bar{c}_{Lak}	Gleichgewichts-Laktatkonzentration	[mmol/L]
$c_{Lak,0}$	Glukosekonzentration im Zulauf	[mmol/L]
$c_{Lak,Zu}$	Laktatkonzentration des Zufütterungsmediums	[mmol/L]
D	Verdünnungsrate	[1/h]
F	Zulaufstrom	[ml/h]
K	Kammerfaktor der Neubauer Zählkammer	[10^4 /ml]
q_{Glk}	spezifische Glukoseverbrauchsrate	[mmol/(10^9 Zellen·h)]
q_{Lak}	spezifische Laktatbildungsrate	[mmol/(10^9 Zellen·h)]
t_d	Verdopplungszeit	[h]
V	Arbeitsvolumen	[ml]
V_{alt}	Kulturvolumen vor der Zufütterung	[ml]
V_F	Verdünnungsfaktor	[-]
V_{Zu}	Volumen an Zufütterungsmedium	[ml]
$V_{Zu,Nacht}$	Volumen an Zufütterungsmedium über Nacht	[ml]
\bar{X}_v	Gleichgewichts-Lebendzell-dichte	[Zellzahl/ml]

Z	Mittelwert aus 4 ausgezählten Großquadraten	[Zellzahl]
μ	spezifische Wachstumsrate	[1/h]
μ_{\max}	max. spezifische Wachstumsrate	[1/h]

8.2 Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
AML	Akute myeloische Leukämie
BA/F3	immotalisierte murine pro-B-Zelllinien
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region - Abelson Murine Leukemia
CML	Chronische myeloische Leukämie
DCU	Digital Control Unit
DMEM	Dulbeccos Modifikation des Eagle-Minimalmediums
DHS	Deoxyhypusin-Synthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOHH	Deoxyhypusin-Hydroxylase
EGTA	Ethylenglykol-Tetraessigsäure
eIF5A	Eukaryotic Initiation Factor 5A
eIF5A-2	Eukaryotic Initiation Factor 5A-2
FCS	Fötale Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
Glk	Glukose
GZD	Gesamtzelldichte
IgG	Immunglobulin G
JCI	Journal of Clinical Investigation
K562	älteste Leukämie-Zelllinie des Menschen
kDa	kiloDalton
Lak	Laktat
LZD	Lebendzelldichte
MCB	Master Cell Bank
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
OTR	Oxygen Transport Rate
OUR	Oxygen Uptake Rate
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEEK	Polyetheretherketon

PenStrep	Penicillin/Streptomycin
ProtA	Protein A aus der Zellwand von Staphylococcus aureus
p190	BCR-ABL-Onkoprotein (190 kDa)
p210	BCR-ABL-Onkoprotein (210 kDa)
p230	BCR-ABL-Onkoprotein (230 kDa)
RPMI-1640	Standardmedium in der Zellkulturtechnik (Roswell Park Memorial Institute)
TEV	Tobacco Etch Virus
TAP-Tag	Tandem-Affinity-Purification-Tag
UCCH	Universitäres Cancer Center Hamburg
UKE	Univerisitäts-Klinikum Eppendorf
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
vvm	Einheit für die Begasung (Volume per Volume per Minute)
WCB	Working Cell Bank
YSI	Yellow Springs Instruments

8.3 Materialien und Geräte

Tabelle 8.1 Verwendete Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Hersteller
Avani J-25	Beckman Coulter
Biofuge Fresco	Haraeus
Biofuge Stratos	Haraeus
Druckminderer	Linde
Glasflaschen	Schott
Neubauer Improved Zählkammer	Blau Brand
Hydrophile Spritzenfilter (Sterilfilter)	Roth
HeraCell Inkubator	Kendro Laboratory Products
Sterilfilter (Gas)	Sartorius
Mikroskop	Nikon
Minifuge RF	Haraeus
pH-Sonde	Brodley James Corporation
Serologische Pipetten	Roth
Parafilm	American Can Company
Pipettenspitzen	Roth
Pipettierhilfe, elektronisch	Hirschmann Laborgeräte
pO ₂ -Sonde	Mettler Toledo
Rotameter	Krohne
Sterilwerkbank Klasse 2	Cryo-Technik GmbH
Sterile Spritzen	Roth
T-Flaschen	Sarstedt
Wasserbad	Lauda
YSI	Kreienbaum
Zentrifugenröhrchen	Roth
Zentrifugenflaschen (500 ml)	Beckman Coulter

