

Bachelor-Thesis

Pflanzlicher Serumersatz aus dem Hokkaido-Kürbis

für die Kultivierung von CHO-Zellen

Fakultät Life Sciences
Studiengang Biotechnologie

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Oliver Ullrich
Prof. Dr. rer. nat. F. Birger Anspach

vorgelegt von: Igor Klepko
Abgabetermin: 19. Januar 2012

Die Bachelor-Thesis wurde betreut und erstellt im Labor für Molekularbiologie und Zellkulturtechnik der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelor-Thesis ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht

Hamburg, 19. Januar 2012

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Bachelor-Thesis unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Prof. Dr. Oliver Ullrich, der mir die Möglichkeit gab, meine Arbeit zu diesem interessanten Thema im Labor für Molekularbiologie und Zellkulturtechnik an der HAW Hamburg anfertigen zu dürfen. Während der gesamten Arbeit wurde ich durch seine hilfreichen und umfangreichen Anregungen und seine Geduld immer wieder unterstützt. Mein Dank gilt ebenfalls meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Birger Anspach, der mir mit seinem technischen Know-How in der Phase der Implementierung wertvolle Hinweise gegeben hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Technischen Assistentin Frau Elisabeth Schäfer, Frau Nora Hagemann und Herrn Klaus Kaschubowski für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Ratschläge bei der alltäglichen Laborarbeit bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht hat und mich die komplette Zeit moralisch unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Beispiele für die Verwendung von Zellkulturen	4
1.1.1	Zellkultur als Tierversuchersersatz	4
1.1.2	Zellkulturen zur Produktion rekombinanter Proteine.....	5
1.1.3	Tissue Engineering	5
1.2	Kulturmedien	6
1.2.1	Basalmedien und Minimalmedien.....	6
1.3	Serumfreie Medien	7
1.3.1	Medienzusätze	8
1.3.2	Serum	11
1.4	Nachteile von Seren und serumfreien Medien	13
1.4.1	Konsequenzen unzureichender Medienqualität	14
1.5	Zielsetzung.....	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Zellkulturtechniken.....	17
2.1.1	Sterile Arbeitstechnik	17
2.1.2	Desinfektion	17
2.1.3	Arbeitsfläche	17
2.1.4	Pipettieren.....	17
2.1.5	UV-Sterilisation	17
2.2	Kultivierung tierischer Zellen.....	18
2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	18
2.2.2	Passagieren	18
2.3	Zellzählung	19
2.3.1	Neubauer-Zählkammer.....	20
2.3.2	Countess® Cell Counter.....	20

2.4	Auftauen von Zellen	22
2.5	Herstellung des Hokkaido-Kürbisextraktes	22
2.6	Proteinchemische Methoden.....	23
2.6.1	Größenausschlusschromatographie (SEC).....	23
2.6.2	Aufkonzentrierung mit dem Rotationsverdampfer.....	26
2.6.3	Größenbestimmung der HK-Extrakt-Bestandteile durch SDS-PAGE.....	27
2.6.4	Färbung von SDS-Gelen	29
3	Prinzipieller Versuchsablauf	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Reproduktion der Ergebnisse aus dem Studienprojekt.....	34
4.2	Kalibrierung der SEC-Säule	37
4.3	SEC des Kürbisextrakts	39
4.3.1	Einfluss der Kürbisextrakt-Fractionen auf das Zellwachstum von CHO-Zellen.....	40
4.4	SEC des aufkonzentrierten Hokkaido-Kürbisextrakts.....	42
4.4.1	Einfluss der aufkonzentrierten Fractionen auf das Zellwachstum von CHO-Zellen.....	44
4.4.2	Titration der wachstumsfördernden Fractionen	46
4.4.3	Kombination der stimulierenden Fractionen.....	49
4.4.4	Einfluss thermisch behandelter Fractionen auf das Zellwachstum	51
4.5	Charakterisierung des Extraktes und der Fractionen.....	53
4.5.1	SDS-PAGE des Extraktes und der Fractionen.....	53
5	Diskussion	56
6	Zusammenfassung	62
7	Literaturverzeichnis.....	63
	Abbildungsverzeichnis	65
	Tabellenverzeichnis.....	66
	Anhang	67

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	67
II.	Verwendete Zellen.....	68
III.	Laborgeräte	69
IV.	Software.....	70
V.	Verwendete Materialien	71

1 Einleitung

Die Verwendung von Zellkulturen ermöglicht die Aufklärung der molekularen Mechanismen zellulärer Funktionen und die Entstehung von Krankheiten. Erst die Entdeckung von Antibiotika und die Entwicklung spezieller Kulturmedien ermöglichte eine stabile Kultivierung und eine Vermeidung von Kontaminationen. Die heutige Zellkultur dient als Werkzeug in vielen Bereichen wie der Biologie, Biotechnologie, Medizin und Materialforschung [Boxberger, 2007 S. 3 - 4].

1.1 Beispiele für die Verwendung von Zellkulturen

1.1.1 Zellkultur als Tierversuchersatz

Durch die Zellkultur können Tierversuche zwar nicht gänzlich ersetzt werden, jedoch trägt sie dazu bei, die Anzahl dieser erheblich zu reduzieren. Deutschland ist innerhalb der Europäischen Union führend im Bereich der Erforschung tierversuchsfreier Prüfmethode und Verfahren. Dennoch steigt die Anzahl von Tierversuchen kontinuierlich an. Im Zeitraum von 2000 bis 2010 ist nach Angaben des Deutschen Tierschutzbundes die Zahl der Versuchstiere in Deutschland von ca. 1,8 Mio. auf 2,8 Mio. Tiere pro Jahr [Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2010] gestiegen, was einem Anstieg von mehr als 50% innerhalb von 10 Jahren entspricht.

Diese Zunahme von Tierversuchen hat zwei hauptsächliche Gründe. Erstens waren ein Viertel aller Versuchstiere gentechnisch verändert. Solche transgenen Tiere, insbesondere Mäuse, Ratten und Fische, ermöglichen es der Forschung, Erkenntnisse zu bestimmten Krankheiten und Wirkmechanismen zu gewinnen. Zweitens erfordern die immer strenger werdenden Anforderungen und Regulationen in der klinischen Forschung ein stetig höheres Maß an Tierversuchen. Ein weiterer Grund für den starken Anstieg verwendeter Tiere sind der Ausbau und die Förderung des Forschungsstandortes Deutschland. Zusätzlich werden viele Tiere zur Herstellung von Seren und Zusätzen getötet, welche in der Zellkultur benötigt werden. Dies wiederum wird nicht in der Statistik für die Tierversuche erfasst, da die Tötung wie auch die Organentnahmen nicht als Tierversuche definiert sind [Schmitz, 2009 S. 84]. Diese Fakten unterstreichen die Notwendigkeit zur Suche nach Serumersatz in der Zellkultur aus der Sicht des Tierschutzes und Ethik.

1.1.2 Zellkulturen zur Produktion rekombinanter Proteine

CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) gehören zu den gebräuchlichsten tierischen Säugetierzellen in der Zellkultur, die zur Transfektion, Expression und Produktion rekombinanter Proteine in großem Maßstab eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die ursprünglich im Jahr 1957 durch Gewebeentnahme aus den Ovarien eines Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) isoliert wurde [Jelkmann & Krämer, 2008]. Die heutzutage wichtigste und am häufigsten verwendete Wirtszelllinie für die Produktion rekombinanter Proteine ist die CHO-DHFR-Zelllinie, welche durch Genmanipulation aus CHO-K1-Zellen etabliert wurde [Urlaub & Chasin, 1980]. Bei CHO-DHFR-Zellen sind beide Allele des Gens für das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) inaktiviert. Diese DHFR-negative Zelllinie ist für ihr Wachstum auf Glycin, Hypoxanthin und Thymidin angewiesen, was zur Selektion transgener Zellen ausgenutzt werden kann. Für viele rekombinante Proteine aus CHO-Zellen wurde gezeigt, dass deren Glykosylierungsmuster derjenigen des humanen Produkts sehr ähnlich sind [Chmiel, 2006]. Folglich lassen sich mittels CHO-Zellen Glykoproteine mit für den Menschen typischen Glykosylierungsmustern produzieren. Im Hinblick auf die pharmazeutische Nutzung solcher Proteine wird die Gefahr von Immunreaktionen, wie sie bei nicht humanspezifischen Glykosylierungen auftreten können, minimiert [Varki, 1993].

Die Produktion rekombinanter Proteine mittels tierischer Zellkulturen spielt eine zunehmend wichtige Rolle in der Biotechnologie, insbesondere bei der Entwicklung biopharmazeutischer Arzneimittel. Derzeit sind über 130 rekombinante Proteine für die medizinische Anwendung zugelassen [Jelkmann & Krämer, 2008]. Die größte Gruppe pharmazeutischer Proteine biotechnologischen Ursprungs bilden hierbei die Gerinnungsfaktoren, Enzyme und Antikörper [Chodorowska *et al.*, 2004].

1.1.3 Tissue Engineering

Unter Tissue Engineering versteht man die Nachzüchtung natürlicher Gewebe unter Laborbedingungen. Mit diesem gezüchteten Gewebe eröffnen sich vielfältige Therapiemöglichkeiten. Zerstörtes Gewebe kann ersetzt werden, Heilungsprozesse können unterstützt und nicht mehr funktionsfähige Gewebe regeneriert werden. Das isolierte Gewebe wird *in vitro* in Kulturflächen gezüchtet und benötigt somit geeignetes Medium.

1.2 Kulturmedien

Als Kulturmedium bezeichnet man flüssige und feste Medien, die zur Kultivierung von Mikroorganismen, tierischen/pflanzlichen Zellen und Zellgeweben dienen. Es enthält in der Regel alle Nährstoffe, die für das Zellwachstum erforderlich sind, wobei es den wichtigsten Einzelfaktor bei der Kultivierung darstellt. Da es kein universelles Kulturmedium gibt, sind viele Medien auf dem Markt erhältlich, wobei die Medien in zwei Hauptgruppen, die Basalmedien und die komplexen Medien, unterteilt werden.

1.2.1 Basalmedien und Minimalmedien

Basalmedien sind auf der Grundlage einer isotonen Salzlösung (*balanced salt solution*, BBS) aufgebaut. Die Elektrolytzusammensetzung ist so gewählt, dass sie der Elektrolytzusammensetzung des Extrazellulärraums des zu kultivierenden Zellmaterials entspricht. Jedes Ionenpaar hat eine bestimmte Funktion in den Basalmedien. Na^+ und Cl^- sind für den osmotischen Druck des Kulturmediums verantwortlich. Ca^{2+} und Mg^{2+} sind für die Zelladhäsion notwendig, wobei Ca^{2+} und Mg^{2+} zusätzlich bei vielen enzymatischen Zellreaktionen als Kofaktoren fungieren. Na^+ und K^+ tragen zur Aufrechterhaltung des Zellmembranpotenziales bei, während H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} und HCO_3^- für die Pufferung des Systems zuständig sind [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 88]. Der Unterschied zwischen den Minimalmedien und den Basalmedien liegt darin, dass die Aminosäurenkonzentration bei den Basalmedien um die Hälfte reduziert ist. Daher ist bei der Verwendung von Basalmedien zu beachten, dass häufiger Medienwechsel durchgeführt werden müssen [Schmitz, 2009 S. 104].

1.2.1.1 HAM's F-12

Das Basalmedium HAM's F-12, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, ist auch unter dem Begriff Nährstoffmischung (*ham's nutrient mixtures*) bekannt. Dieses Medium benötigt für eine optimale Pufferung einen CO_2 -Gehalt von 5% im Brutschrank. HAM's F-12 wurde für die Kultivierung von CHO-Zellen, HeLa-Zellen und Maus-L-Zellen entwickelt und hat im Vergleich zu seinem Vorgänger HAM's F-10 einen erhöhten Gehalt an Aminosäuren und Zinksulfat. Zusätzlich wurde es durch Putrescin, ein biogenes Amin, und Linolsäure, eine zweifach ungesättigte Omega-6-Fettsäure, ergänzt. Aufgrund seiner in der Tabelle 1-1 dargestellten Zusammensetzung eignet sich HAM's F-12 besonders für eine serumfreie Kultivierung von CHO-Zellen. Je nach Bedarf und Fragestellung kann eine zusätzliche Anreicherung mit Faktoren wie Serum oder Gewebeextrakten, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen erfolgen [Schmitz, 2009 S. 104 - 105]. In dieser Arbeit wurde HAM's F-12 mit 10% (v/v) FKS ergänzt.

Tab. 1-1 Chemische Zusammensetzung von HAM's F-12 Medium [Biochrom AG]

Substanz	Konzentration (mg/l)	Substanz	Konzentration (mg/l)
NaCl	7599	L-Methionin	4,47
KCl	223,6	L-Phenylalanin	5
Na ₂ HPO ₄	142	L-Prolin	34,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	44	L-Serin	10,5
MgCl ₂ ·6H ₂ O	122	L-Threonin	12
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,834	L-Tryptophan	2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00249	L-Tyrosin	5,4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,863	L-Valin	11,7
D-Glukose	1802	Biotin	0,0073
Na-Pyruvat	110	D-Ca-Pantothenat	0,48
Phenolrot	1,2*	Cholinchlorid	14
NaHCO ₃	1176	Folsäure	1,3
L-Alanin	9	Myo-Inositol	18
L-Arginin-HCl	211	Nicotinsäureamid	0,037
L-Asparagin	13,2	Pyridoxin-HCl	0,062
L-Asparaginsäure	13,3	Riboflavin	0,038
L-Cystein-HCl	31,5	Thiamin-HCl	0,34
L-Glutamin	146	Vitamin B ₁₂	1,36
L-Glutaminsäure	14,7	Hypoxanthin	4,1
Glycin	7,5	Thymidin	0,73
L-Histidin-HCl·H ₂ O	21	Liponsäure	0,21
L-Isoleucin	4	Linolsäure	0,084
L-Leucin	13	Putrescin·2HCl	0,161
L-Lysin-HCl	36,5		

1.3 Serumfreie Medien

Serumfreie Medien sind fertig konzipiert und werden häufig als Fertig- oder Komplettmedien bezeichnet. Meistens sind Serumfreie Medien für bestimmte Zelllinien konzipiert, da jeder Zelltyp ausgeprägte spezifische Nährstoffansprüche hat. Nach dem Kauf sind diese Medien somit sofort einsetzbar, jedoch geben die Hersteller meist nicht die genaue Zusammensetzung ihrer Medien bekannt. So entsteht eine gewisse Abhängigkeit zwischen dem Hersteller und dem Verbraucher der Medien. Definierte Komponenten in Medien haben wichtige Vorteile, wie die Vermeidung qualitativer und quantitativer Schwankungen der Medienzusammensetzung wie bei der Verwendung von FKS. Serum ist ein Produkt aus Blut, welches in seiner Zusammensetzung stark schwanken kann und von verschiedenen Faktoren wie dem Ernährungs- und Gesundheitszustand des Tieres abhängig ist. Durch die Kenntnis der Ansprüche spezifischer Zelltypen können die Zellen *in vitro* unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen wachsen. Ein weiterer Vorteil ist die Vermeidung mikrobieller Kontaminationen, da enthaltene Zellprodukte durch *Down-Stream Processing* isoliert und abgetrennt wurden [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 107]. Aus diesen Gründen werden bei der Produktion pharmazeutischer Proteine nur Fertigmedien eingesetzt, um eine definierte und somit validierbare Produktion zu garantieren. Ein weiterer Einsatzbereich ist die Forschung mit Zelltypen, die spezifische Nährstoffe oder wachstumsfördernde Faktoren, wie Phytohamagglutinin (PHA) oder Concanavalin A (Con A), benötigen. PHA und Con A

gehören zu den pflanzlichen Lektinen und haben mitogene Eigenschaften, sie stimulieren die Zellen in die Mitose überzugehen.

Am häufigsten werden Komplettn Medien in der Genetik und Pränataldiagnostik eingesetzt [Schmitz, 2009 S. 106]. Derzeit sind mehrere Datenbanken für auf dem Markt erhältliche serumfreie Medien im Internet zu finden. Dazu gehören die Internetseiten Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen [Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen] und *focus on alternatives* [focus on alternatives].

1.3.1 Medienzusätze

Bei der Verwendung von Basalmedien ist es notwendig die Medien mit Zusätzen zu ergänzen, je nach den Bedürfnissen der zu kultivierenden Zellen und der Fragestellung. Medienzusätze werden grob in sechs Hauptgruppen unterteilt: Kohlenhydrate, Aminosäuren, Antibiotika, Antimykotika, Vitamine, Spurenelemente und Serum.

1.3.1.1 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate dienen als Energiesubstrate der Zelle und sind *in vivo* als auch *in vitro* lebensnotwendig. Glucose ist das meist verwendete Kohlenhydrat in der Kultivierung, da Glucose am schnellsten verstoffwechselt wird. Die physiologische Konzentration von Glucose in der Zelle liegt bei 1 g/L was einer molaren Konzentration von 5,5 mM entspricht. Bei schnell wachsenden Tumorzellen wird eine Glucosekonzentration von 4,5 g/L bzw. 25 mM eingesetzt. Bei manchen Zelltypen werden andere Kohlenhydratquellen, wie die Einfachzucker Fructose und Galactose eingesetzt, da es bei hohen Glucosekonzentrationen zu massiven Lactatakkumulationen in der Zelle kommen kann. Bei der Zugabe von Di- und Polysacchariden ist zu beachten, dass manche Zelllinien die Di- und Polysaccharide nicht enzymatisch spalten können, da ihnen die zur Prozessierung benötigten Enzyme fehlen [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 89].

1.3.1.2 Aminosäuren

Aminosäuren sind die Hauptbestandteile von Proteinen und werden in L- und D- Form unterteilt. Die aus den lateinischen Wörtern abgeleiteten Bezeichnungen für L (*laevus*), links, und (*dexter*) D, rechts, stehen für die optischen Formunterschiede der Aminosäuren. Im Organismus werden, mit der Ausnahme der Epithelzellen, nur die L-Aminosäuren für die Proteinsynthese verwendet. Epithelzellen besitzen ein Enzym, welches in der Lage ist, die D-Aminosäuren in die L-Form zu überführen [Minuth *et al.*, 2003]. Von der Vielzahl von Aminosäuren sind die 20 proteinogenen in Tabelle 1-2 dargestellt, unterteilt in essentielle

Aminosäuren und nicht-essentielle AS. Essenzielle Aminosäuren können vom Organismus nicht synthetisiert werden und müssen daher mit der Nahrungsquelle zugeführt werden.

Tab. 1-2 Nicht (rechts) - und essenzielle (links) L-Aminosäuren. * werden häufig als semi-essenziell bezeichnet.