8.4 Chemikalien

Tabelle 8.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
D-Glukose	Sigma
DMSO	Merck
Ethanol	Roth
HCl	Merck
KCl	Merck
KH_2PO_4	Merck
L-Glutamin	Merck
NaCl	Merck
Na_2CO_3	Merck
Na_2HPO_4	Merck
NaOH	Merck
Trypan Blau	Invitrogen

8.5 Kultivierungsdaten

Zählreihen

Tabelle 8.3 Kultivierungsparameter des Versuchs Zählreihe (BA/F3 p210)

Datum	Dauer [h]	LZD [10 ⁵ Z/ml]	GZD [10 ⁵ Z/ml]	Viab. [%]	C _{Glik} [mmol/L]	C _{Lak} [mmol/L]
30.03.2009	0	1	1	100,0	9,87	0,82
31.03.2009	24	3,55	3,6	98,6	9,28	2,32
01.04.2009	47,5	10,15	10,2	99,5	8,12	3,54
02.04.2009	71	17,6	17,65	99,7	6,36	5,24
03.04.2009	95	41,85	42,1	99,5	3,34	6,81
04.04.2009	119,5	40	42,8	93,5	0,38	10,55

Tabelle 8.4 Kultivierungsparameter des Versuchs Zählreihe (BA/F3 p210)

Datum	Dauer [h]	μ [1/h]	q _{Glc} [mmol/(10 ⁹ Z*h)]	q _{Lak} [mmol/(10 ⁹ Z*h)]	Y _{Lak/Glc}
30.03.2009	0				
31.03.2009	24	0,053	0,108	0,275	2,542
01.04.2009	47,5	0,045	0,072	0,076	1,052
02.04.2009	71	0,023	0,054	0,052	0,966
03.04.2009	95	0,036	0,042	0,022	0,520
04.04.2009	119,5	-0,002	0,030	0,037	1,264

Tabelle: 8.5 Kultivierungsparameter des Versuchs Zählreihe (BA/F3 p210 eIF5A-2)

Datum	Dauer [h]	LZD [10 ⁵ Z/ml]	GZD [10 ⁵ Z/ml]	Viab. [%]	C _{Glik} [mmol/L]	C _{Lak} [mmol/L]
20.7.09 15:45	0	1,04	1,04	100,0	9,52	1,42
21.7.09 9:30	17,75	2	2,05	97,6	9,28	1,98
22.7.09 10:00	42,25	13,19	13,19	100	6,22	7,13
23.7.09 10:00	66,25	27,79	28,24	98,4	3,18	11,25
24.7.09 10:00	90,25	20,85	26,5	78,7	0,87	13,40
24.7.09 17:00	97,25	19,4	25,6	75,8	0,18	14,10

Tabelle 8.6 Kultivierungsparameter des Versuchs Zählreihe (BA/F3 p210 eIF5A-2)

Datum	Dauer [h]	μ [1/h]	q _{Glc} [mol/10 ⁹ Z*h]	q _{Lak} [mol/10 ⁹ Z*h]	Y _{Lak/Glc}
20.7.09 15:45	0				
21.7.09 9:30	17,75	0,037	0,089	0,208	2,33
22.7.09 10:00	42,25	0,077	0,164	0,277	1,68
23.7.09 10:00	66,25	0,031	0,062	0,084	1,36
24.7.09 10:00	90,25	-0,012	0,039	0,037	0,92
24.7.09 17:00	97,25	-0,010	0,049	0,050	1,01

Maximale Zelldichte in einer T-Flasche

Tabelle 8.7 Kultivierungsparameter für den Versuch maximale Zelldichte in einer T-Flasche

Datum	Dauer [h]	LZD [10^5 Z/mL]	GZD [10^5 Z/mL]	Viab. [%]	C_{Glc} [mmol/l]	C_{Lak} [mmol/l]
20.7.09 14:35	0,0	2,48	2,48	100,0	9,52	1,42
21.7.09 9:45	19,2	3,48	3,50	99,3	8,42	4,13
22.7.09 10:00	43,4	21,1	21,13	99,9	3,34	11,30
22.7.09 11:15	44,7	14,7	14,7	100,0	9,24	1,69
22.7.09 16:20	49,7	21,9	22,0	99,5	7,20	5,55
23.7.09 10:00	67,4	41,5	41,7	99,5	1,92	12,35
23.7.09 11:00	68,4	26,5	27	98,1	9,70	1,94
23.7.09 15:00	72,4	31,8	32,1	99,1	6,70	6,70
24.7.09 11:00	92,4	43,1	43,6	98,9	0,03	14,50

Tabelle 8.8 Kultivierungsparameter für den Versuch maximale Zelldichte in einer T-Flasche