Aminosäuren	Aminosäuren
Arginin*	Alanin
Cystein*	Asparagin
Histidin*	Asparaginsäure
Isoleucin	Glutamin
Leucin	Glutaminsäure
Lysin	Glycin
Methionin	Prolin
Phenylalanin	Serin
Threonin	
Tryptophan	
Tyrosin*	
Valin	

In der Zellkultur werden 12 Aminosäuren als essentiell und Glutamin als sehr wichtig erachtet und müssen in entsprechenden Mengen im Kulturmedium enthalten sein. Eine Besonderheit stellt die nicht-essentielle Aminosäure Glutamin dar, welche in Lösung bei 37 °C und in basischer Umgebung nicht dauerhaft stabil ist. Aus diesem Grund werden dem HAM's F-12 Medium 2 mM L-Glutamin frisch zugegeben. Als Alternative sind thermisch stabile, glutaminhaltige Dipeptide (Alanin-Glutamin, Glycin-Glutamin) auf dem Markt, die unter dem Namen GLUTAMAXtm I und II erhältlich sind. Diese Dipeptide werden intrazellulär durch Peptidasen in einzelne Aminosäuren hydrolysiert. Dies geschieht jedoch nicht gleich gut in allen Zelllinien, wodurch es zu Wachstumsstörungen und -Verzögerungen kommen kann [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 90].

1.3.1.3 Antibiotika

Antibiotika werden zur Verhinderung bakterieller Infektionen eingesetzt. Voraussetzung für eine effektive Verhinderung von Infektionen ist die selektive Wirkung gegen den betreffenden Krankheitserreger. Die Wirkung von Antibiotika ist von der Konzentration im Medium abhängig, wobei die Minimaldosis, die einen Effekt erzielt, durch die minimale Hemmkonzentration (*minimum inhibition concentration*, MIC) definiert ist. Man unterscheidet zwei Arten von Wirkmechanismen, bakteriostatisch und bakterizid:

Bakteriostatisch beschreibt die MIC, bei der die Bakterien an der Vermehrung gehindert werden, während man unter bakterizid eine für Prokaryonten abtötende Wirkung versteht. Antibiotika sind nicht unbegrenzt haltbar, sondern zerfallen in Lösung innerhalb von drei bis fünf Tagen bei einer Temperatur von 37°C. Um die Sterilität aufrechtzuerhalten, müssen daher regelmäßig Medienwechsel vorgenommen werden [Schmitz, 2009 S. 122]. In dieser Arbeit wurde ein Gemisch von Penicillin und Streptomycin eingesetzt, welches dem Medium frisch zugegeben wurde. Das Antibiotikum Streptomycin hemmt die bakterielle Proteinbiosynthese grampositiver und -negativer Bakterien, indem es die 30S-Untereinheit der prokaryontischen 70S-Ribosomen blockiert. Penicillin hemmt die Zellwandsynthese grampositiver Bakterien. Beide eingesetzten Antibiotika wirken als Bakterizide.

1.3.1.4 Vitamine

Vitamine sind essentielle, organische Verbindungen, die lebenswichtige Funktionen im Organismus erfüllen. Meist sind es Vorläufer von Coenzymen oder prosthetischer Gruppen verschiedener Enzyme. Mit der Ausnahme von Pflanzen, die alle Vitamine selbst synthetisieren können, müssen eukaryontische Organismen die meisten Vitamine von außen aufnehmen. Dies betrifft vor allem die in Tabelle 1-3 aufgelisteten wasserlöslichen Vitamine, die in der B-Gruppe zusammen gefasst sind. Als Medienzusätze kommen auch Ascorbinsäure (Vitamin C), ein Antioxidans, oder Vitamin A-Derivate zum Einsatz.

Tab. 1-3 Wasserlösliche Vitamine der Gruppe B und ihre Wirkung im Organismus.

Name	Abkürzung	Wirkungen
Thiamin	B1	In seiner biologisch aktiven Form ist es Coenzym der Pyruvatdehydrogenase E1, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und der Transketolase
Riboflavin	B2	Dient als Vorstufe für Flavin-Coenzyme (Flavin-Adenin-Dinukleotid FAD, Flavinmononucleotid FMN)
Nicotinsäure	B3, PP	Wichtiger Baustein verschiedener Coenzyme (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid NAD, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat NADP)
Pantothensäure	B5	Notwendig für den Aufbau von Coenzym A
Pyridoxin	B6	Phosphorylierte Vitamin-B6-Derivate wirken als Coenzyme in etwa 100 enzymatischen Reaktionen
Biotin	B7	Biotin ist die prosthetische Gruppe mehrerer Carboxylase-Enzyme, die wichtige Aufgaben im Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel erfüllen
Folsäure	B11 (B9)	Folsäure ist die Vorstufe des Coenzym Tetrahydrofolsäure (THF)
Cobalamin	B12	Beteiligt an zwei enzymatischen Reaktionen N5-Methyl-Tetrahydrofolat-Homocystein-S-Methyltransferase (Methionin-Synthase) und Methylmalonyl-CoA-Mutase

1.3.1.5 Spurenelemente

Spurenelemente sind für spezifische Funktionen im Organismus verantwortlich. Die häufigsten Spurenelemente, die in der Zellkultur verwendet werden, sind Kupfer, Eisen, Zink, Kobalt, Molybdän, Valadium und Selen. Der Konzentrationsbereich der Spurenelemente im Medium liegt bei ng pro mL.

1.3.2 Serum

Heutzutage sind Seren weit verbreitet als Zusatz in Kulturmedien, jedoch geht der Trend zunehmend zu serumfreien Medien über. Es werden Seren von Tieren unterschiedlichen Entwicklungsstadiums und Alters (fetale, neugeborene und adulte), als auch verschiedener Tierarten verwendet. Von Nutztieren wie Rindern, Schweinen, Pferden, Ziegen, etc. gewonnene Seren enthalten eine Vielzahl von Komponenten wie Hormone, Wachstums- und Adhäsionsfaktoren, Bindungs- und Transportproteine, Vitamine, Spurenelemente, Fettsäuren und Lipide [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 93]. Die Komplexität der Inhaltstoffe von Seren

(Tab. 1-4) zeigt deutlich die Schwierigkeiten, ein äquivalentes serumfreies Medium herzustellen. Vor allem Insulin, Selen und Transferrin (IST) haben sich als minimaler Serumersatz für einige Ziellinien erwiesen. Jedoch müssen die Kulturgefäße für adhären wachsende Zellen oftmals zusätzlich mit Anheftungsfaktoren wie Poly-D-Lysin oder Fibronectin beschichtet werden [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 110].

Tab. 1-4 Bestandteile tierischer Seren für die Zellkultur [Lindl & Gstraunthaler, 2008].

Serumproteine	Albumin Globuline (z.B. Immunglobuline, IgG) α 1 –Antitrypsin (Proteaseinhibitor) α 2 -Makroglobulin (Proteaseinhibitor)
Transportproteine	Transferrin Transcortin α 1 -Lipoprotein β 1 -Lipoprotein
Adhäsionsproteine	Fibronectin Laminin
Enzyme	Lactat-Dehydrogenase Alkalische Phosphatase γ -Glutamyl-transferase Alanin-Aminotransferase (ALT / GPT) Aspartat-Aminotransferase (AST / GOT)
Hormone	Insulin Glucagon Corticosteroide Vasopressin Thyroxin Parathormon Wachstumshormon Hypophysenhormone (glandotrope Faktoren) Prostaglandine
Wachstumsfaktoren und Cytokine	<i>Epidermal Growth Factor (EGF)</i> <i>Fibroblast Growth Factor (FGF)</i> <i>Nerve Growth Factor (NGF)</i> <i>Endothelial Cell Growth Factor (ECGF)</i> <i>Platelet-derived Growth Factor (PDGF)</i> <i>Insulin-like Growth Factors (IGFs)</i> Interleukine Interferone <i>Transforming Growth Factors (TGFs)</i>
Vitamine und Spurenelemente	Retinol (Vitamin A) alle Vitamine der B-Gruppe Ascorbinsäure (Vitamin C) α -Tocopherol (Vitamin E) Selen, Eisen, Zink, Cu, Co und Cr

I, F, Mn, Mo, V, Ni und Sn	
Nichtproteinäre Stickstoffverbindungen	Harnstoff / Harnsäure Purine und Pyrimidine Polyamine Kreatinin Aminosäuren
Fettsäuren	freie und Protein-gebundene Fettsäuren Triglyceride Phospholipide Cholesterin Ethanolamin Phosphatidylethanolamin
Kohlenhydrate	Glucose Galactose Fructose Mannose Ribose Intermediärmetabolite der Glykolyse

1.3.2.1 Fetales Kälberserum

FKS (fetales Kälberserum) wird am häufigsten in der Zellkultur eingesetzt. Wie der Name schon andeutet, wird das Serum aus dem Blut von Rinderfeten zwischen dem dritten und dem siebten Tragemonat gewonnen. Weltweit werden 500 000 Liter FKS aus ca. 1 Mio. Feten verarbeitet. Das geronnene Blut wird zentrifugiert und der Blutkuchen wird verworfen. Dieses Rohserum wird mit Hilfe von Kerzenfiltern mit Porengrößen von 0,1 µm sterilfiltriert und eingefroren [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 96].

1.4 Nachteile von Seren und serumfreien Medien

Die Verwendung von Seren birgt relevante Nachteile. Eines der größten Probleme ist die schwankende Qualität innerhalb verschiedener Chargen. Die quantitativen und qualitativen Schwankungen in der Zusammensetzung resultieren aus drei Gründen: der jahreszeitlichen Schwankungen der Tierpopulationen, Tiere aus unterschiedlichen Gebieten, sowie unterschiedliche Methoden der Gewinnung und Verarbeitung [Freshney, 2010].

Seren können unerwünschte Toxine wie Endotoxine und Mikroorganismen wie Bakterien (einschließlich Mycoplasmen), Viren, Pilze und Antikörper enthalten [Merten, 2002]. Eine zusätzliche potenzielle Gefahrenquelle birgt der Rinderwahnsinn (**B**ovine **S**pongiforme **E**nzephalopathie BSE) [Dormount, 1999].

1.4.1 Konsequenzen unzureichender Medienqualität

Die Zusammensetzung und die Qualität von Seren und serumfreien Medien spielt in der Kultivierung eine entscheidende Rolle. Entsprechen die Medien nicht der benötigten Qualität, so kann es zu schlechtem Wachstum, Adhäsion und sogar zum Zelltod der Zellen kommen.

1.4.1.1 Zelltod und mangelnde Adhäsion

Im Allgemeinen werden zwei Arten des Zelltods unterscheiden, die Apoptose und die Nekrose.

1.4.1.1.1 Apoptose

Bei vielzelligen Organismen unterliegen die Zellen einer genauen Regulation. Zelltod ist dabei nicht ausgeschlossen, sondern ein essentieller Vorgang [Löffler, 2006 S. 225]. Zellen die nicht mehr benötigt werden oder deren Funktion fehlerhaft sind werden eliminiert. Dieses „Todesprogramm“ wird als programmierter Zelltod oder Apoptose bezeichnet. Sie ist dadurch charakterisiert, dass nur einzelne Zellen in einem Organ oder Gewebe eliminiert werden. Die Apoptose ist ein notwendiger Mechanismus in der Embryogenese und ist maßgeblich bei dem Wandel der äußeren Gestalt des Embryoblasten und Embryos beteiligt. Auch im adulten Stadium ist sie von Bedeutung, da mit der Apoptose die Zellteilungen ausgeglichen werden, sodass Gewebe weder wachsen noch schrumpfen.

Der erste Schritt der Apoptose ist die Kondensation von Chromatin. Anschließend finden die Fragmentierung des Zellkerns in definierte DNA-Fragmente und der Zerfall der Zelle in apoptotische Vesikel statt. Hierbei bleibt die äußere Doppellipidmembran intakt. Die abgestorbenen Zellen bzw. Zellfragmente werden von benachbarten Makrophagen aufgenommen und abgebaut, dieser Vorgang wird als Phagocytose bezeichnet [Löffler, 2006 S. 225].

1.4.1.1.2 Nekrose

Die Nekrose entsteht ohne genetische Kontrolle durch schädigende Einflüsse wie Gifte, Bakterien, Nährstoff- und Sauerstoffmangel, Radioaktivität und vieles mehr. Der erste Schritt ist die Verklumpung des Chromatins, worauf die DNA-Fragmentierung an zufälligen Stellen (Karyolysis) erfolgt, daher entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Die Zelle vergrößert sich stark und ein Anschwellen der Mitochondrien tritt ein. Abschließend findet eine völlige Lyse der Plasmamembran und eine durch die Freisetzung von Enzymen und Metaboliten induzierte Entzündungsreaktion statt. Entstandene Zellreste werden von Fresszellen (Granulocyten, Makrophagen) enzymatisch verdaut.

1.4.1.1.3 Adhäsion

Alle Körperzellen, mit der Ausnahme der Zellen des Immunsystems, bilden dauerhafte Zell-Zell-Kontakte sowie Zell-Substrat-Kontakte aus. Der Anheftungsvorgang ist aus evolutionärer Sicht einer der wichtigsten Faktoren für die Bildung von Gewebeverbänden. Für die Ausbildung solcher Kontakte müssen *in vivo* und *in vitro* zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Eine ausreichende Menge löslicher Faktoren wie Nährstoffe, Wachstumsfaktoren, Hormone, zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , O_2 und CO_2 sind ebenso notwendig, wie spezifische Kultivierungsoberflächen, an denen die Zellen adhären können [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 63 - 64].

1.4.1.1.4 Zell-Zell-Adhäsion

Zell-Zell-Adhäsion wird durch Rezeptoren zwischen benachbarten Zellen vermittelt. An physikalischen Bindungen zwischen Zellen sind Zelladhäsionsmoleküle (Cell Adhesion Molecule, CAM) beteiligt, die sowohl homophile als auch heterophile Zelladhäsionen ausbilden [Schmitz, 2009 S. 135]. Diese CAMs bestehen aus einer oder mehreren Untereinheiten mit jeweils einem Transmembransegment. Membranproteintypen werden, wie in Tabelle 1-5 dargestellt, in die Hauptgruppen Cadherine, Moleküle vom Immunglobulintyp (IgCAM), Selektine, Nektine und Integrine gegliedert [Löffler, 2006 S. 198]. Fast alle zellulären Adhäsionstypen benötigen die zweiwertigen Kationen Magnesium und Calcium.

Tab. 1-5 Übersicht über Zell-Adhäsionsmoleküle [Löffler, 2006 S. 197]

Interaktion zwischen	Membranproteintyp	Calcium	Bindungspartner	
			außen	innen*
zwei Zellen	Cadherine E-, N-, P-Cadherin Desmoglein, Desmocollin Nektine NCAM, PeCAM Selektine Integrine**	abhängig abhängig unabhängig unabhängig abhängig abhängig	homotypisch homotypisch homotypisch homotypisch PSGL-1 ICAM, VCAM**	Aktin intermediäre Filamente Aktin Aktin, Tubulin Aktin (von beiden) Aktin (vom Integrin)
Zelle-Matrix	Integrine	abhängig		Aktin, Vimentin

* Verbindungen zum Cytoskelett werden von Adaptorproteinen vermittelt
 ** Verbindung zwischen Integrinen der Leukozyten und CAMs der Endothelzellen

1.4.1.1.5 Zell-Substrat-Adhäsion

Zell-Substrat- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion ist in der *in-vitro*-Kultur adhärenter Zellen von besonderer Bedeutung. Verantwortlich für die unspezifische Anheftung an Polymeroberflächen sind Signalstoffe und Proteine aus serumhaltigen Medien, die unter physiologischen Bedingungen negativ geladene Zellen in der Adhäsion unterstützen. Der Adhäsionsprozess ist mehrstufig und zweiwertige Kationen und extrazelluläre

Matrixkomponenten, wie die Adhäsionsproteine Fibronectin und Laminin, sind beteiligt. Für die Zell-Matrix-Adhäsion sind Membranproteine des Typs Integrine zuständig. Integrine sind Heterodimere und bestehen aus nicht kovalent gebundenen Glykoproteinketten (jeweils eine α - und β -Untereinheit). Außerdem sind sie Bindungspartner für die Kollagene I und IV, Fibronectin und Laminin, welche Bestandteile der Matrix sind [Schmitz, 2009 S. 135 -136].

1.5 Zielsetzung

Eine herausragende Rolle in der Forschung spielt die Kultur von Säugetierzellen, wobei die für diese Arbeit verwendeten CHO-Zellen eine weit verbreitete Zelllinie ist. Ziel dieser Bachelorarbeit ist die Suche nach einem Ersatz von tierischem Serum in den Nährmedien zur Kultivierung der Zelllinie CHO-K1. Der aktuell auf dem Markt erhältliche Serumersatz ist zum einen teuer und zum anderen für das Wachstum und die Adhäsion oft nicht optimal geeignet. Daher gilt es nach anderen Serumersatz zu suchen. Im Blickpunkt der Arbeit stand pflanzliches Material. Extrakte aus Pflanzen hätten mehrere Vorteile. Sie besitzen ein geringeres biologisches Risiko als tierische Seren. Zusätzlich ist die Gewinnung von Extrakten aus Pflanzen ethisch unbedenklich. Das Ausgangsmaterial könnte in größeren Mengen und kostengünstiger produziert werden.

Diese Arbeit baut auf den Ergebnissen des Studienprojekts "Suche nach pflanzlichem Serumersatz für CHO Zellen" auf, in der verschiedene Pflanzenextrakte erzeugt und diese als Ersatz für fetales Kälberserum (FKS) untersucht wurden [Klepko & Kaschubowski, 2010]. Die Ergebnisse des Projektes zeigten, dass der Hokkaido-Kürbisextrakt einen geringen positiven Effekt auf das Wachstum der CHO-Zellen hatte. In dieser Arbeit sollten, nach den vorläufigen Ergebnissen des Studienprojekts, die biologische Aktivität der Hokkaido-Kürbisextrakte insbesondere der von konzentrierter und aufgereinigter Fraktionen, näher untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturtechniken

2.1.1 Sterile Arbeitstechnik

Um Kontaminationen der Zellkultur zu vermeiden ist steriles Arbeiten von grundlegender Bedeutung. Alle sterilen Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Im Zusammenhang mit der Benutzung der Sicherheitswerkbank sind folgende Punkte zu beschreiben: die Desinfektion, die Arbeitsfläche, das Pipettieren und die UV-Sterilisation.

2.1.2 Desinfektion

Das Ziel der Oberflächendesinfektion ist es, eine größtmögliche Keimreduktion zu erzielen. Das verwendete Desinfektionsmittel, 70%iger Ethanol, bewirkt eine Dehydratation der Keime. Die Arbeitsflächen wurden vor Beginn und nach Beendigung der Arbeiten gründlich mit 70%-igem Ethanol abgewischt. Die für den Versuch notwendigen Materialien bzw. Gegenstände wurden außerhalb der Sicherheitswerkbank mit 70%-igem Ethanol abgesprüht, um eine Explosionsgefahr durch ein entstehendes Ethanol–Luft-Gemisch zu verhindern.

2.1.3 Arbeitsfläche

Auf der Arbeitsfläche der Sicherheitswerkbank wurden nur die für die Arbeit notwendigen Materialien bzw. Gegenstände aufgestellt, um mögliche Turbulenzen im laminaren Luftstrom zu vermeiden. Flüssige und feste Abfälle wurden getrennt entsorgt. Flüssigkeiten wurden in einer Abfallflasche, Glas- und Kunststoffwaren in einem autoklavierbaren Müllbeutel entsorgt. Nach der Beendigung der Arbeiten wurden diese Abfälle in einem Autoklaven bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert.

2.1.4 Pipettieren

Für die Versuche wurden sterile serologische Einmalpipetten und Pipettenspitzen aus Kunststoff verwendet. Für das Pipettieren unter der Sterilwerkbank wurde eine elektrische Pipettierhilfe mit innen liegendem Sterilfilter (0,2 µm) verwendet. Beim Öffnen der Einmalpipetten muss eine Kontamination mit der Außenhülle der Pipette verhindert werden. Die verwendeten Pipetten und Pipettenspitzen wurden wie zuvor beschrieben entsorgt.

2.1.5 UV-Sterilisation

Am Ende eines Arbeitstages wurde als zusätzliche Desinfektionsmaßnahme, zur Verminderung der Luft- und Oberflächenkeimzahl, eine Desinfektion mit ultravioletter

Strahlung (UV-Strahlung) von 254 nm durchgeführt. Das Absorptionsmaximum für Nucleinsäuren liegt bei 254 nm. Durch eine dauerhafte Bestrahlung mit UV-Licht kommt es zur Dimerisierung von Pyrimidinen und zur Bildung von Thymin-Dimeren. Eine fortschreitende Dimerisierung führt zu Deletionsmutationen bis hin zum Abbruch der Replikation und bewirkt somit ein Absterben von Mikroorganismen [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 22]. Die Dauer der Bestrahlung betrug eine Stunde.

2.2 Kultivierung tierischer Zellen

2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Für diese Arbeit wurde die immortalisierte Zelllinie CHO-K1 verwendet. Alle Zellkulturarbeiten wurden wie im vorigen Abschnitt beschrieben unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Inkubationsschrank bei einer Temperatur von 37 °C und bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ kultiviert. Die zur Kultur verwendeten Medien und Lösungen wurden vor der Verwendung sterilisiert bzw. steril filtriert soweit sie vom Hersteller nicht steril geliefert wurden.

Die verwendeten Zellen wurden über einen Zeitraum von bis zu einer Woche, je nach Aussaat-Zelldichte, in einem Zellkulturgefäß kultiviert. In dieser Arbeit wurden die CHO-Zellen jeweils 30 Stunden in der Versuchskultur und 72 Stunden in der Erhaltungskultur statisch kultiviert. Für die Erhaltungskultur wurden T25- und T75-Kulturflaschen verwendet, wobei die Kennzahl der Flaschen die Kulturfläche in cm² angibt. In der Versuchskultur wurden ausschließlich 24-Well-Platten eingesetzt. Alle verwendeten Kulturgefäße bestanden aus Polystyrol und wurden von den Herstellern zusätzlich beschichtet, um die Adhäsion der Zellen zu verbessern.

2.2.2 Passagieren

Zum Zeitpunkt der Subkultivierung, wenn eine Konfluenz der Zellen von 80 % bis 90 % erreicht wurde, mussten die Zellen auf neue T-Flaschen passagiert werden, um die Vitalität und das Wachstum der Zellen konstant zu halten. Dies erfolgte montags, mittwochs und freitags. Zuerst mussten die verwendeten Lösungen und Medien in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden, um die Zellen nicht durch einen zu hohen Temperaturunterschied zu stressen. Die Arbeitsfläche unter der Sicherheitswerkbank wurde mit 70 %-igen Ethanol gereinigt und desinfiziert. Anschließend wurde das Kulturmedium aus der T-Flasche abpipettiert und die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Dies diente dem Entfernen der Mediumreste, welche die nachfolgende proteolytische Ablösung der Zellen gestört hätte. Durch die Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung (mit 0,05 % (w/v) Trypsin und 0,02 % (w/v)

EDTA) konnten die Zellen nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst werden. Der Ablöseprozess konnte im Lichtmikroskop verfolgt werden, wobei die Zellen zunehmend rund erschienen. Unterstützend wurden Scherkräfte durch seitliches Klopfen gegen das Kulturgefäß erzeugt. Der enzymatische Verdau wurde nach dem Ablösen der Zellen durch die Zugabe serumhaltigen Mediums gequencht. Anschließend wurden 0,5 mL der Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer abgenommen. Anhand dieser Zellzahl in der Suspension wurde das benötigte Volumen für die Aussaat berechnet (Gl. 2-1).

$$\text{Benötigtes Volumen für die Aussaat [mL]} = \frac{\text{Benötigte Zellzahl für die Aussaat [Zellen]}}{\text{Gezählte Zellzahl in der Suspension [Zellen/mL]}} \quad \text{Gl. 2-1}$$

Abschließend wurden die Zellen definiert auf neue Kulturgefäße ausgesät. Die Arbeitsmengen für die Kultivierung in Abhängigkeit des Kulturgefäßes sowie die Aussatzelldichten sind in folgender Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tab. 2-1 Ablösen und Passagieren von Zellen

Kultivierungsgefäß	PBS ⁻ [ml]	Trypsin [ml]	Medium [ml]	Aussaat[Zellzahl]
T25	4	0,5	4	6,6x10 ⁵
T75	10	1,0	9	2,0x10 ⁶
24-Well	1	0,1	-	5,0x10 ⁴

2.3 Zellzählung

Um die Zellzahl zu bestimmen wurde eine Neubauer-Zählkammer und das Zellzählgerät Countess® Cell Counter verwendet. Die Vorbereitung der Zellen für das Zählen war für beide Methoden der Zellzahlbestimmung identisch. Die Zellen wurden zuerst zwei Mal mit einer ausreichenden Menge PBS⁻ gewaschen, um Medienreste und tote Zellen vollständig zu entfernen. Danach wurden pro Well 200 µL einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % v/v Trypsin; 0,02 % v/v EDTA) hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 40 Minuten konnten die Zellen vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgespült werden. Die auf diese Weise abgelösten Zellen neigten zur Aggregation, weshalb die Zellsuspension

resuspendiert werden musste. Hierbei musste beachtet werden, so wenig Scherkräfte wie möglich zu erzeugen, um eine Beschädigung der Zellen zu vermeiden. Aus der resuspendierten Zellsuspension wurden 10 μL entnommen und in eine Zählkammer beziehungsweise in ein Countess® *chamber slide* pipettiert. Von allen Proben wurde jeweils eine Doppelbestimmung erstellt.

2.3.1 Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer-Zählkammer ist eine etwa 30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte mit einer um einen definierten Betrag vertieften Mittelfläche. Die definierte Fläche ist je in vier große Quadrate aufgeteilt, welche wiederum jeweils aus 16 Kleinquadraten bestehen. Unter einem Lichtmikroskop mit 10-facher Vergrößerung wurde die Zählkammer ausgezählt. Aus den vier großen Quadraten wurde der Mittelwert gebildet, welcher mit einem Faktor von 10^4 mL^{-1} multipliziert wurde. Das Produkt der Gleichung 2-2 ergibt die Zellzahl pro Milliliter ausgezählte Zellsuspension.

$$Z_{\text{mL}} = \bar{Z} \times v \times 10^4 \text{ mL}^{-1} \quad \text{Gl. 2-2}$$

Z_{mL}	=	Zellzahl pro Milliliter
\bar{Z}	=	Mittelwert der ausgezählten Quadrate
v	=	Verdünnungsfaktor
10^4	=	Faktor

Der Faktor 10^4 mL^{-1} ergibt sich aus dem Volumen zwischen Zählkammer und Deckglas (Gl. 2-3).

$$H_Q \times B_Q \times T_K = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ mL} \quad \text{Gl. 2-3.}$$

H_Q	=	Höhe eines Quadrates	=	1 mm
B_Q	=	Breite eines Quadrates	=	1 mm
T_K	=	Tiefe der Kammer	=	0,1 mm

2.3.2 Countess® Cell Counter

Das Zellzählgerät Countess® *Cell Counter* besitzt einen anspruchsvollen Bildanalyse-Algorithmus, um eine genaue Zellzahl und Zellvitalität bestimmen zu können. Die Countess® *chamber slides* werden mit 10 μL der resuspendierten Zellsuspension beladen und in die Geräteöffnung geschoben. Innerhalb von 30 Sekunden produziert das Gerät ein statisches Bild (Abb. 2-1) der aktuellen Probe und gibt die Zellzahl aus. Die in Abbildung 2.1 sichtbaren farbigen Kreise zeigen an, ob die Zellen lebendig (blauer Kreis) oder tot (roter Kreis) sind; schwarze Kreise repräsentieren von der Messung ausgeschlossene Zellen. Der Algorithmus erfasst sowohl die durchschnittliche Zellgröße als auch die Verteilungsbreite der Zellen an

(Abb. 2-2). Der Messbereich dieses Geräts reicht von 1×10^4 bis 1×10^7 Zellen / mL, mit einem optimalen Bereich von 1×10^5 bis 4×10^6 Zellen / mL, weiter als der einer manuellen Zählkammer. Die optimale Größe der Zellen liegt im Bereich von 5 μm bis 60 μm .

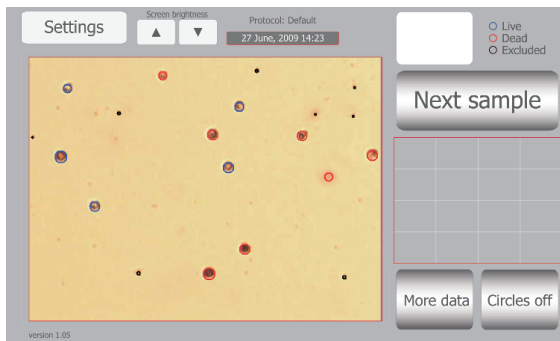


Abb. 2-1 Countess® Cell Counter Bildauswertung.

Darstellung der Vorgehensweise der Zellzählung. Blaue Kreise umrandeten lebendige Zellen. Rote Kreise markierten tote Zellen und schwarze Kreise repräsentieren von der Messung ausgeschlossene Zellen und Partikel [Invitrogen, 2011].

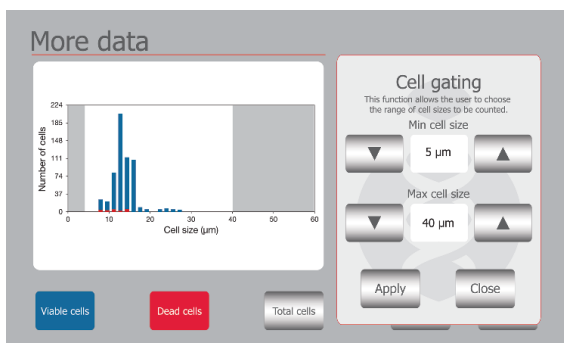


Abb. 2-2 Normalverteilung der Zellgrößen

Darstellung zeigt die durchschnittliche Zellgröße in μm als auch die Verteilungsbreite [Invitrogen, 2011].

2.3.2.1 Standardabweichung

Um eine Aussage treffen zu können, wie weit die Zellzahl um den Mittelwert streuen, wurde die Standardabweichung der Beobachtungsreihe bestimmt. Sie besitzt die gleiche Einheit wie die zugehörigen Messwerte der Beobachtungsreihe. Die Formel zur Bestimmung der Standardabweichung ist in der Gleichung 2-4 dargestellt.

$$S = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2} \quad \text{Gl. 2-4}$$

- S = Standardabweichung
- n = Anzahl der ausgezählten Quadrate der Neubauer-Zählkammer
- Z = Gesamtzellzahl

2.3.2.2 Fehlerfortpflanzung

Bei allen Messungen der Zellzahlen ist eine Größe nicht direkt messbar, sondern sie ist indirekt aus der Summe mehrerer Messungen zu bestimmen. Aus dieser Summe wird ein Fehler durch die Standardabweichung bestimmt. Um die Ergebnisse besser darstellen zu können, wurde eine Normierung der Zellzahlen vorgenommen. Also ergeben die Einzelfehler einen neuen Fehler. Der Fehler wurde durch die Fehlerfortpflanzung bestimmt (Gl.2-5).

$$\Delta G = \sqrt{\left(\frac{\partial G}{\partial x} * \Delta x\right)^2 + \left(\frac{\partial G}{\partial y} * \Delta y\right)^2} \dots \quad \text{Gl. 2-5}$$

ΔG	=	Messunsicherheit der Funktion G
$\frac{\partial G}{\partial x}, \frac{\partial G}{\partial y}$ usw.	=	partiale Ableitung der Funktion $G=f(x, y, \dots)$ nach den Messgrößen x, y, \dots
$\Delta x, \Delta y$ usw.	=	Vertrauensbereich des Mittelwerts der einzelnen Messgrößen

2.4 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst schonend. Hierzu wurde das Kryogefäß aus dem flüssigen Stickstoff (-196 °C) in das Wasserbad 37 °C überführt. Bei der Entnahme eines Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde stets eine Schutzbrille und Thermohandschuhe getragen, um Verbrennungen mit Stickstoff zu verhindern. Der Inhalt wurde schnell im Wasserbad (37 °C) erwärmt, bis er vollständig aufgetaut war. Die Aussaat der Zellen wurde zügig durchgeführt, da das zugesetzte Kryoprotektivum Dimethylsulfoxid (DMSO) im aufgetauten und konzentrierten Zustand zytotoxisch wirkt [Friedler *et al.*, 1988]. Im Anschluss wurde die aufgetaute Zellsuspension in ein Zellkulturgefäß überführt und, zu Beginn tropfenweise, 37 °C warmes Kulturmedium vorsichtig zugegeben und auf die jeweiligen Kulturflaschen verteilt. Am folgenden Tag nach der Aussaat wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um DMSO, tote Zellen und Zellbruchstücke zu entfernen.

2.5 Herstellung des Hokkaido-Kürbisextraktes

Der in dieser Bachelorarbeit verwendete Hokkaido-Kürbis wurde in Spanien gezüchtet und gehört zur Sorte des Riesenkürbisses *Cucurbita maxima*. Der Hokkaido-Kürbis mit Bio-Siegel wurde bei AlnaturA® erworben. Alle verwendeten Hilfsmittel wurden vor Gebrauch mit Reinstwasser gespült, um mögliche Verunreinigungen durch Endotoxine und Spülmittelreste der Zellkultur zu vermeiden. Zuerst wurde der Hokkaido-Kürbis gewaschen

und geschält, bevor das Fruchtfleisch mittels eines elektrischen Stabmixers auf Eis homogenisiert wurde. Anschließend wurde das feine Homogenisat für eine Stunde bei 20.000 rpm (48.500 x g) und 4 °C in einer Beckmann Stand-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50-mL-Zentrifugengefäß überführt. Abschließend wurde das Zentrifugat durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert. Die so erzeugten Filtrate wurden in sterile Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Mit der Größenausschlusschromatographie (SEC) können gelöste Moleküle nach ihrer Größe in einem porösen Trägermaterial mit definierter Porengröße getrennt werden. Die Probenmoleküle können ab einer bestimmten Größe nicht in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren im Ausschlussvolumen V_0 . Durch Eindringen der Probenmoleküle in das Porensystem werden diese retardiert. Je kleiner ein Probenmolekül ist, desto länger ist sein zurückgelegter Weg durch die Säule und seine Zugänglichkeit für das Porenvolumen. Ist der Radius des Probenmoleküls viel kleiner als der Pore so eluiert das Molekül zuletzt (Gl. 2-6) [Meyer, 2004 S. 211]. Die Peakfläche ist proportional zur Konzentration der Eluenten, wodurch die Konzentration der zu untersuchenden Probe ermittelt werden kann.

$$\text{zugängliches Probenvolumen} = (r_{\text{Probe}} - r_{\text{Molekül}})^2 * \pi * (l - r_{\text{Molekül}}) \quad \text{Gl. 2-6}$$

Unter der Annahme, dass die Poren zylinderförmig mit dem Radius r_{Probe} und der Länge l sind.

Der Hokkaido-Kürbisextrakt wurde mittels einer FPLC-Anlage aufgereinigt. FPLC steht für "*Fast Protein Liquid Chromatography*". Das System besteht aus einer SEC-Säule, einem Leitfähigkeits- und einem UV-Detektor, zwei Pumpen (A und B), einer Probenschleife, einem automatischen Fraktionssammler, einem Mediumentgaser und der Software Director 1.03. Die Kontrolleinheit *Liquid Chromatography Controller LCC-500 Plus* stammt von der Firma Pharmacia. In der Anlage können sowohl rekombinante als auch natürliche Produkte aufgereinigt werden. Für die Aufreinigung wurde eine SEC-Säule S-200 mit einer stationären HiPrep™ Sephacryl™ Phase verwendet. Die hydrophile Säule besteht aus einem quervernetzten Kopolymer aus Allyl-Dextran und N,N'-Methylen-Bisarcylamid. Die Zusammensetzung der Säule wurde so gewählt, dass Proteine und niedermolekulare

Bestandteile der Probe nach der Größe voneinander getrennt wurden. Der Trennbereich der Säule lag im Bereich von 5 bis 250 kDa bei einem Säulenvolumen von 120 mL und konnte mit einem maximalen Fluss von 1 mL / min betrieben werden. Die Raumtemperatur wurde als konstant bei 20 °C angenommen.