Datum	Dauer [h]	μ [1/h]	q_{Glc} [mmol/(10^9 Z*h)]	q_{Lak} [mol/(10^9 Z*h)]	$Y_{\text{Lak/Glc}}$
20.7.09 14:35	0,0				
21.7.09 9:45	19,2	0,018	0,193	0,475	2,46
22.7.09 10:00	43,4	0,074	0,170	0,241	1,41
22.7.09 11:15	44,7	nicht best.	nicht best.	nicht best.	nicht best.
22.7.09 16:20	49,7	0,078	0,219	0,415	1,89
23.7.09 10:00	67,4	0,036	0,094	0,121	1,29
23.7.09 11:00	68,4	nicht best.	nicht best.	nicht best.	nicht best.
23.7.09 15:00	72,4	0,046	0,257	0,408	1,59
24.7.09 11:00	92,4	0,015	0,089	0,104	1,17

Fed-Batch-Versuch

Tabelle 8.9 Glukose- und Laktatkonzentration im Zufütterungsmedium

$C_{\text{Glc,Zu}}$	91 mmol/L
$C_{\text{Lak,Zu}}$	1,1 mmol/L

Tabelle 8.10 Kultivierungsparameter vom Versuch Fed-Batch

Datum/Uhrzeit	Probennr.	Probenvol.. [ml]	V Kultur [ml]	Dauer [h]	C_{Glc} [mmol/L]	C_{Lak} [mmol/L]
8.6.09 18:45	1	5	345,0	0,75	9,1	1,26
9.6.09 9:20	2	6	339,0	15,33	8,38	4
9.6.09 15:50	3	6	333,0	21,83	7,31	6,8
10.6.09 9:30	4	5	328,0	39,50	1,29	18,6
10.6.09 12:00	5	6	352,0	42,00	7,81	18,45
10.6.09 15:50	6	6	346,0	45,83	7,21	19,75
11.6.09 10:00	7	5	351,3	64,00	2,51	32,8
11.6.09 12:00	8	5	375,7	66,00	8,05	32,4
11.6.09 17:20	9	5	386,7	71,33	7,13	34
12.6.09 9:35	10	5	397,7	87,58	5,54	40,5
12.6.09 15:20	11	5	392,7	93,33	3,95	43,1
13.6.09 11:30	12	5	387,7	113,50	5,53	46,4

Tabelle 8.11 Kultivierungsparameter vom Versuch Fed-Batch

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	q_{Glc} [mmol/(10^9 Z*h)]	q_{Lak} [mmol/(10^9 Z*h)]	$Y_{\text{Lak/Glc}}$	LZD [10^5 Z/ml]	GZD [10^5 Z/ml]	Viab. [%]
8.6.09 18:45	0,75				1,18	1,20	97,9
9.6.09 9:20	15,33	0,218	0,840	3,85	3,30	3,33	99,2
9.6.09 15:50	21,83	0,384	1,014	2,64	5,20	5,25	99,0
10.6.09 9:30	39,50	0,342	0,675	1,97	14,60	14,65	99,7
10.6.09 12:00	42,00	0,288	0,380	1,32	14,60	14,65	99,7
10.6.09 15:50	45,83	0,097	0,212	2,18	17,35	17,50	99,1
11.6.09 10:00	64,00	0,200	0,383	1,91	22,58	22,65	99,7
11.6.09 12:00	66,00	nicht best.	nicht best.	nicht best.	19,65	19,70	99,7
11.6.09 17:20	71,33	0,084	0,146	1,74	21,52	21,60	99,6
12.6.09 9:35	87,58	0,044	0,261	5,97	16,35	19,40	84,3
12.6.09 15:20	93,33	0,154	0,290	1,88	14,80	16,50	89,7
13.6.09 11:30	113,50	nicht best.	nicht best.	nicht best.	15,60	18,80	83,0

Tabelle 8.12 Kultivierungsparameter vom Versuch Fed-Batch

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	pO ₂ [%]	pH-Wert	μ [1/h]	Luft [ccm]	Stickstoff [ccm]	CO ₂ [ccm]
8.6.09 18:45	0,75	96,4	6,88		3,0	3,0	0,3
9.6.09 9:20	15,33	86,8	7,2	0,071	2,7	2,7	0,5
9.6.09 15:50	21,83	68,5	7,17	0,070	1,8	3,0	0,6
10.6.09 9:30	39,50	51,6	6,85	0,058	2,7	2,7	0,4
10.6.09 12:00	42,00	43,3	6,9	0,035	2,7	2,6	0,2
10.6.09 15:50	45,83	27,8	6,9	0,045	4,0	2,6	0,3
11.6.09 10:00	64,00	17,3	6,92	0,016	4,3	2,4	0,3
11.6.09 12:00	66,00	16,3	6,92	-0,029	8,0	2,4	0,4
11.6.09 17:20	71,33	27,6	6,92	0,017	8,0	2,4	0,4
12.6.09 9:35	87,58	42,1	6,92	-0,014	8,0	2,4	0,4
12.6.09 15:20	93,33	30,4	6,9	-0,017	8,0	2,4	0,5
13.6.09 11:30	113,50	35,3	6,92	0,003	8,0	2,4	0,5