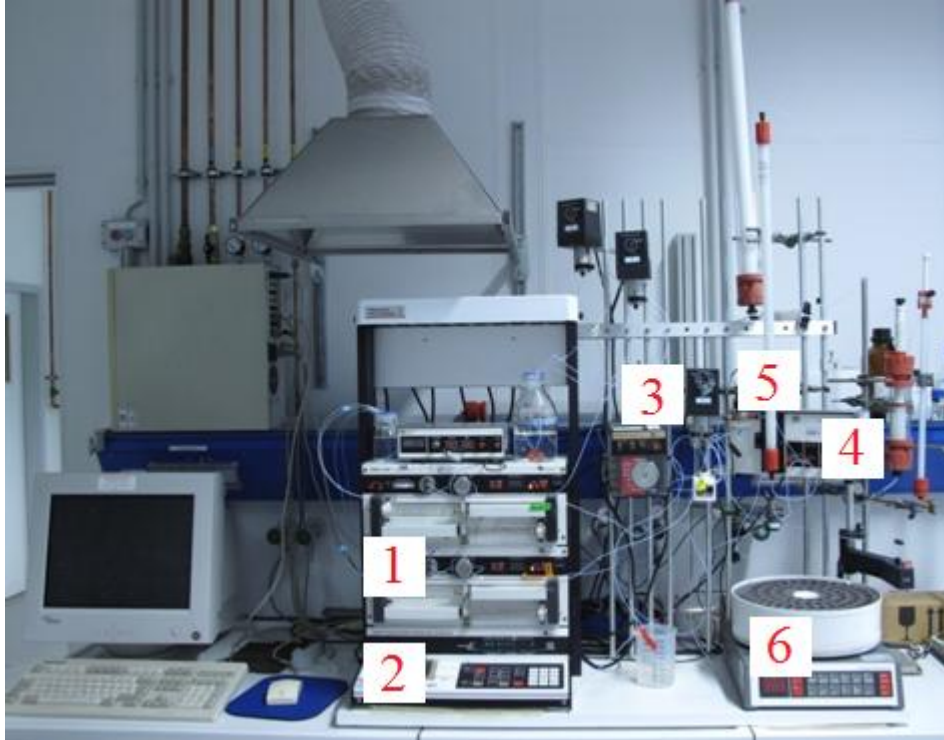


Abb. 2-3 FPLC-Anlage im Labor für Molekularbiologie und Zellkulturtechnik der AG Prof. Dr. B. Anspach.

Links im Bild ist ein PC zu sehen welcher mit der FPLC-Anlage verbunden ist. In der Mitte sind die Pumpen (A und B) (1) sowie die Kontrolleinheit (2) zu sehen. Rechts befinden sich das Ventil (3), der UV- und der Leitfähigkeitsdetektor (4), die SEC-Säule (5) sowie der Fraktionssammler (6).

Vor dem Beginn der Aufreinigung war es notwendig die SEC-Säule zu waschen und zu äquilibrieren, um mögliche störende Komponenten aus der Säule zu entfernen und eine möglichst gute Aufreinigung zu ermöglichen. Zuerst wurde ein Programm zum Waschen und Äquilibrieren geschrieben, welches beide Vorbereitungsschritte enthielt und der Tabelle 2-2 zu entnehmen ist. Das Programm wurde in Abhängigkeit des Retentionsvolumens geschrieben. Der Wasch- und Äquilibrierschritt dauerte ca. 8 h, da mit mehr als zwei Säulenvolumina gewaschen wurde. Als Fließmittel diente ein 20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer (HEPES-Puffer) mit pH 7,4 und 150 mM Natriumchlorid (NaCl). Die Flussrate betrug gestaffelt 0,5 mL / min bis zu einem Volumen von 90 mL und anschließend 0,8 mL / min bis zum Endvolumen von 290 mL.

Tab. 2-2 Programm der FPLC–Anlage zum Waschen und Äquilibrieren der SEC-Säule.

Anweisung	Volumen [mL]	Funktion	Wert / Position
Ventilstellung	0,00	INJ_VALVE	WASTE
Flussrate	0,00	FLOW	0,10
Waschfunktion	0,02	WASH	A
Ventilstellung	0,10	INJ_VALVE	LOAD
Konz. Pumpe B	0,10	CONC_B	0,00
Flussrate	0,10	FLOW	0,50
Flussrate	90,00	FLOW	0,80
Flussrate	290,00	FLOW	0,02
Programm Stop	290,00	HOLD	

Anschließend wurde ein Versuchsprogramm für die Aufreinigung geschrieben, welches der Tabelle 2-3 zu entnehmen ist.

Tab. 2-3 Versuchsprogramm der FPLC–Anlage

Anweisung	Volumen [mL]	Funktion	Wert / Position
Flussrate	0,00	FLOW	0,50
Konz. Pumpe B	0,00	CONC_B	0,0
Ventilstellung	0,00	INJ_VALVE	Load
Ventilstellung	2,50	INJ_VALVE	Inject
Ventilstellung	7,50	INJ_VALVE	Load
Fraktionssammler	35,00	FRACTION COLLECTOR	Start
Flussrate	150,00	FLOW	0,02
Fraktionssammler	150,00	FRACTION COLLECTOR	Stop

Das zum Waschen und Äquilibrieren verwendete Puffersystem wurde mit einem Fluss von 0,5 mL / min eingesetzt. Die Probenaufgabe erfolgte über eine 2-mL-Probenschleife, die vor der Aufreinigung zuerst mit 20 %-igem Ethanol und danach mit dem HEPES/NaCl-Puffer über eine peristaltische Pumpe gewaschen wurde. Nach dem Spülen wurde die Probenschleife mit schonend aufgetautem und zentrifugiertem Extrakt beladen. Vor dem Start des Versuchs wurden die Auffanggefäße des Fraktionssammlers mit Reinstwasser gewaschen und im Trockenschrank bei 70°C getrocknet. Der Fraktionssammler wurde ab 35 mL des Elutionsvolumens gestartet, bevor der Durchbruchspeak der Chromatographie zu erwarten war. Hierbei betrug die Fraktionsgröße 2 mL pro Auffanggefäß. Nach der Beendigung des Versuchs wurden die Pumpen A und B mit 20 %-igem Ethanol unter Benutzung des zuvor beschriebenen Waschprogramms gewaschen, bevor die Anlage nach Vorschrift heruntergefahren wurde.

2.6.2 Aufkonzentrierung mit dem Rotationsverdampfer

In dieser Arbeit wurde ein Rotationsverdampfer verwendet um den hergestellten Kürbisextrakt aufzukonzentrieren indem das Lösungsmittel, in diesem Fall Wasser, aus der Lösung verdampft wurde.

Eine Trennung von Stoffen wird dadurch erreicht, dass sich deren Siedepunkte unterscheiden, also, dass bei einer gegebenen Temperatur bestimmte Stoffe verdampfen und andere nicht. Durch das Anlegen eines Unterdrucks an die Apparatur wird die Siedetemperatur der zu verdampfenden Flüssigkeiten gesenkt. Das Erwärmen des Probenkolbens im Heißbad verdampft das Lösungsmittel, der Dampf strömt in den Spiralkühler wo er kondensiert und in flüssiger Form in den Auffangkolben abtropft. Durch die Rotation des Probenkolbens wird das Verdampfen des Lösungsmittels verbessert und die Blasenbildung wird reduziert, da die Oberfläche um ein Vielfaches erhöht wird [Grahn & Follmann, 1999]. Das Volumen der Lösung nimmt kontinuierlich mit der Verdampfungsdauer ab bis das benötigte Einengungsvolumen erreicht wird. Im Wasserbad wurde der Extrakt in einem 100-mL Rundkolben unter Rotation auf 32 °C erwärmt. Der erzeugte Wasserdampf wurde im Spiralkühler kondensiert und konnte in den Auffangkolben nach unten abtropfen. Eine Vakuumpumpe erzeugte einen Unterdruck von 36 mbar, wodurch das Verdampfen des Wassers begünstigt wurde. In der Steuerungsanlage wurden die benötigten Werte wie Druck und Temperatur vorgegeben.

2.6.3 Größenbestimmung der HK-Extrakt-Bestandteile durch SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), handelt es sich um eine analytische Methode zur Bestimmung von Proteinmassen [Neumann, 2005]. Dabei werden die zu untersuchenden Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Bewegung der Proteine durch die Gelmatrix erzwungen. Hierbei unterscheidet man zwischen Sammel- und Trenngel. Während im Sammelgel die Proteine konzentriert werden, findet die eigentliche Auftrennung im Trenngel statt. Aufgrund der verschiedenen Funktionen der Gele unterscheiden diese sich in der Acrylamidkonzentration und im pH-Wert.

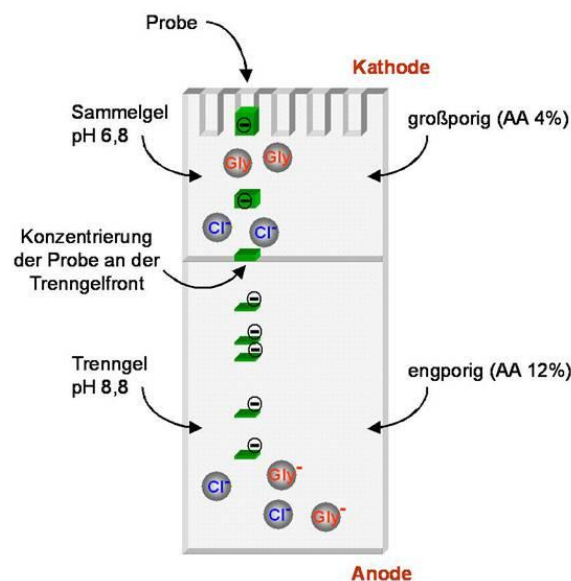


Abb. 2-4 Darstellung des Funktionsprinzips einer SDS-PAGE

Zu sehen sind Trenn- und Sammelgel mit den unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen und pH-Werten der Gele. Aufgrund der Großporigkeit und des niedrigeren pH-Wertes erfolgt eine Konzentrierung der Proteine im Sammelgel und eine Auftrennung im engporigen Trenngel bei pH 8,0 [Neumann, 2005].

Aufgrund des unterschiedlichen isoelektrischen Punktes von Proteinen und somit unterschiedlicher Ladung bei bestimmten pH-Werten werden die aufzutrennenden Proben mit SDS bei 95°C denaturiert. Das SDS bewirkt eine Maskierung der Eigenladung der Proteine und erzielt somit eine negative Gesamtladung des Proteins, wodurch eine Wanderrichtung der Proteine von der Kathode zur Anode ermöglicht wird. Das SDS besitzt einen hydrophoben Schwanz, welches sich an die hydrophoben Aminosäurereste der Proteine anlagert. Dabei bindet ein SDS-Molekül an zwei Aminosäurereste. Durch dieses proportionale Verhältnis ergibt sich ein annähernd gleiches Masse- und Ladungsverhältnis unterschiedlich großer Proteine [Neumann, 2005].

Durch die Struktur des Gels wandern große Proteine nicht so weit wie kleinere Proteine, da diese einen größeren Widerstand im Porensystem überwinden müssen [Horton *et al.*, 2008 S. 98-99].

Da es sich um niedermolekulare Proteine oder Peptide handeln konnte, die einen positiven Effekt auf das Wachstum der CHO-Zellen ausübten, wurde für die SDS-PAGE ein Gel angesetzt, mit einer Konzentration von 20% Acrylamid, um eine ausreichende Trennung im niedermolekularen Bereich zu ermöglichen. Die Zusammensetzung der Acrylamid-Gele ist der Tabelle 2-4 zu entnehmen. Als Größenstandard wurde ein LMW-Proteinmarker (Low Molecular Weight) der Firma GE Healthcare verwendet. Die Zusammensetzung des Markers ist in Tabelle 2-5 aufgelistet.

Tab. 2-4 Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele(für 4 Gele). (Gelsystem von Bio-Rad Mini-PROTEAN®3. Ausmaße des Gels 8,3 cm (Briete) x 7,3 cm (Länge))

Trenngel (20% Acrylamid)		Sammelgel (5% Acrylamid)	
Zusammensetzung	Menge	Zusammensetzung	Menge
30% Acrylamid	6,67mL	30% Acrylamid	1,7mL
3M Tris-HCl pH 8,8	1,25mL	3M Tris-HCl pH 6,8	1,25mL
10% SDS	0,1mL	10% SDS	0,1mL
TEMED	5µL	ddH ₂ O	7,2mL
10% APS	50µL	TEMED	10µL
60% Saccharose	1,93mL	10% APS	50µL

Tab. 2-5 GE Healthcare *Low Molecular Weight* Marker-Zusammensetzung (Produkt-Nr: 17-0446-01).

Protein	MW [kDa]
Phosphorylase β	97
Albumin	66
Ovalbumin	45
α-Carboanhydrase	30
Trypsin inhibitor	20,1
α-Lactalbumin	14,4

2.6.4 Färbung von SDS-Gelele

2.6.4.1 Protokoll der Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine Methode zum Anfärben von Proteinen nach einer SDS-PAGE. Diese Methode zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität im Vergleich zu Coomassie-Brillant-Blaufärbung aus. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 ng bis 1 ng pro Gelbande.

Alle Lösungen wurden im voraus angesetzt, außer entsprechend gekennzeichnete Zusätze (*) in der Tabelle 2-6 werden vor Gebrauch frischangesetzt und hinzupipettiert.

Tab. 2-6 Benötigte Lösungen für die Silberfärbung

Fixierlösung (400 mL für 4 SDS-Gele)	40 % (v/v) Ethanol 10 % Essigsäure
Sensibilisierungs-Lösung (400 mL für 4 SDS-Gele)	30 % (v/v) Ethanol 2 mg/ml Natriumthiosulfat 68 mg/ml Natriumacetat 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd (25 % (w/v) *)
Silbernitratlösung * (250 mL für 4 SDS-Gele)	2,5 mg/ml Silbernitrat 0,04 % (v/v) Formaldehyd (37 % (w/v) *)
Entwicklerlösung (300 mL für 4 SDS-Gele)	25 mg/ml Natriumcarbonat 0,02 % (v/v) Formaldehyd (37 % (w/v) *)
Stopp-Lösung (400 mL für 4 SDS-Gele)	14,6 mg/ml EDTA
* Vor dem Gebrauch frisch angesetzt	

Nach der Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig aus der Gelapparatur herausgenommen und in eine Laborschale mit Fixierlösung überführt. Alle Arbeiten wurden unter dem Abzug auf einem Kippschwänker durchgeführt unter Verwendung von Nitril-Handschuhen. Nach jedem zeitlich begrenzten Schritt wurden die Lösungen aus der Schale entnommen und durch die nachfolgende ersetzt (Tab. 2-7). Alle Abfälle wurden separat in entsprechenden Behältern entsorgt.

Tab. 2-7 Färbeprotokoll

Schritt	Lösung	Zeit in Min.
1	Fixierlösung	30
2	Sensibilisierungs-Lösung	30
3	VE-Wasser	10
4	VE-Wasser	10
5	VE-Wasser	10
6	Silbernitratlösung	30
7	VE-Wasser	1
8	VE-Wasser	1
9	Entwicklerlösung	5 bis 10
10	Stopp-Lösung	10
11	VE-Wasser	5
12	VE-Wasser	5
13	VE-Wasser	5

Die gefärbten Gele wurden mit wenig VE-Wasser in eine Plastikfolie eingeschweißt und eingescannt. Abschließend wurden die Gele bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.4.2 Proteinbestimmung nach Biuret

Für die Proteinbestimmung wurde das Reagenz Roti®-Quant universal der Firma Carl Roth verwendet, welches auf der colorimetrischen Biuret-Reaktion basiert [Lottspeich, 2006 S. 38]. Modifikationen gegenüber der klassischen Biuret-Reaktion vereinen eine Verstärkung der colorimetrischen Reaktion sowie eine verringerte Störanfälligkeit gegenüber Salzen, Detergenzien und Alkoholen. Die Reaktion basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , es findet eine stark alkalische Reaktion statt, bei der Proteine und Peptide zu einem purpurvioletten Protein-Kupfer-Tartrat-Komplex umgewandelt werden. Hierbei reagieren Einzel-Aminosäuren und Dipeptide nicht, Tripeptide und größere Polypeptide oder Proteine hingegen reagieren. Die Kupferkomplexe entwickeln eine starke Lichtabsorption mit einem

Absorptionsmaximum bei 503 nm. Ein Nachteil der Biuret-Reaktion ist, dass sie unempfindlicher ist als vergleichbare Methoden. Der lineare Messbereich des Testsystems liegt bei Proteinkonzentrationen zwischen 5 bis 2000 µg/mL [Lottspeich, 2006 S. 38].

Das Verfahren wurde angewandt, um die Gesamtkonzentration von Tripeptiden und Polypeptiden nach der Aufreinigung des Hokkaido-Kürbisextraktes zu bestimmen. Die Reagenzien des Roti®-Quant universal Testkits sind anfällig gegenüber Störsubstanzen mit stark reduzierendem Potential. Dazu gehören, wie Tabelle 2-8 zeigt, reduzierende Zucker ebenso wie starke Säuren oder Basen.

Tab. 2-8 Störkomponenten für die Proteinbestimmung [Roth].

Substanz	Störkonzentration	Substanz	Störkonzentration
Ammoniumsulfat	1,5 M	Methanol	10%
DMF	10%	NaOH	0,1 M
DMSO	10%	Natriumacetat pH 4,8	0,2 M
EDTA	10 mM	Natriumazid	0,20%
Ethanol	10%	Natriumcarbonat	0,1 M
Glucose	10 mM	Natriumchlorid	1 M
Guanidin-HCl	4 M	Natriumphosphat	0,1 M
Glycerin	10%	SDS	1%
Glycin	1 mM	Sucrose	40%
Harnstoff	3 M	Tris	25 mM
HCl	0,1 M	Triton X-100	1%
HEPES	50 mM	Triton X-114	1%
Imidazol	25 mM	Tween 20	1%
MES pH 6,1	0,1 M		

Als Standard diente BSA (*Bovine Serum Albumin*), was in einem Bereich von 125 µg / mL bis 2000 µg / mL gemessen wurde. Hierzu wurde aus einer Stammlösung mit 2,0 mg / mL BSA anhand der in Tabelle 2-9 dargestellten Verdünnungsreihe, eine Standardreihe erstellt. Die Ansatzvolumina für die Mikrotiterplatten betragen 50 µL pro Probe und 125 µL Arbeitslösung pro Well. Die Arbeitslösung, welche die Farbreaktion hervorruft, besteht aus 15 Teilen Reagenz 1 und 1 Teil Reagenz 2. Die Arbeitslösung ist bei Raumtemperatur und lichtgeschützt 24 Stunden stabil.

Tab. 2-9 Verdünnungsreihe des Standards

Lösung	Endkonzentration BSA (µg / mL)	Volumen Verdünnungspuffer [µL]	Volumen und Herkunft BSA [µL]
A	2000	0	400 Stammlösung
B	1500	125	375 Stammlösung
C	1000	325	325 Stammlösung
D	750	325	325 Lösung B
E	500	325	325 Lösung C
F	250	325	325 Lösung E
G	125	325	325 Lösung F
H	50	450	300 Lösung G
I	25	400	100 Lösung G
K	5	400	100 Lösung I
Leerwert	0	400	0

Wie zuvor beschrieben, wurde die Arbeitslösung den Proben hinzu pipettiert und 30 Minuten bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Abschließend wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen und die Messwerte zur Auswertung in Excel überführt.

3 Prinzipieller Versuchsablauf

Nach dem Erwerb des Hokkaido-Kürbis bei Alnatura® wurde er gewaschen und geschält, bevor das Fruchtfleisch mittels eines elektrischen Stabmixers auf Eis homogenisiert wurde. Der Hokkaido-Kürbis und der verwendete Stabmixer wurden zunächst mit Reinstwasser gereinigt, um mögliche Verunreinigungen mit Endotoxinen und Detergenzien in der Zellkultur zu vermeiden.

Um den Extrakt aus dem Homogenisat zu gewinnen, wurde das Homogenat bei 20.000 rpm (48.500 x g) und 4 °C in einer Beckman Stand-Kühlzentrifuge für eine Stunde zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der flüssige Überstand zunächst in sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das Pellet verworfen. Das Verhältnis zwischen Überstand und Pellet war ca. 2:1. Anschließend wurde das Zentrifugat durch Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert, um restliche Zelltrümmer zu entfernen und gleichzeitig das Filtrat sterilzufiltrieren. Die so erzeugten Filtrate wurden in sterile Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Nach der Kultivierung von Zellen in die T-Flaschen wurde die benötigte Zellmenge für die 24-Well-Mikrotiterplatten nach der Gleichung 2-1 berechnet. Die Zellen aus der Erhaltungskultur wurden mit 10% FKS-haltigem Ham's-F12 Medium auf das benötigte Volume aufgefüllt und resuspendiert. Das Gesamtvolumen pro 24-Well-Mikrotiterplatte betrug 26 ml. Anschließend wurde die Suspension kontinuierlich resuspendiert, damit die Zellen nicht sedimentieren, um mögliche Schwankungen der Zellzahlen zu vermeiden. Zuerst wurden die CHO-Zellen sechs Stunden mit FKS-haltigem Medium bis zur Adhäsion kultiviert, da FKS die Adhäsionsproteine wie Fibronectin und Laminin enthält. Anschließend wurde ein Mediumwechsel mit FKS-freiem Ham's-F12 Medium bzw. mit FKS-haltigem Medium bei den Kontrollen durchgeführt. Nach dem erfolgreichen Mediumwechsel wurden die sterilen Extraktproben oder die aufgereinigten Proben in unterschiedlichen Konzentrationen in die Wells pipettiert. Es wurden Doppelbestimmungen für jede Probe durchgeführt. Abschließend wurden die Kulturen nach 48 h Inkubation über eine Neubauer Zählkammer oder Countess® Cell Counter ausgezählt.

4 Ergebnisse

4.1 Reproduktion der Ergebnisse aus dem Studienprojekt

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Pflanzlichen Serumersatzes für die Kultivierung von CHO-Zellen. Da diese Arbeit auf den Ergebnissen einer vorangegangenen Studienarbeit (Klepko & Kaschubowski, 2010) aufbaute, sollten zunächst die Ergebnisse der Studienarbeit auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft werden. Hierfür wurde, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, ein steriler Hokkaido-Kürbisextrakt hergestellt und zu in 24-Well-Mikrotiterplatten ausgesäten Zellen gegeben. Das Vorgehen in den beiden Arbeiten unterschied sich in folgenden Punkten: Für die Studienarbeit wurden die Zellen mit Hilfe einer Verdünnungsreihe so ausgesät, dass sie nach 24 h eine Konfluenz von ca. 30 % zeigten, ein Medienwechsel erfolgte nach 24 h. In dieser Arbeit hingegen betrug die Zellzahl für die Aussaat 5×10^4 Zellen pro Well (siehe Gl. 2-1), der Medienwechsel erfolgte bereits nach 6 Stunden, da diese Zeit für die Adhäsion der Zellen auf der Welloberfläche ausreichend war. Da CHO-Zellen in der Regel mit 10 % FKS (fetales Kälberserum) kultiviert werden, dienten in jeder Versuchsreihe jeweils Zellen mit 10 % FKS (+FKS) und ohne FKS (-FKS) als Vergleiche.

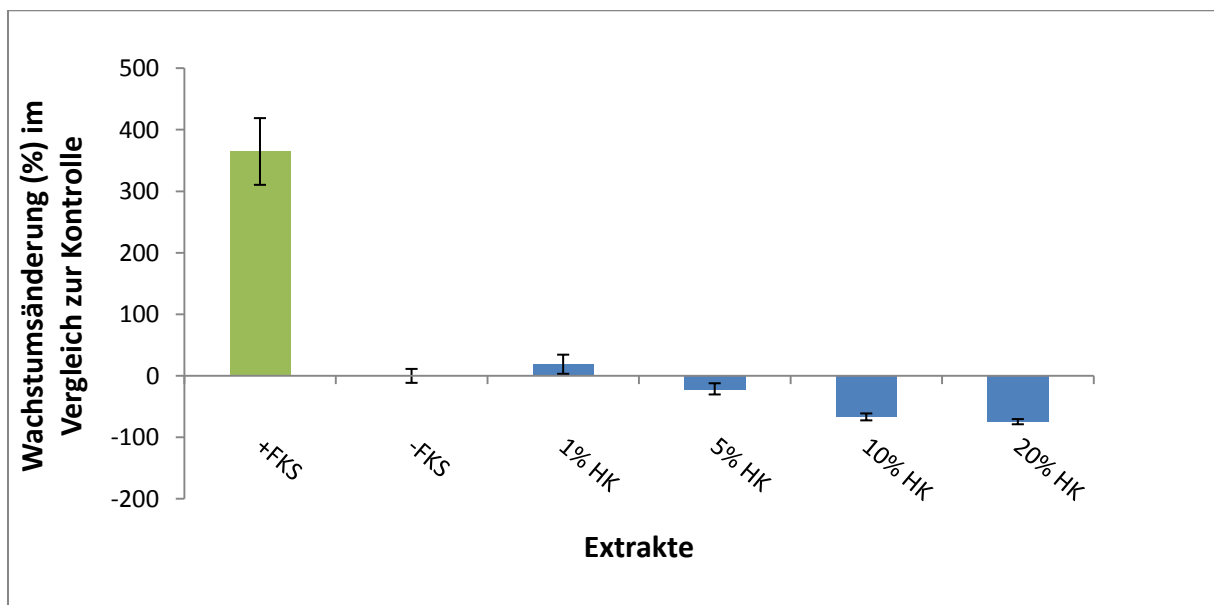


Abb. 4-1 Zellwachstum von CHO-Zellen aus dem Versuch der Studienarbeit [Klepko & Kaschubowski, 2010] in Abwesenheit und Gegenwart von FKS bzw. 1 – 20% Hokkaido-Kürbisextrakt.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (-FKS). Dazu wurde die Zellzahl der Kontrolle ($2,2 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 72 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS (-FKS, Kontrolle) kultiviert. In blau dargestellt sind die mit unterschiedlichen Konzentrationen des HK-Extrakts kultivierten Zellen, die Prozentwerte entsprechen der Konzentration des Extrakts im Medium.

In Abbildung 4-1 sind die Ergebnisse des Zellwachstums von CHO-Zellen aus der Studienarbeit [Klepko & Kaschubowski, 2010] in Abwesenheit und Gegenwart von FKS (-FKS, +FKS, grün) bzw. 1 – 20 % Hokkaido-Kürbisextrakt (blau) dargestellt. Die prozentuale Wachstumsänderung wurde im Vergleich zur Kontrolle (hier -FKS) dargestellt. Dazu wurde die Zahl der Kontrolle gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Lebendzellzahl mit steigender Extraktkonzentration abnimmt. Bei Extraktkonzentrationen von 5–20% befinden sich die Zellzahlen unterhalb der -FKS-Kontrolle, was bedeutet, dass das Zellwachstum durch den Extrakt gehemmt wurde bzw. dass Zellen teilweise abgestorben waren. Einen leicht positiven Effekt, verglichen mit der -FKS-Probe zeigt nur 1 % Extrakt mit einer um 18% höheren Zellzahl als die -FKS Kontrolle. Dieses ermutigende Ergebnis wurde in dieser Arbeit, mit etwas veränderten Parametern, reproduziert (Abb. 4-2). In dem Vergleichsexperiment erfolgte eine definierte Aussaat von 5×10^4 Zellen pro Well, die Adhäsionszeit von wurde 24 h auf 6 h verringert und die Kultivierungsdauer von 78 h auf 48 h reduziert. Dies ermöglichte mehrere Versuchsreihen pro Woche und gewährleistete gleichzeitig eine bessere Vergleichbarkeit der Versuche untereinander. Darüber hinaus wurde der zu untersuchende Konzentrationsbereich des HK-Extrakts von 1–20% auf 0,8–2% reduziert, da die hohen Extraktkonzentrationen zuvor einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum gezeigt hatten (siehe Abb. 4-1).

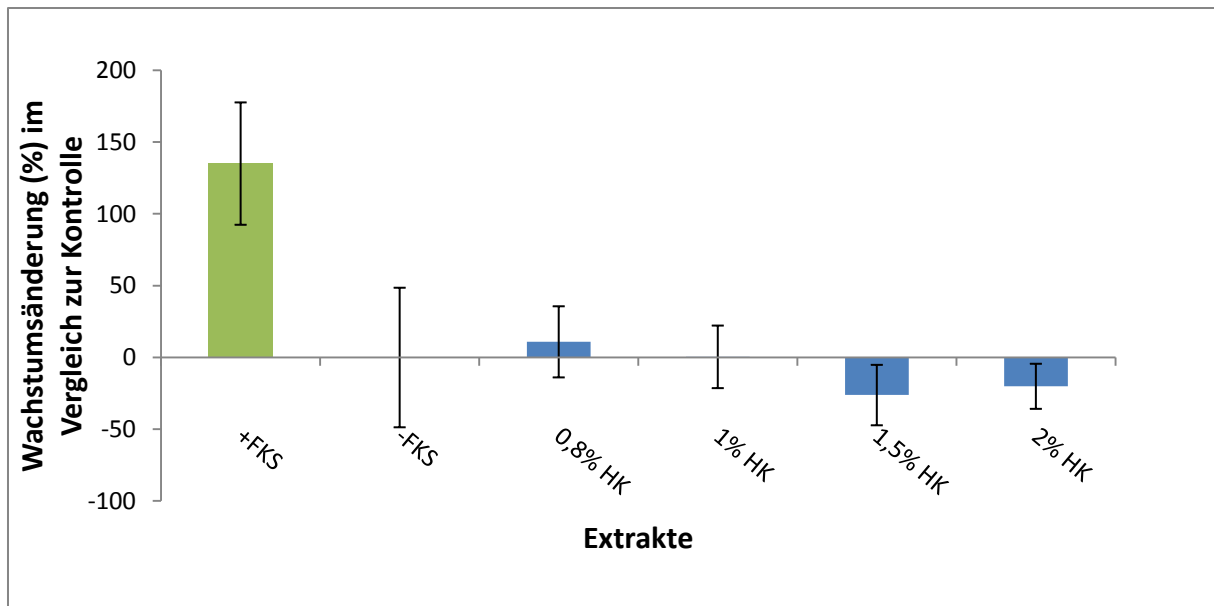


Abb. 4-2 Zellwachstum von CHO-Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von FKS bzw. 0,8 – 2% Hokkaido-Kürbisextrakt (HK).

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (-FKS). Dazu wurde die Zellzahl der Kontrolle ($8,5 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS (-FKS, Kontrolle) kultiviert. In blau dargestellt sind die mit unterschiedlichen Konzentrationen des HK-Extrakts kultivierten Zellen, die Prozentwerte entsprechen der Konzentration des Extrakts im Medium.

Abbildung 4-2 zeigt die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Vergleichszellzählung zu Abbildung 4-1. Wie bereits in Abbildung 4-1 beobachtet sinkt die Zellzahl mit steigender Extraktkonzentration. Den besten Effekt zeigt die 0,8%-ige HK-Extraktkonzentration. Die Zellzahl der Probe HK 0,8% ist um 11% grösser als die Zellzahl der Kontrolle -FKS. Dieses Ergebnis entspricht der Tendenz des im Studienprojekt durchgeführten Pilotexperiments (Abb. 4-1), das somit konnte gut reproduziert werden konnte.

Um diesen geringen positiven Effekt zu steigern, erfolgte im weiteren Verlauf eine Aufarbeitung des getesteten HK-Extrakts über eine Größenausschlusschromatographie (SEC, *Size Exclusion Chromatography*).

4.2 Kalibrierung der SEC-Säule

Das Ziel der SEC war die Auftrennung des HK-Extrakts in Fraktionen, um im Idealfall sich überlagernde inhibitorische und stimulierende Faktoren voneinander zu trennen, sodass ein erhöhtes Zellwachstum erreicht werden kann. Um eine Aussage über die Molekülgrößen in den Fraktionen des HK-Extrakts treffen zu können, musste zunächst eine Kalibrierung erfolgen.

Verwendet wurde, wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben, eine HiPrep™ Sephacryl™ S-200-Säule mit einem Trennbereich von 5 bis 250 kDa. Als mobile Phase wurde ein Puffersystem aus 20 mM HEPES, 150 mM NaCl Puffer und einem pH-Wert von 7,2 eingesetzt; die Flussrate betrug 0,5 mL/min.

Zunächst wurde eine Mischung von Standardproteinen wie Rinderserumalbumin (BSA, 68.000 Da), Cytochrom C (12.400 Da) und Vitamin B12 (1.350 Da) auf die Säule gegeben, um diese zu kalibrieren.

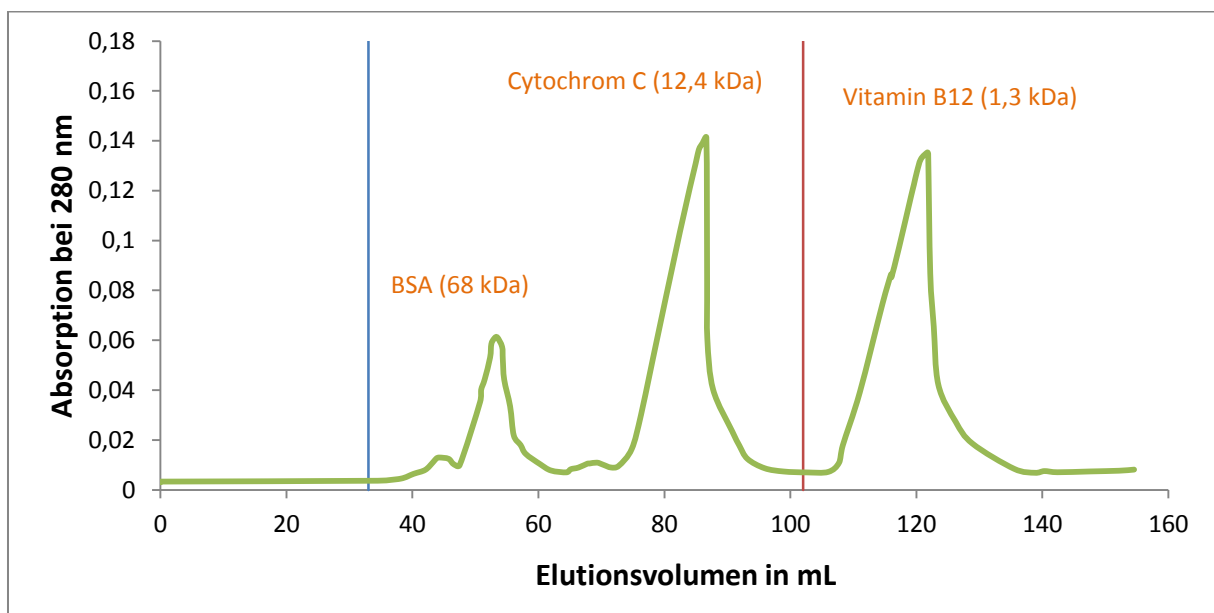


Abb. 4-3 Chromatogramm der SEC-Standardproteine.

SEC-Chromatogramm dreier Standardproteine BSA, Cytochrom C und Vitamin B12. Die Ordinate zeigt die UV-Absorption bei 280 nm an. Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen dargestellt. Die blaue senkrechte Linie markiert das Ausschlussvolumen V_0 der Säule und die rote senkrechte Linie gibt den niedrigsten Trennbereich (5 kDa) der Säule an.

Säule: HiPrep™ Sephacryl™ S-200
Mobile Phase: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2
Fließrate: 0,5 mL/min

In dem Bereich zwischen der blauen und roten senkrechten Linie der Abbildung 4-3 findet die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe statt. Nach dem niedrigsten Trennbereich ist die Separierung nach der Molekülgröße nicht eindeutig. Da sich der Peak von Vitamin B12 in diesem Bereich befindet, kann er nicht für die Kalibrierung verwendet werden. Der Arbeitsbereich V_p wird also durch zwei Punkte V_0 (32 mL) und den niedrigsten Trennbereich 5 kDa (102 mL) definiert. Diese beiden charakteristischen Punkte wurden in der Arbeit von Klaus Eric Kaschubowski (Bachelorarbeit, 2011) ermittelt und beschrieben. Anhand dieser zwei bekannten Punkte des Chromatogramms konnte unter Zuhilfenahme der Punkte der Standards BSA und Cytochrom C eine Kalibrierfunktion (Gl. 4-1, Abb. 4-4) erstellt werden. Mit Hilfe dieser Funktion lassen sich die molekularen Massen unbekannter Proteine in dem Arbeitsbereich bestimmen.

$$\text{molekulare Masse in kDa} = 1354,2 * e^{-0,055 * \text{Elutionsvolumen der Fraktion}}$$

Gl. 4-1

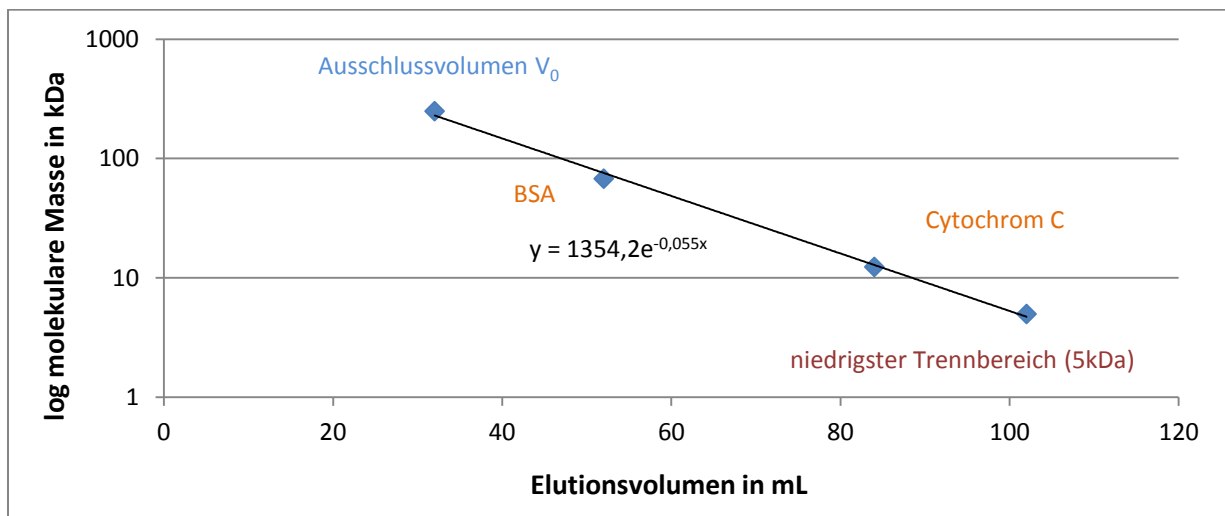


Abb. 4-4 Kalibrierungsgerade der HiPrep™ Sephacryl™ S-200-Säule.