Tabelle 8.13 Kultivierungsparameter vom Versuch Fed-Batch

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	xLuft [%]	xCO ₂ [%]	xN ₂ [%]	Luft [vvm]	CO ₂ [vvm]	N ₂ [vvm]	Gesamtbegasung [vvm]
8.6.09 18:45	0,75	47,6	4,8	47,6	0,0087	0,0009	0,0087	0,0183
9.6.09 9:20	15,33	45,8	8,5	45,8	0,0080	0,0015	0,0080	0,0174
9.6.09 15:50	21,83	33,3	11,1	55,6	0,0054	0,0018	0,0090	0,0162
10.6.09 9:30	39,50	46,6	6,9	46,6	0,0082	0,0012	0,0082	0,0177
10.6.09 12:00	42,00	49,1	3,6	47,3	0,0077	0,0006	0,0074	0,0156
10.6.09 15:50	45,83	58,0	4,3	37,7	0,0116	0,0009	0,0075	0,0199
11.6.09 10:00	64,00	61,4	4,3	34,3	0,0122	0,0009	0,0068	0,0199
11.6.09 12:00	66,00	74,1	3,7	22,2	0,0213	0,0011	0,0064	0,0287
11.6.09 17:20	71,33	74,1	3,7	22,2	0,0207	0,0010	0,0062	0,0279
12.6.09 9:35	87,58	74,1	3,7	22,2	0,0201	0,0010	0,0060	0,0272
12.6.09 15:20	93,33	73,4	4,6	22,0	0,0204	0,0013	0,0061	0,0278
13.6.09 11:30	113,50	73,4	4,6	22,0	0,0206	0,0013	0,0062	0,0281

Tabelle 8.14 Einstellungen der Zufütterungs-Schlauchpumpe für den Versuch Fed-Batch

Start Zulauf	Ende Zulauf	Dauer Zulauf [h]	Anzahl Zyklen insgesamt	Volumenzuwachs pro Zyklus [ml]	V Zugabe [ml]	Pause zwischen der Zufütterung in [s]	Pause zwischen der Zufütterung in [min]
10.6.09 11:30	10.6.09 11:55	0,42	100	0,30	30,0	10	0,167
10.6.09 17:00	11.6.09 10:00	17,00	68	0,15	10,3	900	15
11.6.09 10:50	11.6.09 11:07	0,28	98	0,30	29,4	5	0,083
11.6.09 18:00	12.6.09 10:00	16,00	64	0,25	16,0	900	15
12.6.09 16:15	13.6.09 11:15	19,00	75	0,40	14,3	900	15

Kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Tabelle 8.15 Konzentrationen an Glukose und Laktat im Zulauf

$C_{\text{Glik},0}$	9,3 mmol/L
$C_{\text{Lak},0}$	1,2 mmol/L

Tabelle 8.16 Kultivierungsparameter aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Datum/Uhrzeit	Probennr.	Probenvol. [ml]	V Kultur [ml]	Dauer [h]	C_{Glik} [mmol/L]	C_{Lak} [mmol/L]
1.7.09 17:15	1	5	115	1,25	9,63	1,54
2.7.09 09:20	2	5	110	17,33	7,01	7,62
2.7.09 16:50	3	5	105	24,83	4,03	12,1
2.7.09 18:00	4	5	100	26,00	3,48	12,5
3.7.09 09:30	5	2	100	41,50	1,92	14,1
3.7.09 15:25	6	2	100	47,42	1,8	17,2
4.7.09 12:00	7	2	100	68,00	2	16,8
4.7.09 14:30	8	2	100	70,50	2,18	17,3
5.7.09 14:00	9	2	100	94,00	2,51	15,4
6.7.09 14:30	10	2	100	118,50	2,48	14,7