Kalibrierungsgerade des SEC-Chromatogramms von Standardproteinen BSA und Cytochrom C. Die Ordinate zeigt die logarithmische Auftragung der molaren Massen in kDa, auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen dargestellt.

Säule: HiPrep™ Sephacryl™ S-200

Mobile Phase: 20 mM HEPES; 150 mM NaCl; pH 7,2

Fließrate: 0,5 mL/min

4.3 SEC des Kürbisextrakts

Nachdem die Ergebnisse der Studienarbeit zur Wachstumsstimulierung von Kürbisextrakten reproduziert werden konnten, erfolgte eine Aufreinigung des Kürbisextrakts durch eine SEC, um die verschiedenen Fraktionen an CHO-Zellen auf stimulierende Effekte hin zu untersuchen.

In Abbildung 4-5 ist das Chromatogramm des HK-Extrakts dargestellt. Die Basislinie stellte sich bei einer Absorption von 0,005 nm ein. Ab einem Elutionsvolumen von 35 mL wurde mit der Fraktionierung des Eluats begonnen, das Volumen der Fraktionen betrug 2 mL pro Probe und wurde bei einem Elutionsvolumen von 142 mL beendet. In der Abbildung 4-5 rot markierte Peakfraktionen wurden für Kultivierungsversuche verwendet, die restlichen Fraktionen wurden weggefroren.

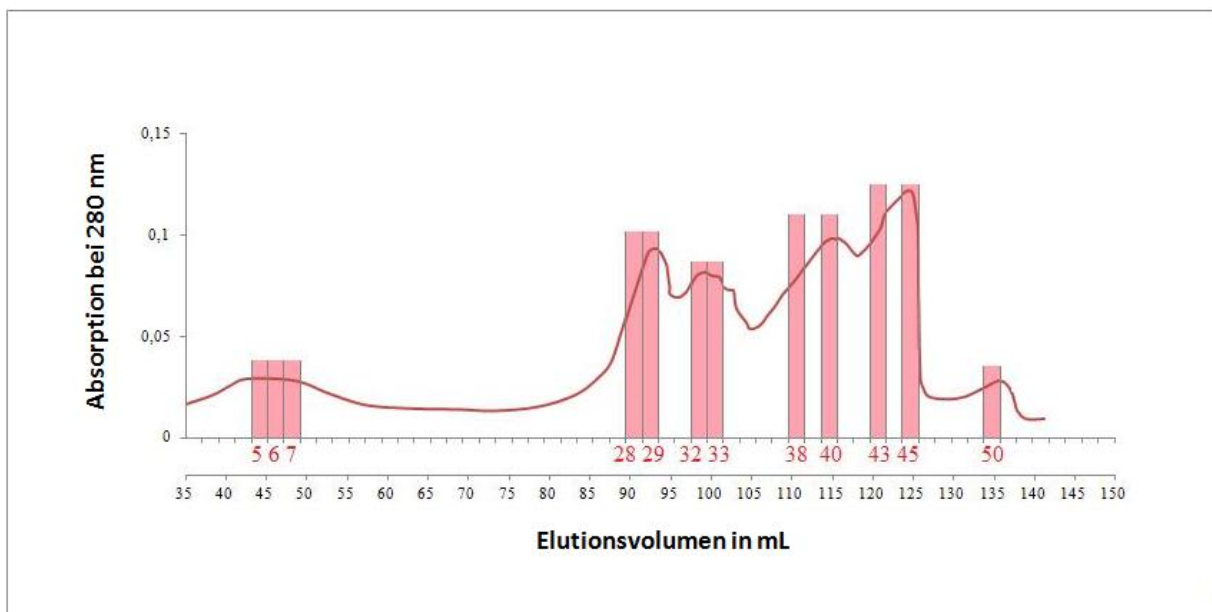


Abb. 4-5 SEC-Chromatogramm des HK-Extrakts der FPLC-Anlage.

Das SEC-Chromatogramm des HK-Extrakts unter den unten angegebenen Bedingungen. Die Ordinate zeigt die Absorption bei 280 nm an. Die untere Abszisse zeigt das Elutionsvolumen von Beginn der Fraktionierung an. Die obere Abszisse gibt die Fraktionsnummer der eluierten Proben an. Die roten Rechtecke markieren die für die Versuche verwendeten Fraktionsnummern.

Säule: HiPrep™ Sephacryl™ S-200

Mobile Phase: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2

Fließrate: 0,5 mL/min

Nach dem Ausschlussvolumen von 32 mL ist der erste Peak von schlechter Auflösung in Abb. 4-5 zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass sich mehrere Proteine unter diesem Peak verbergen könnten. Hierbei handelt es sich um hochmolekulare Proteine, deren molekulare Masse im Bereich von ca. 250 kDa (obere Ausschlussgrenze der Säule) bis 65 kDa liegt (Gl.

4-1, Abb. 4-3 und 4-4). Das molekulare Gewicht in den entnommenen Fraktionen 5-7 liegt bei ca. 110 kDa (Gl. 4-1). Der zweite Peak eluiert zwischen 90-94 mL und wurde in den Fraktionen 28-29 aufgefangen. Hierbei handelt es sich um Proteine oder Zellbestandteile die einem molekularen Gewicht von ca. 7,2 kDa bis 9,5 kDa entsprechen (Gl. 4-1). Zwischen 98-102 mL eluiert der dritte Peak, welcher in den Fraktionen 32-33 aufgefangen wurde. Er entspricht einem molekularen Gewicht von ca. von 5 kDa bis 6,2 kDa. Die darauffolgenden Peaks wurden schlecht aufgetrennt und liegen außerhalb des Kalibrierbereichs, da die Peaks nicht im Trennbereich liegen.

Bei einem Elutionsvolumen von 105-140 mL sind drei aufeinander folgende Peaks zu erkennen. Die hier eluierten Moleküle sind kleiner als die untere Trenngrenze von 5 kDa. Dabei kann es sich um Di-, Tri- oder Oligopeptide etc. oder andere niedermolekulare Substanzen handeln, die bei einer Wellenlänge von 280 nm eine Absorption aufweisen und somit durch den Detektor als Peak zu erkennen sind. Die drei Peaks bilden die Fraktionen 38, 40, 43, 45 und 50.

Nach der SEC des HK-Extrakts wurden die gesammelten Fraktionen sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C eingelagert, um anschließend für die Tests an den Zellkulturen verwendet zu werden.

4.3.1 Einfluss der Kürbisextrakt-Fraktionen auf das Zellwachstum von CHO-Zellen

Um den Effekt der in Abschnitt 4.2 beschriebenen Fraktionen auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden sie in einer Endkonzentration von 10% als Medienzusatz zu den Zellen gegeben und diese in 24-Well-Mikrotiterplatten für 48 h kultiviert. Für die Versuche wurden je 100 µL der Probe aus den Fraktionen mit 900 µL Basalmedium HAM's F-12 verdünnt. Durch das Fließmittel in der SEC wurde der Extrakt verdünnt, aus diesem Grund wurde die Probenkonzentration im Medium verglichen zu den Vorversuchen von 1% auf 10% erhöht.

In Abbildung 4-6 ist der Einfluss der Fraktionen auf das Zellwachstum von CHO-Zellen dargestellt. Um die Wachstumsunterschiede besser zu verdeutlichen, wurden die Werte auf die Gesamtzellzahl von -FKS (125.500 Zellen) normiert. Diese Negativkontrolle enthält 10% HEPES/NaCl-Puffer (Fließmittel der Säule) und entsprach hier einem normierten Wachstum von 100%. Zur besseren Vergleichbarkeit der Wachstumsänderung wurde dieser Wert von den normierten Zellzahlen der Proben subtrahiert. Die Kontrolle mit 10% HEPES/NaCl-Puffer nimmt also den Wert 0% an. Ist die Zellzahl größer als 0% handelt es sich um einen wachstumsfördernden Effekt. Ist die Zellzahl kleiner als 0% ist es ein inhibitorischer Effekt.

Der Fehler wurde, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, durch Standardabweichung und Fehlerfortpflanzung berechnet.

Betrachtet man die prozentuale Zellzahl von der +FKS-Probe, so war das Wachstum um 80 % grösser als das der Kontrollzellen mit 10% HEPES/NaCl-Puffer. Erreicht die prozentuale Zellzahl einer der Fraktionen diesen Wert, so wäre der Wachstumseffekt der Fraktion gleich dem Effekt des Fetalem Kälberserum, was dem Idealfall entsprechen würde.

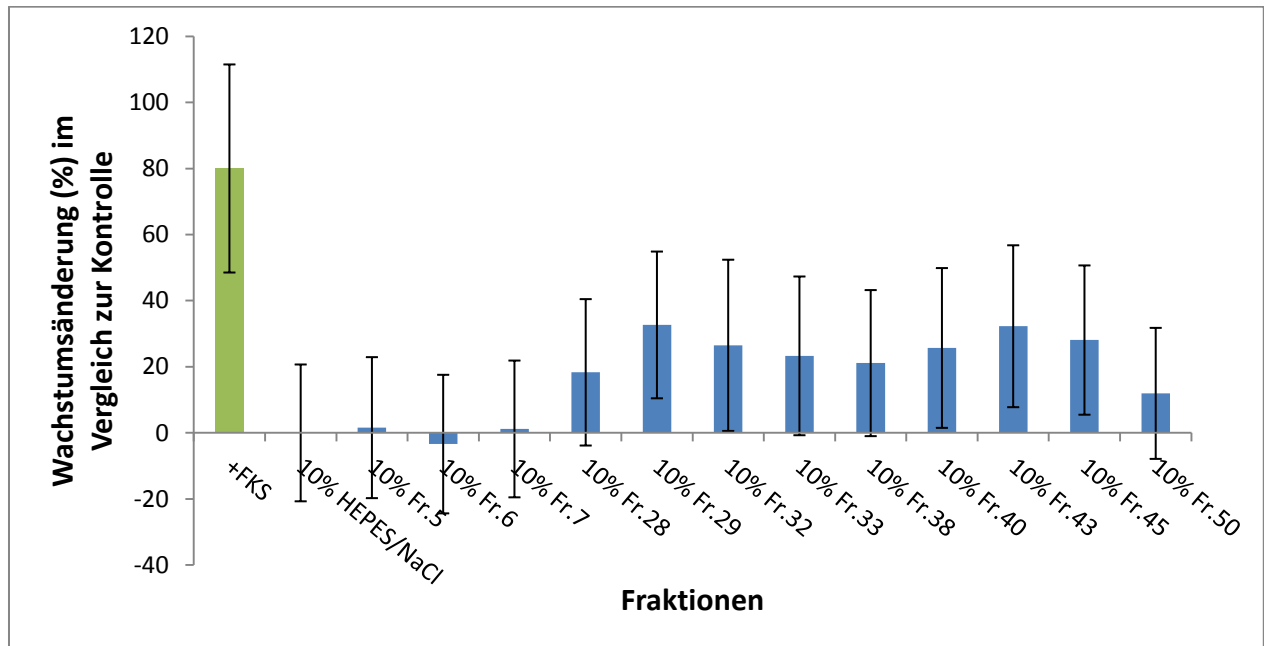


Abb. 4-6 Einfluss der Fraktionen aus der SEC des HK-Extrakts auf das Zellwachstum von CHO-Zellen.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (hier Pufferkontrolle 10% HEPES/NaCl). Dazu wurde die Zellzahl der Kontrolle ($12,5 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10% FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 10% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrolle) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr, blau) aus der SEC (Abb. 4-5). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

Vergleicht man die in Abb. 4-6 gezeigten Werte mit der Positivkontrolle (+FKS), erreichte keine der Proben eine annähernd mit +FKS vergleichbare Wachstumsstimulation. Die prozentualen Zellzahlen der Fraktionen 5, 6, 7 und 50 liegen nah an 0%, waren also ähnlich der 10% HEPES/NaCl-Puffer Kontrolle. Demzufolge zeigten die Substanzen dieser Fraktionen keine oder sehr geringe wachstumsstimulierende Effekte auf die CHO-Zellen, weshalb diese in den folgenden Versuchen nicht weiter verwendet wurden. Die für die Fraktionen 28, 29, 32, 33, 38, 40, 43 und 45 ermittelten Werte zeigten wachstumsfördernde Effekte. Insbesondere die Fraktionen 29, 32, 43 und 45 erreichten eine

Wachstumsverbesserung von ca. 25% gegenüber der Pufferkontrolle (10% HEPES/NaCl-Puffer), blieben jedoch deutlich schlechter als die Zellen deren Medium mit 10% FKS versetzt war, deren Zellzahl war um 80% besser als die Pufferkontrolle. Um zu untersuchen, ob die wachstumsfördernden Effekte der Fraktionen durch Aufkonzentrierung verbessert werden können, wurde der Hokkaido-Kürbisextrakt vor der SEC eingengt.

4.4 SEC des aufkonzentrierten Hokkaido-Kürbisextrakts

Der Hokkaido-Kürbisextrakt wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers dreifach aufkonzentriert. Die Aufkonzentrierung erfolgte, wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben, bei einer Temperatur von 32 °C um eine thermische Denaturierung der Substanzen zu verhindern. Dennoch kam es zu einem starken Ausflocken von wahrscheinlich Proteinen im Konzentrat, welche bei der Sterilfiltration entfernt wurden. Alle bisherigen Parameter für die SEC wurden beibehalten, um die Chromatogramme des aufkonzentrierten (blau) und des nicht aufkonzentrierten (rot, aus Abb. 4.5) HK-Extrakts vergleichen zu können (Abb.4-7).

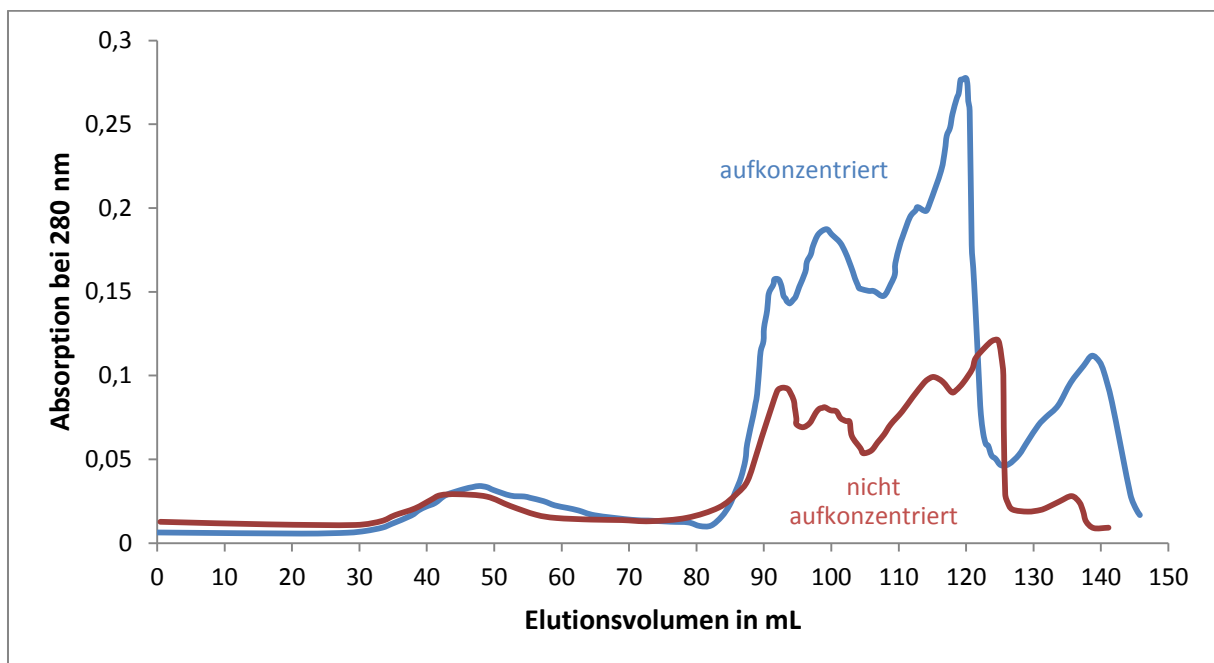


Abb. 4-7 SEC-Chromatogramm des aufkonzentrierten und des nicht aufkonzentrierten HK-Extrakts.

SEC-Chromatogramme des HK-Extrakts. Das rote Chromatogramm zeigt den nicht aufkonzentrierten HK-Extrakt aus Abb.4-5, das blaue Chromatogramm zeigt den aufkonzentrierten HK-Extrakt. Auf der Ordinate ist die Absorption bei 280 nm dargestellt. Die Abszisse gibt das Elutionsvolumen an.

Säule: HiPrep™ Sphacryl™ S-200

Mobile Phase: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2

Fließrate: 0,5 mL/min

Der grobe Verlauf der Chromatogramme ist ähnlich, jedoch sind die Peakhöhen der aufkonzentrierten Probe (blau) erwartungsgemäß deutlich höher. Daraus resultiert eine größere Peakfläche, was einer höheren Konzentration entspricht. Da der Pflanzenextrakt

dreifach aufkonzentriert wurde, sollte die Fläche des Chromatogramms von aufkonzentriertem HK-Extrakt um etwa das Dreifache steigen. Betrachtet man den ersten Peak bei ca. 45 mL, so erkennt man, dass die Flächen fast identisch sind, was an der starken Ausflockung im Konzentrat liegen könnte. Vergleicht man die Peakflächen der Peakgruppe, die im Bereich von 85 mL bis 128 mL eluiert, sind die des aufkonzentrierten Extrakts etwa doppelt so groß. Die Flächen des letzten Peaks (130 mL bis 145 mL) unterscheiden sich etwa um ein zehnfaches. Demzufolge findet die Einengung ungleichmäßig statt. Außerdem kann eine Verschiebung der Peakgruppe, die im Bereich von 110 mL bis 125 mL eluiert, beobachtet werden. Durch die Peakverschiebung musste das Fraktionsmuster für den Wachstumstest leicht geändert werden (Abb. 4-8). Die Fraktion 40 (nicht konzentriert) wurde durch Fraktion 39 (konzentriert) ersetzt, Fraktionen 43 und 45 wurden durch 41 und 42 ersetzt.