Tabelle 8.17 Kultivierungsparameter aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	q_{Glc} [mmol/(10 ⁹ Z*h)]	q_{Lak} [mmol/(10 ⁹ Z *h)]	$Y_{\text{Lak/Glk}}$	LZD [10 ⁵ Z/ml]	GZD [10 ⁵ Z/ml]	Viab. [%]
1.7.09 17:15	1,25				2,55	2,625	97,1
2.7.09 09:20	17,33	0,393	0,928	2,36	5,6	5,675	98,7
2.7.09 16:50	24,83	0,547	0,830	1,52	8,8	8,85	99,4
2.7.09 18:00	26,00	0,517	0,378	0,73	9,35	9,4	99,5
3.7.09 09:30	41,50	0,324	0,613	1,89	11	11,3	97,3
3.7.09 15:25	47,42	0,372	0,665	1,79	11,2	11,3	99,1
4.7.09 12:00	68,00	0,361	0,806	2,24	8,75	8,8	99,4
4.7.09 14:30	70,50	0,346	0,854	2,47	10,15	10,2	99,5
5.7.09 14:00	94,00	0,348	0,714	2,05	11,5	11,7	98,3
6.7.09 14:30	118,50	0,361	0,541	1,50	14,7	14,8	99,3

Tabelle 8.18 Kultivierungsparameter aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	pO ₂ [%]	pH-Wert	μ [1/h]	D [1/h]	Luft [ccm]	Stickstoff [ccm]	CO ₂ [ccm]
1.7.09 17:15	1,25	92,2	7,17			1	1	0,12
2.7.09 09:20	17,33	72,1	7,25	0,049	0,048	0,8	0,8	0,12
2.7.09 16:50	24,83	64,3	7,1	0,060	0,048	0,8	0,8	0,12
2.7.09 18:00	26,00	63,2	7,1	0,052	0,048	0,8	0,8	0,08
3.7.09 09:30	41,50	37,1	7,11	0,059	0,048	0,8	0,8	0,06
3.7.09 15:25	47,42	37,3	7,11	0,052	0,048	0,8	0,8	0,08
4.7.09 12:00	68,00	41,3	7,11	0,037	0,048	0,7	0,8	0,08
4.7.09 14:30	70,50	41,3	7,11	0,108	0,048	0,7	0,8	0,08
5.7.09 14:00	94,00	39,1	7,11	0,054	0,048	0,7	0,8	0,07
6.7.09 14:30	118,50	38,1	7,11	0,059	0,048	0,7	0,8	0,08

Tabelle 8.19 Kultivierungsparameter aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 100 ml

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	xLuft [%]	xCO ₂ [%]	xN ₂ [%]	Luft [vvm]	CO ₂ [vvm]	N ₂ [vvm]	Gesamtbelegung [vvm]
1.7.09 17:15	1,25	47,2	5,7	47,2	0,0087	0,0010	0,0087	0,0184
2.7.09 09:20	17,33	46,5	7,0	46,5	0,0073	0,0011	0,0073	0,0156
2.7.09 16:50	24,83	46,5	7,0	46,5	0,0076	0,0011	0,0076	0,0164
2.7.09 18:00	26,00	47,6	4,8	47,6	0,0080	0,0008	0,0080	0,0168
3.7.09 09:30	41,50	48,2	3,6	48,2	0,0080	0,0006	0,0080	0,0166
3.7.09 15:25	47,42	47,6	4,8	47,6	0,0080	0,0008	0,0080	0,0168
4.7.09 12:00	68,00	44,3	5,1	50,6	0,0070	0,0008	0,0080	0,0158
4.7.09 14:30	70,50	44,3	5,1	50,6	0,0070	0,0008	0,0080	0,0158
5.7.09 14:00	94,00	44,6	4,5	50,9	0,0070	0,0007	0,0080	0,0157
6.7.09 14:30	118,50	44,3	5,1	50,6	0,0070	0,0008	0,0080	0,0158

Kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Tabelle 8.20 Konzentration an Glukose und Laktat im Zulauf

$C_{\text{Glc},0}$	9,6 mmol/L
$C_{\text{Lak},0}$	1,2 mmol/L

Tabelle 8.21 Kultivierungsparameter aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Datum/Uhrzeit	Probennr.	Probenvol. [ml]	V Kultur [ml]	Dauer [h]	C_{Glc} [mmol/L]	C_{Lak} [mmol/L]
12.8.09 13:00	1	5	420	1,00	9,6	1,25
13.8.09 07:40	2	5	415	19,67	6,92	7,25
13.8.09 15:45	3	5	410	27,75	4,22	10,5
13.8.09 23:43	4	5	405	35,72	2,16	14,6
14.8.09 08:15	5	1,5	400	44,25	1,15	18,96
14.8.09 19:36	6	1,5	400	55,60	0,73	18,9
15.8.09 12:00	7	1,5	400	72,00	1,21	18,8
16.8.09 12:30	8	1,5	400	96,50	1,49	16,7
17.8.09 09:40	9	1,5	400	117,67	1,79	15,2
18.8.09 10:00	10	1,5	400	142,00	2,25	14,7
19.8.09 09:30	11	1,5	400	165,50	2,5	15,1
20.8.09 11:00	12	1,5	400	191,00	2,53	13,15

Tabelle 8.22 Kultivierungsparameter aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	q_{Glc} [mmol/($10^9 \text{Z} \cdot \text{h}$)]	q_{Lak} [mmol/($10^9 \text{Z} \cdot \text{h}$)]	$Y_{\text{Lak/Glc}}$	LZD [10^5Z/ml]	GZD [10^5Z/ml]	Viab [%]
12.8.09 13:00	1,00				1,875	1,9	98,7
13.8.09 07:40	19,67	0,360	0,806	2,24	6,1	6,2	98,4
13.8.09 15:45	27,75	0,466	0,561	1,20	8,23	8,4	98,0
13.8.09 23:43	35,72	0,262	0,522	1,99	11,5	11,8	97,5
14.8.09 08:15	44,25	0,466	0,760	1,63	11,87	12	98,9
14.8.09 19:36	55,60	0,506	0,774	1,53	14,25	14,75	96,6
15.8.09 12:00	72,00	0,504	0,772	1,53	11,8	12,1	97,5
16.8.09 12:30	96,50	0,490	0,699	1,43	15,2	15,5	98,1
17.8.09 09:40	117,67	0,488	0,532	1,09	16,4	16,6	98,8
18.8.09 10:00	142,00	0,477	0,479	1,01	16,3	16,6	98,2
19.8.09 09:30	165,50	0,464	0,476	1,02	16,5	16,8	98,2
20.8.09 11:00	191,00	0,439	0,392	0,89	18,9	19,2	98,4

Tabelle 8.23 Kultivierungsparameter aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	pO ₂ [%]	pH-Wert	μ [1/h]	D [1/h]	Luft [ccm]	Stickstoff [ccm]	CO ₂ [ccm]
12.8.09 13:00	1,00	97,9	7,25			0	5	0
13.8.09 07:40	19,67	42	7,63	0,063		3,8	2,5	0,2
13.8.09 15:45	27,75	29,4	7,23	0,037		3,7	1,9	0,5
13.8.09 23:43	35,72	30,8	7,05	0,042	0,057	8,3	1,3	0,5
14.8.09 08:15	44,25	38,8	7,13	0,061	0,057	6,3	1,3	0,4
14.8.09 19:36	55,60	42,9	7,06	0,073	0,057	10,3	1,2	0,4
15.8.09 12:00	72,00	45,1	7,09	0,045	0,057	10,3	1,2	0,5
16.8.09 12:30	96,50	30,7	7,08	0,067	0,057	10,3	1,2	0,5
17.8.09 09:40	117,67	32,8	7,09	0,061	0,057	10,2	1,2	0,5
18.8.09 10:00	142,00	37,2	7,1	0,056	0,055	10,2	1,2	0,5
19.8.09 09:30	165,50	41,9	7,14	0,055	0,054	10,2	1,3	0,5
20.8.09 11:00	191,00	47,9	7,19	0,059	0,054	10,2	1,2	0,5

Tabelle 8.24 Kultivierungsparameter aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	xLuft [%]	xCO ₂ [%]	xN ₂ [%]	Luft [vvm]	CO ₂ [vvm]	N ₂ [vvm]	Gesamtbegasung [vvm]
12.8.09 13:00	1,00	0,0	0,0	100,0	0,0000	0,0000	0,0119	0,0119
13.8.09 07:40	19,67	58,5	3,1	38,5	0,0092	0,0074	0,0060	0,0226
13.8.09 15:45	27,75	60,7	8,2	31,1	0,0090	0,0200	0,0046	0,0337
13.8.09 23:43	35,72	82,2	5,0	12,9	0,0205	0,0122	0,0032	0,0359
14.8.09 08:15	44,25	78,8	5,0	16,3	0,0158	0,0125	0,0033	0,0315
14.8.09 19:36	55,60	86,6	3,4	10,1	0,0258	0,0084	0,0030	0,0372
15.8.09 12:00	72,00	85,8	4,2	10,0	0,0258	0,0104	0,0030	0,0392
16.8.09 12:30	96,50	85,8	4,2	10,0	0,0258	0,0104	0,0030	0,0392
17.8.09 09:40	117,67	85,7	4,2	10,1	0,0255	0,0105	0,0030	0,0390
18.8.09 10:00	142,00	85,7	4,2	10,1	0,0255	0,0105	0,0030	0,0390
19.8.09 09:30	165,50	85,0	4,2	10,8	0,0255	0,0104	0,0033	0,0392
20.8.09 11:00	191,00	85,7	4,2	10,1	0,0255	0,0105	0,0030	0,0390