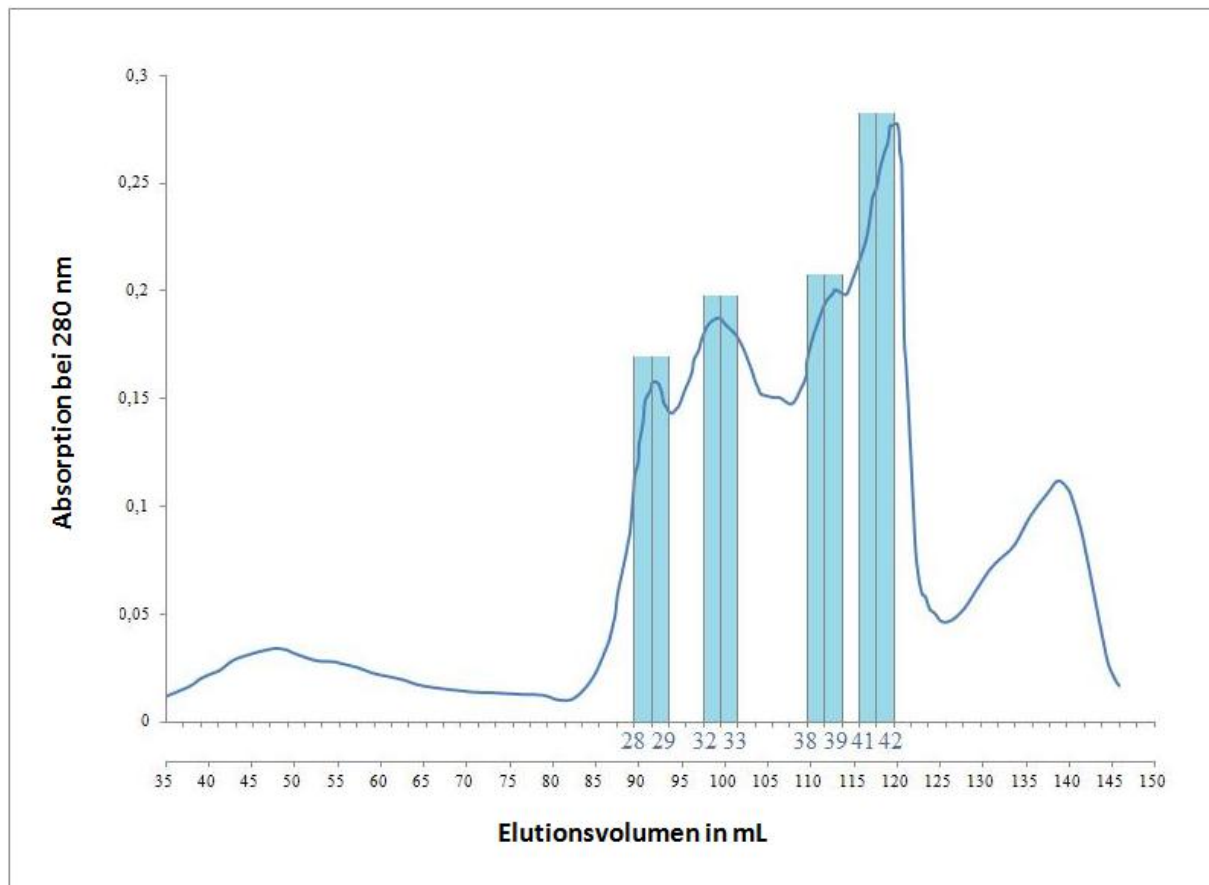


Abb. 4-8 SEC-Chromatogramm des aufkonzentrierten HK-Extrakts der FPLC-Anlage.

SEC-Chromatogramm von aufkonzentriertem HK-Extrakt. Die Ordinate zeigt die Absorption bei 280 nm. Die untere Abszisse gibt das Elutionsvolumen von Beginn der Fraktionierung an. In der oberen Abszisse sind die Fraktionsnummern der eluierten Proben markiert. Die blauen Rechtecke zeigen die für die Versuche verwendeten Fraktionen.

Säule: HiPrep™ Sephacryl™ S-200

Mobile Phase: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,2

Fließrate: 0,5 mL/min

Die durch die SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts gewonnenen Fraktionsproben wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.4.1 Einfluss der aufkonzentrierten Fraktionen auf das Zellwachstum von CHO-Zellen

In diesem Versuch wurde überprüft, ob die erhöhte Konzentration der Peakfraktionen zu einer Steigerung des Zellwachstums führt. Die Fraktionen des aufkonzentrierten HK-Extrakts wurden in zwei Konzentrationen, 5- und 10%ig, als Medienzusatz verwendet.

CHO-Zellen wurden mit den Fraktionsproben aus Abb. 4-8, wie zuvor beschrieben, für 48 h kultiviert, um deren Effekt auf das Zellwachstum zu untersuchen. In den Abbildungen 4-9 und 4-10 ist der Einfluss der Fraktionen auf das Zellwachstum von CHO-Zellen zu sehen. Die Werte wurden wieder auf die Gesamtzellzahl des jeweiligen Kontrollpuffes HEPES/NaCl (10%iger 129.000 Zellen und 5%iger 132.000 Zellen) auf 100% normiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Wachstumsänderung wurde dieser Wert von den normierten Zellzahlen der Proben subtrahiert. Die jeweiligen HEPES/NaCl-Kontrollen nehmen also den Wert 0% an.

Die normierten und subtrahierten prozentualen Zellzahlen der +FKS-Kontrollen der Abbildungen 4-9 und 4-10 sind mit 72,3% und 74,3% sehr ähnlich. Aus diesem Grund lassen sich die beiden Abbildungen direkt miteinander vergleichen. Die maximalen Zellzahlen der mit Fraktionen behandelten Zellen liegen bei 17% in Abbildung 4-9 (10%tiger Einsatz) und bei 39% in Abbildung 4-10 (5%iger Einsatz). Demzufolge hat bei 10%ger Verwendung der Fraktionen die Konzentrierung der Extrakte keine Wachstumsverbesserung gegenüber der nicht konzentrierten Extrakte erbracht (Vergleich Abb.4-9 mit 4-6; beide ca. 20% Steigerung). Wird die aufkonzentrierte Fraktion jedoch nur 5%ig eingesetzt, ist eine Steigerung auf den doppelten Wert (39%) zu beobachten. Durch die Aufkonzentrierung wurden inhibitorische Substanzen scheinbar angereichert, das Ziel, inhibierende Substanzen durch die Aufarbeitung zu entfernen, war demnach nicht erfolgreich. Auf der Grundlage dieser Erkenntnis erfolgte im weiteren Verlauf eine Titration der wachstumsfördernden Fraktionen.

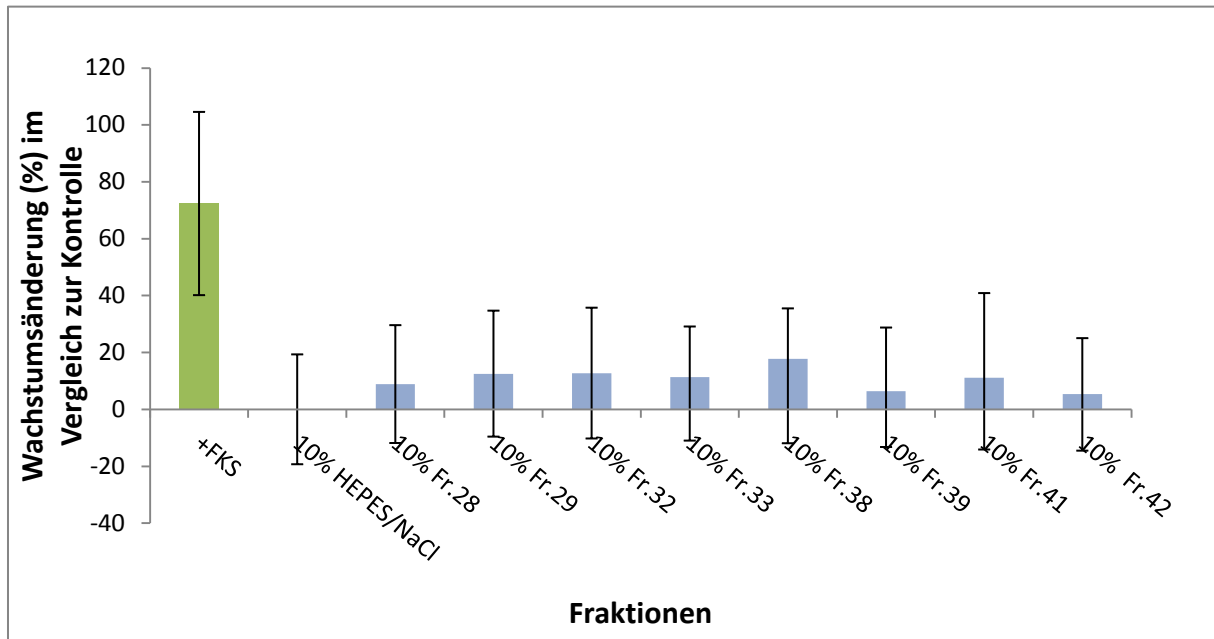


Abb. 4-9 Einfluss der Fraktionen aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts auf das Zellwachstum von CHO-Zellen bei einer Endkonzentration von 10% im Medium.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (hier Pufferkontrolle 10% HEPES/NaCl). Dazu wurde die Zellzahl der Kontrolle ($12,9 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 10% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrolle) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr, blau) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

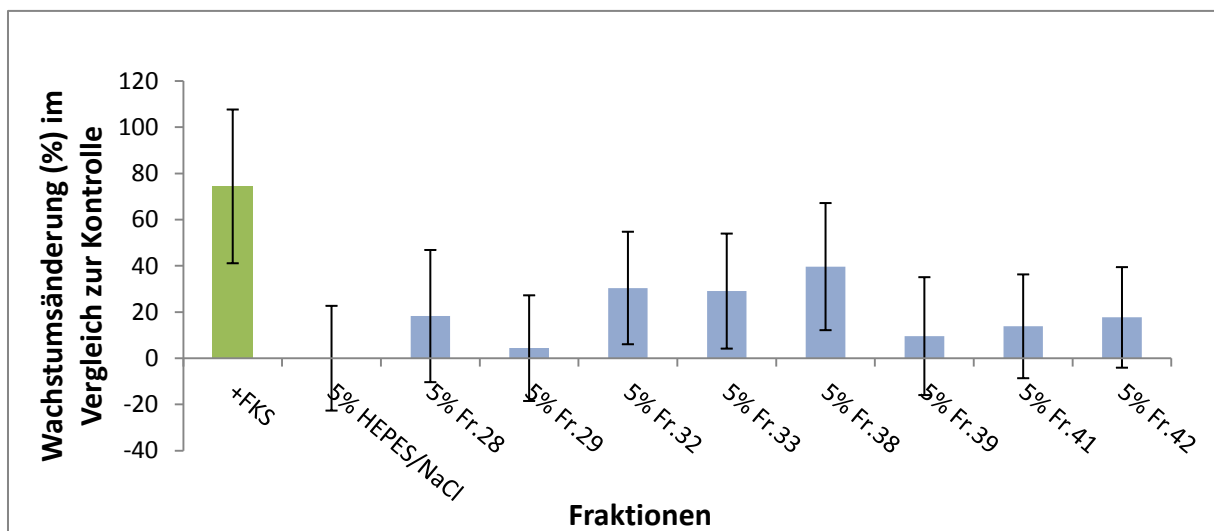


Abb. 4-10 Einfluss der Fraktionen aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts auf das Zellwachstum von CHO-Zellen bei einer Endkonzentration von 5% im Medium.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (hier Pufferkontrolle 5% HEPES/NaCl). Dazu wurde die Zellzahl der Kontrolle ($13,2 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 5% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrolle) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr, blau) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

4.4.2 Titration der wachstumsfördernden Fraktionen

In diesem Versuch wurden die in Abschnitt 4.4.1 untersuchten aktiven Fraktionen (28, 29, 32, 33, 38 und 39) in niedrigeren Konzentrationen von 1%, 2,5% und 5% im Medium näher auf ihre Wachstumsstimulation untersucht.

In Abbildung 4-11 ist die Titration der Fraktionen 28 und 29 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei Fraktion 28 die 1%ige Konzentration und bei Fraktion 29 die 2,5%ige Konzentration die höchsten Zellzahlen aufweisen, jedoch ist die Zellzahl bei Fraktion 28 wesentlich niedriger als bei Fraktion 29.

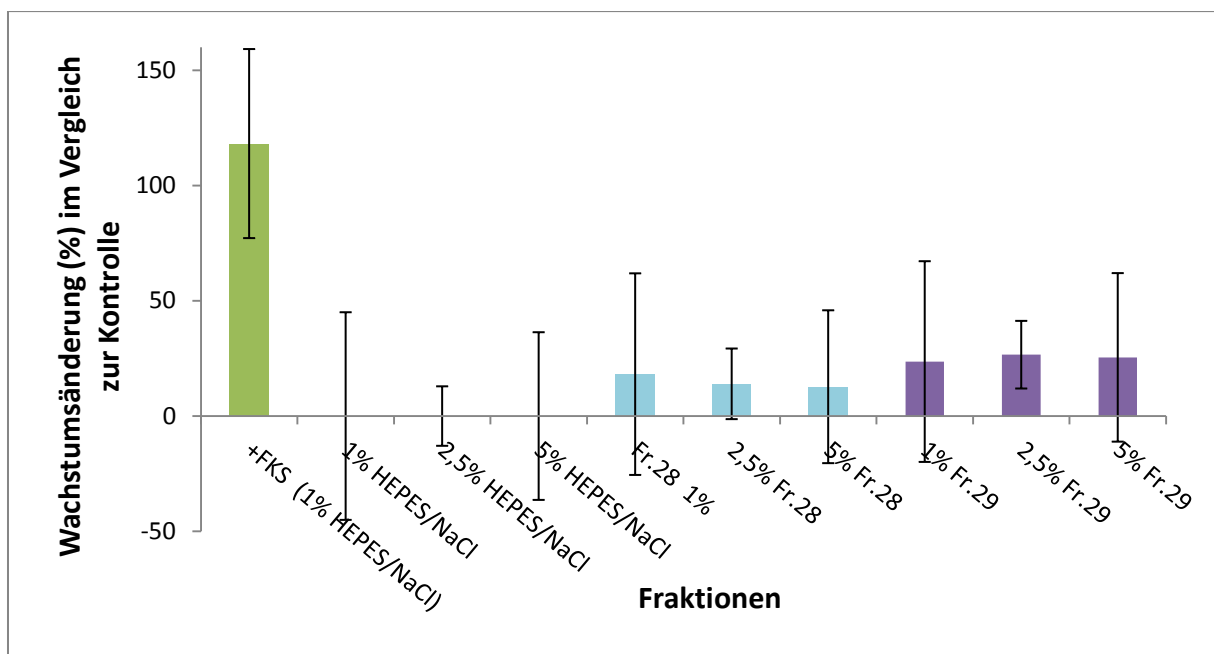


Abb. 4-11 Titrierung der Fraktionen 28 bis 29 aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (Pufferkontrollen 1%, 2,5% und 5% HEPES/NaCl). Dazu wurden die Zellzahlen der Kontrollen (1%ige $13,7 \times 10^4$ Zellen, 2,5%ige $15,5 \times 10^4$ Zellen und 5%ige $13,7 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die +FKS-Zellzahl wurde auf 1% HEPES/NaCl normiert und die Zahl 100 von ergebenden Prozentzahl abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 1%, 2,5% und 5% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrollen) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr.28 türkis, Fr.29 violett) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

Abbildung 4-12 zeigt die getesteten Fraktionen 32 und 33. Fraktion 32 weist bei 1%iger Konzentration und bei Fraktion 33 bei 5%iger Konzentration die höchsten Zellzahlen auf. Fraktion 33 weist hier bei 5%iger Konzentration den größten positiven Effekt auf das Zellwachstum auf.

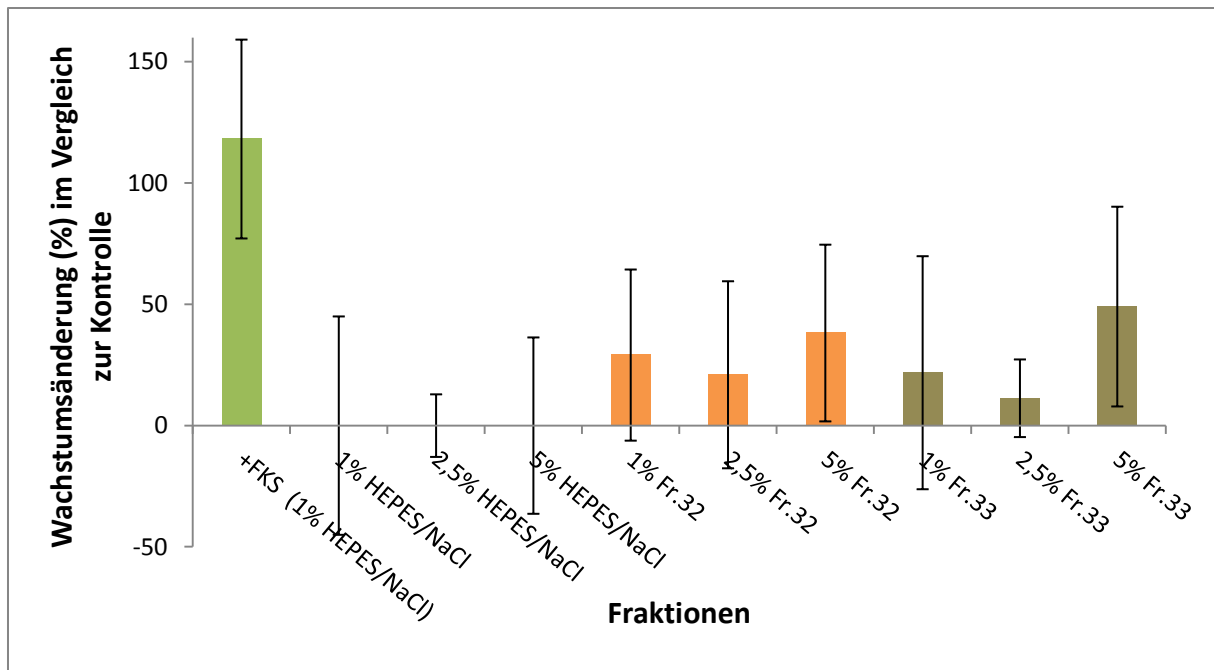


Abb. 4-12 Titrierung der Fraktionen 32 bis 33 aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (Pufferkontrollen 1%, 2,5% und 5% HEPES/NaCl). Dazu wurden die Zellzahlen der Kontrollen (1%ige $13,7 \times 10^4$ Zellen, 2,5%ige $15,5 \times 10^4$ Zellen und 5%ige $13,7 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die +FKS-Zellzahl wurde auf 1% HEPES/NaCl normiert und die Zahl 100 von ergebenden Prozentzahl abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 1%, 2,5% und 5% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrollen) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr.32 orange, Fr.33 olivgrün) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

Die Fraktionen 38 und 39 sind in Abbildung 4-13 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Konzentrationen mit dem besten Zellwachstum bei Fraktion 38 bei 2,5% und bei Fraktion 39 bei 5% liegt, wobei Fraktion 38 die höhere Zellzahl erzeugen konnte.