Tabelle 8.25 Zufütterungseinstellungen aus dem Versuch kontinuierliche Betriebsweise mit 400 ml

Datum/Uhrzeit	Volumenstrom [ml/min]	Datum/Uhrzeit	Dauer der Zugabe [h]	Zugegebenes Volumen [ml]
13.08.2009 23:00	0,38	17.08.2009 16:45	89,75	2046,3
17.08.2009 16:45	0,375	18.08.2009 11:00	18,25	410,6
18.08.2009 11:00	0,365	19.08.2009 10:00	23,00	503,7
19.08.2009 10:00	0,355	nicht best.	nicht best.	nicht best.

Batch Versuch im Biostat B Nr.1

Tabelle 8.26 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.1

Datum/Uhrzeit	Probennr.	Probenvol. [ml]	V Kultur [ml]	Dauer [h]	C _{Glk} [mmol/L]	C _{Lak} [mmol/L]
6.9.09 10:30	1	10	5090	0,50	9,76	1,59
6.9.09 15:00	2	10	5080	5,00	9,68	1,72
7.9.09 09:30	3	10	5070	23,50	8,51	3,96
7.9.09 15:21	4	10	5060	31,43	7,42	6,2
8.9.09 09:30	5	10	5050	47,50	2,23	14,4

Tabelle 8.27 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.1

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	q _{Glk} [mmol/(10 ⁹ Z*h)]	q _{Lak} [mmol/(10 ⁹ Z*h)]	Y _{Lak/Glk}	LZD [10 ⁵ Z/ml]	GZD [10 ⁵ Z/ml]	Viab. [%]
6.9.09 10:30	0,50				0,95	1	95,0
6.9.09 15:00	5,00	0,1714	0,285	1,67	1	1,08	100,0
7.9.09 09:30	23,50	0,2677	0,524	1,96	3,55	3,65	97,3
7.9.09 15:21	31,43	0,2699	0,572	2,12	6,33	6,53	96,9
8.9.09 09:30	47,50	0,2612	0,418	1,60	18,1	18,2	99,5

Tabelle 8.28 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.1

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	pO ₂ [%]	pH-Wert	μ [1/h]	Luft [ccm]	Stickstoff [ccm]	CO ₂ [ccm]
6.9.09 10:30	0,50	104,8	6,89		0	0	0
6.9.09 15:00	5,00	57,2	7,11	0,027	15	7,5	1,25
7.9.09 9:30	23,50	43	7,4	0,065	20	7,5	1,2
7.9.09 15:21	31,43	36,4	7,11	0,073	40	7,5	2
8.9.09 9:30	47,50	13	7,05	0,065	40	7,5	2

Tabelle 8.29 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.1

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	xLuft [%]	xCO ₂ [%]	xN ₂ [%]	Luft [vvm]	CO ₂ [vvm]	N ₂ [vvm]	Gesamtbelegung [vvm]
6.9.09 10:30	0,50	0,0	0,0	0,0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
6.9.09 15:00	5,00	63,2	5,3	31,6	0,0030	0,0002	0,0015	0,0047
7.9.09 9:30	23,50	69,7	4,2	26,1	0,0039	0,0002	0,0015	0,0057
7.9.09 15:21	31,43	80,8	4,0	15,2	0,0079	0,0004	0,0015	0,0098
8.9.09 9:30	47,50	80,8	4,0	15,2	0,0079	0,0004	0,0015	0,0098

Batch Versuch im Biostat B Nr.2

Tabelle 8.30 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.2

Datum/Uhrzeit	Probennr.	Probenvol. [ml]	V Fer [ml]	Dauer [h]	C _{Glc} [mmol/L]	C _{Lak} [mmol/L]
14.9.09 12:30	1	10	5090	0,50	9,39	1,95
15.9.09 08:30	2	10	5080	20,50	7,99	5,23
15.9.09 15:45	3	10	5070	27,75	6,8	7,58
16.9.09 09:00	4	10	5060	45,00	1,28	17,25

Tabelle 8.31 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.2

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	q _{Glc} [mmol/(10 ⁹ Z*h)]	q _{Lak} [mmol/(10 ⁹ Z*h)]	Y _{Lak/Glc}	LZD [10 ⁵ Z/ml]	GZD [10 ⁵ Z/ml]	Viab. [%]
14.9.09 12:30	0,50				1,00	1,00	100,0
15.9.09 08:30	20,50	0,406	0,956	2,36	2,43	2,45	99,2
15.9.09 15:45	27,75	0,467	0,931	1,99	4,53	4,58	98,9
16.9.09 09:00	45,00	0,377	0,666	1,77	12,3	12,4	99,2

Tabelle 8.32 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.2

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	pO ₂ [%]	pH-Wert	μ [1/h]	Luft [ccm]	Stickstoff [ccm]	CO ₂ [ccm]
14.9.09 12:30	0,50	98,9	7,1		0	0	0
15.9.09 08:30	20,50	53,5	7,45	0,044	20	7,5	1
15.9.09 15:45	27,75	43,5	7,07	0,086	20	6	1,4
16.9.09 09:00	45,00	30,1	6,92	0,058	30	9	1,5

Tabelle 8.33 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.2

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	x _{Luft} [%]	x _{CO₂} [%]	x _{N₂} [%]	Luft [vvm]	CO ₂ [vvm]	N ₂ [vvm]	Gesamtbegasung [vvm]
14.9.09 12:30	0,50	0,00	0,00	0,00	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
15.9.09 08:30	20,50	70,18	3,51	26,32	0,0039	0,0002	0,0015	0,0056
15.9.09 15:45	27,75	72,99	5,11	21,90	0,0039	0,0003	0,0012	0,0054
16.9.09 09:00	45,00	74,07	3,70	22,22	0,0059	0,0003	0,0018	0,0080

Batch Versuch im Biostat B Nr.3

Tabelle 8.34 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.3

Datum/Uhrzeit	Probennr.	Probenvol. [ml]	V Fer [ml]	Dauer [h]	Glc [mmol/L]	Lak [mmol/L]
21.9.09 13:00	1	10	5090	1,50	9,6	1,54
21.9.09 16:50	2	10	5080	5,33	9,43	1,93
22.9.09 10:45	3	10	5070	23,25	7,69	5,22
22.9.09 17:40	4	10	5060	30,17	6,52	7,94
23.9.09 09:30	5	10	5050	46,00	3,01	15,9
23.9.09 11:10	6	10	5040	47,67	2,5	16,3

Tabelle 8.35 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.3

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	q_{Glc} [mmol/($10^9 Z \cdot h$)]	q_{Lak} [mmol/($10^9 Z \cdot h$)]	$Y_{Lak/Glc}$	LZD [$10^5 Z/ml$]	GZD [$10^5 Z/ml$]	Viab. [%]
21.9.09 13:00	1,50				1,1	1,1	100
21.9.09 16:50	5,33	0,386	0,885	2,29	1,2	1,2	100
22.9.09 10:45	23,25	0,418	0,790	1,89	3,45	3,45	100
22.9.09 17:40	30,17	0,351	0,815	2,32	6,2	6,2	100
23.9.09 09:30	46,00	0,209	0,474	2,27	15	15	100
23.9.09 11:10	47,67	0,191	0,150	0,78	17	17	100

Tabelle 8.36 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.3

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	pO ₂ [%]	pH-Wert	μ [1/h]	Luft [ccm]	Stickstoff [ccm]	CO ₂ [ccm]
21.9.09 13:00	1,50	110	6,99		0	0	0
21.9.09 16:50	5,33	60	7	0,022	20	7,5	2
22.9.09 10:45	23,25	61,5	7,32	0,059	30	7,5	2
22.9.09 17:40	30,17	53,8	7,22	0,085	35	7,5	1,8
23.9.09 09:30	46,00	18,4	6,97	0,056	40	2	0,8
23.9.09 11:10	47,67	24,9	7,01	0,075	50	2	0,8

Tabelle 8.37 Kultivierungsparameter aus dem Versuch Biostat B Nr.3

Datum/Uhrzeit	Dauer [h]	xLuft [%]	xCO ₂ [%]	xN ₂ [%]	Luft [vvm]	CO ₂ [vvm]	N ₂ [vvm]	Gesamtbegasung [vvm]
21.9.09 13:00	1,50	0,0	0,0	0,0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
21.9.09 16:50	5,33	67,8	6,8	25,4	0,0039	0,0004	0,0015	0,0058
22.9.09 10:45	23,25	75,9	5,1	19,0	0,0059	0,0004	0,0015	0,0078
22.9.09 17:40	30,17	79,0	4,1	16,9	0,0069	0,0004	0,0015	0,0088
23.9.09 9:30	46,00	93,5	1,9	4,7	0,0079	0,0002	0,0004	0,0085
23.9.09 11:10	47,67	94,7	1,5	3,8	0,0099	0,0002	0,0004	0,0105