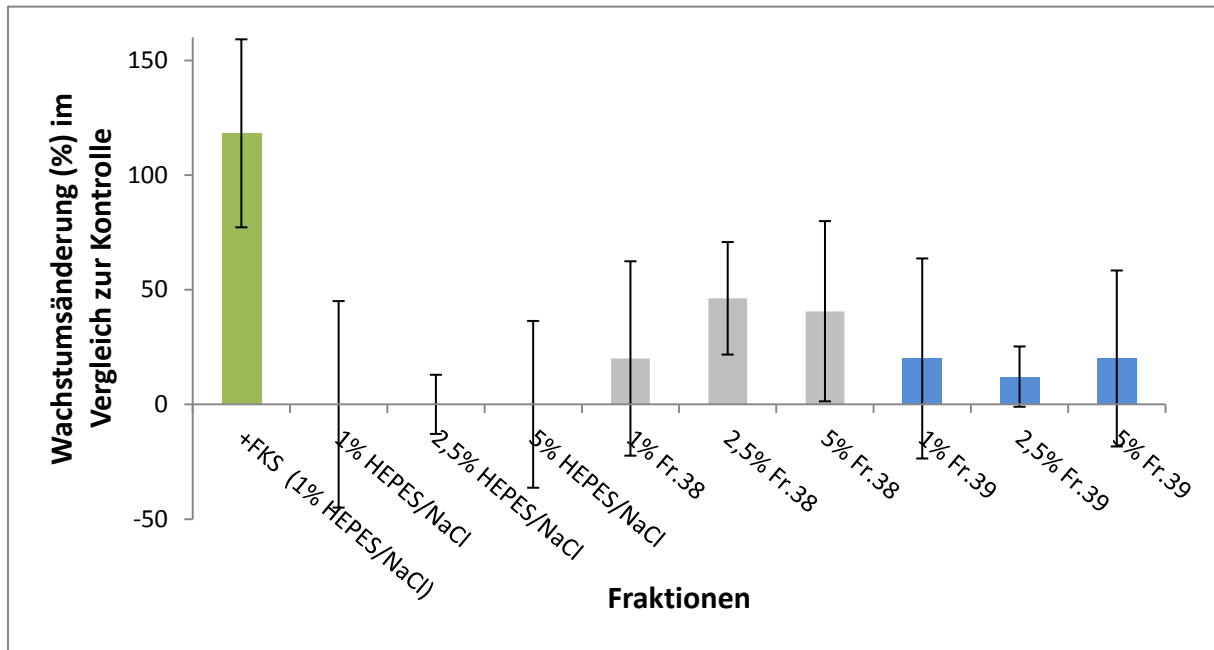


Abb. 4-13 Titrierung der Fraktionen 38 bis 39 aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (Pufferkontrollen 1%, 2,5% und 5% HEPES/NaCl). Dazu wurden die Zellzahlen der Kontrollen (1%ige $13,7 \times 10^4$ Zellen, 2,5%ige $15,5 \times 10^4$ Zellen und 5%ige $13,7 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die +FKS-Zellzahl wurde auf 1% HEPES/NaCl normiert und die Zahl 100 von ergebenden Prozentzahl abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 1%, 2,5% und 5% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrollen) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr.38 grau, Fr.39 blau) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

In Abbildung 4-14 sind die Fraktionen 41 und 42 dargestellt. Insgesamt zeigen alle anderen Fraktionen keinen signifikanten Wachstumseffekt auf die CHO-Zellen im Vergleich mit den Fraktionen (28, 29, 32, 33, 38 und 39). Aus diesem Grund wurden diese Fraktionen aus den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

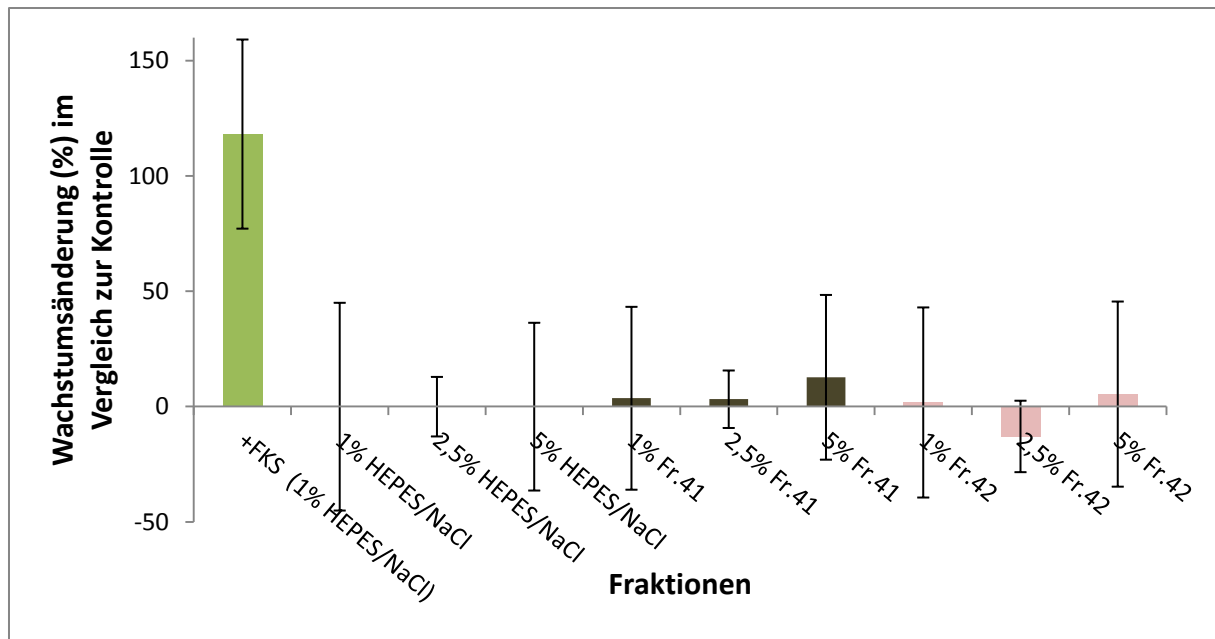


Abb. 4-14 Titrierung der Fraktionen 41 bis 42 aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (Pufferkontrollen 1%, 2,5% und 5% HEPES/NaCl). Dazu wurden die Zellzahlen der Kontrollen (1%ige $13,7 \times 10^4$ Zellen, 2,5%ige $15,5 \times 10^4$ Zellen und 5%ige $13,7 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die +FKS-Zellzahl wurde auf 1% HEPES/NaCl normiert und die Zahl 100 von ergebenden Prozentzahl abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 1%, 2,5% und 5% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrollen) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr.41 braun, Fr.42 rosa) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

Dieser Versuch ergab, dass die aufkonzentrierten Fraktionen 29 mit 2,5% ein Wachstum von 26,6% erzeugte, 2,5% der Fraktion 38 ein Wachstum von 46,2% und Fraktion 33 bei 1% ein Wachstum von 21,8% bewirken konnten. Eine Vereinigung stimulierender Fraktionen könnte eine weitere Steigerung des Zellwachstums ermöglichen.

4.4.3 Kombination der stimulierenden Fraktionen

Aufbauend auf den Ergebnissen der Titrationsversuche wurde als nächstes eine Vereinigung der wachstumsfördernden Fraktionen 29, 33 und 38 austestet. In diesem Experiment wurden alle Kombinationsmöglichkeiten aus den drei Fraktionen auf ihren Einfluss auf das Zellwachstum untersucht. Die Fraktionen wurden in den aus Abschnitt 4.4.2 hervorgegangenen wachstumsförderndsten Konzentrationen eingesetzt:

- Fraktion 29 mit 2,5%
- Fraktion 33 mit 5%
- Fraktion 38 mit 2,5%

In Abbildung 4-15 sind vier HEPES/NaCl-Kontrollen mit Konzentrationen von 2,5% bis 10% aufgetragen, um die passende Kontrolle für die verschiedenen kombinierten Fraktionen zu

bilden. Wie zuvor beschrieben, wurden die Werte normiert und die jeweilige HEPES/NaCl-Pufferkontrolle wurde vom normierten Wert subtrahiert. Aus Abbildung 4-15 geht hervor, dass die Zellzahlen der vereinigten Fraktionen in allen Fällen die der Einzelfraktionen überstiegen. Den größten Effekt zeigte die Vereinigung aller Fraktionen mit einer 54,4% größeren Zellzahl als die 10% HEPES/NaCl-Pufferkontrolle.

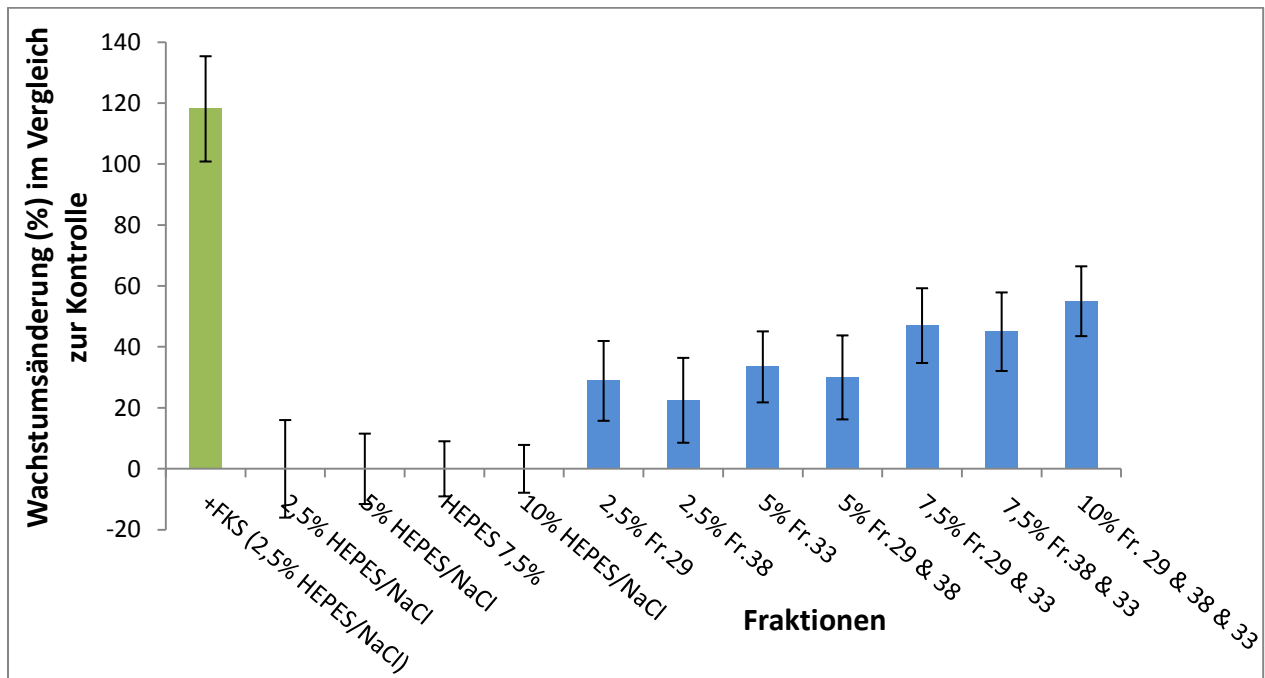


Abb. 4-15 Einfluss der stimulierende Fraktionen 29, 33 und 38 der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakt auf das Wachstum von CHO-Zellen.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (Pufferkontrollen 2,5%, 5%, 7,5% und 10% HEPES/NaCl). Dazu wurden die Zellzahlen der Kontrollen (2,5%ige $9,6 \times 10^4$ Zellen, 5%ige $9,2 \times 10^4$ Zellen, 7,5%ige $8,7 \times 10^4$ Zellen und 10%ige $8,7 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die +FKS-Zellzahl wurde auf 2,5% HEPES/NaCl normiert und die Zahl 100 von ergebenden Prozentzahl abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10% FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 2,5%, 5%, 7,5% und 10% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrollen) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr, blau) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

Um zu klären, ob sich die Wachstumsstimulation der einzelnen Fraktionen bei der Vereinigung einfach addieren, wurden die Kombinationen aus den Einzelmessungen der Fraktionen auch theoretisch berechnet. Abbildung 4-16 zeigt den Vergleich der theoretisch berechneten Summen (blau schraffiert) im Vergleich mit den experimentell ermittelten Zellzahlen (blau) der vereinigten Fraktionen 29, 33 und 38 (siehe Ergebnisse aus Abb. 4-15). In allen Fällen liegt die praktisch ermittelte Wachstumsstimulation unterhalb der theoretisch addierten Werte. Dies deutet darauf hin, dass sich stimulierende und inhibierende Substanzen

gegenseitig beeinflussen. Wie zuvor beobachtet, dominiert mit zunehmender Konzentration der inhibitorische Anteil (zunehmender Abstand von theoretischer und ermittelter Zellzahl).

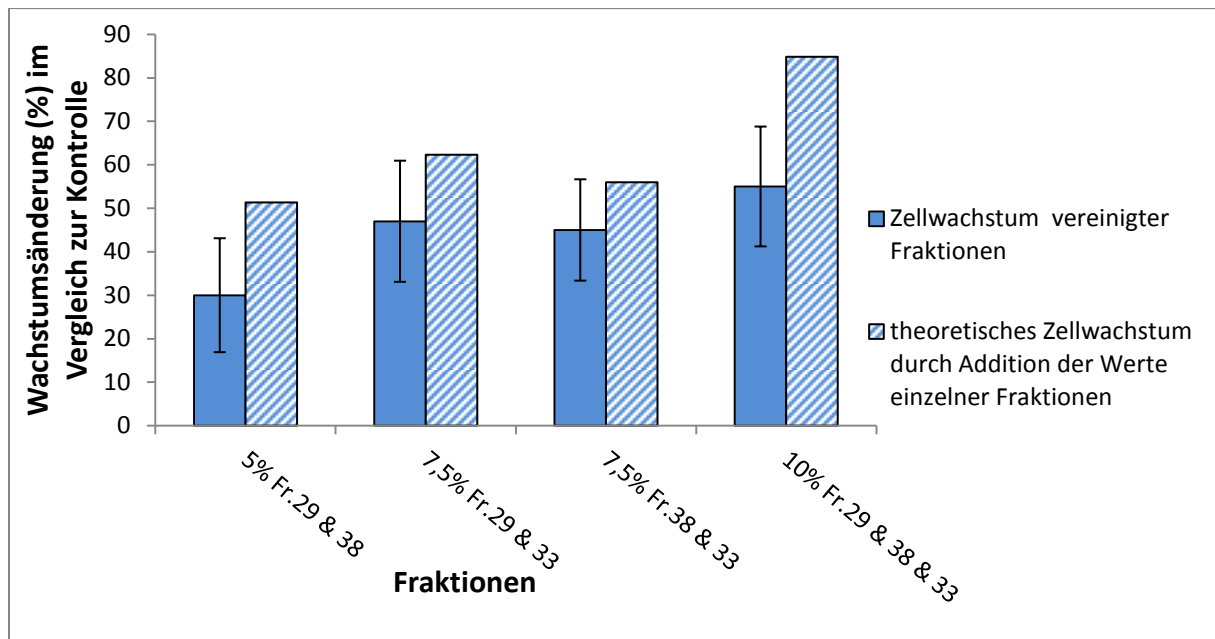


Abb. 4-16 Vergleich des Zellwachstums bei vereinigten Fraktionen mit den theoretisch berechneten Summen der Einzelfraktionen.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (Pufferkontrollen 2,5%, 5%, 7,5% und 10% HEPES/NaCl). Dazu wurden die Zellzahlen der Kontrollen (2,5%ige $9,6 \times 10^4$ Zellen, 5%ige $9,2 \times 10^4$ Zellen, 7,5%ige $8,7 \times 10^4$ Zellen und 10%ige $8,7 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die +FKS-Zellzahl wurde auf 2,5% HEPES/NaCl normiert und die Zahl 100 von ergebenden Prozentzahl abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10% FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 2,5%, 5%, 7,5% und 10% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrollen) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr, blau) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

4.4.4 Einfluss thermisch behandelter Fraktionen auf das Zellwachstum

In diesem Versuch wurde ermittelt, wie sich das Wachstum von CHO-Zellen verändert, wenn die Fraktionen vor der Verwendung als Medienzusatz zwei Minuten bei 90 °C erhitzt werden. Hiermit sollte die Frage geklärt werden, ob hitzeempfindliche Aktivitäten wie Proteine für die wachstumsfördernden Effekte der Fraktionen 29,33 und 38 verantwortlich waren. Die Molekulargewichte der Substanzen der Fraktionen 29 und 33 lagen laut Kalibrierung (siehe Abschnitt 4.2) zwischen 8,5 kDa und 5 kDa. Proteine werden bei 90 °C thermisch denaturiert, wobei eine Rückfaltung in den nativen Zustand eher unwahrscheinlich ist. Die Zellzahlen der Fraktionen 29, 33 und 38 der thermisch behandelten Proben (Abbildungen 4-17 und 4-18) unterscheiden sich von nicht thermisch behandelten Proben (Abbildungen 4-15 und 4-16).

Zusätzlich unterscheiden sich die Zellzahlen von kombinierten Fraktionen, jedoch geringfügiger.

Bei Fraktionen 33, 29 sind die Zellzahlen bei thermischer Behandlung um 6 % geringer als im Versuch ohne thermische Behandlung der Proben vor der SEC. In beiden Fraktionen sind demnach thermisch labile wachstumsstimulierende Substanzen enthalten. Zusätzlich ist die Zellzahl bei der thermisch behandelten Fraktion 38 um 8% größer als im Versuch ohne thermische Behandlung der Proben vor der SEC. In diesen Fraktionen werden inhibitorische Substanzen möglicherweise thermisch deaktiviert.

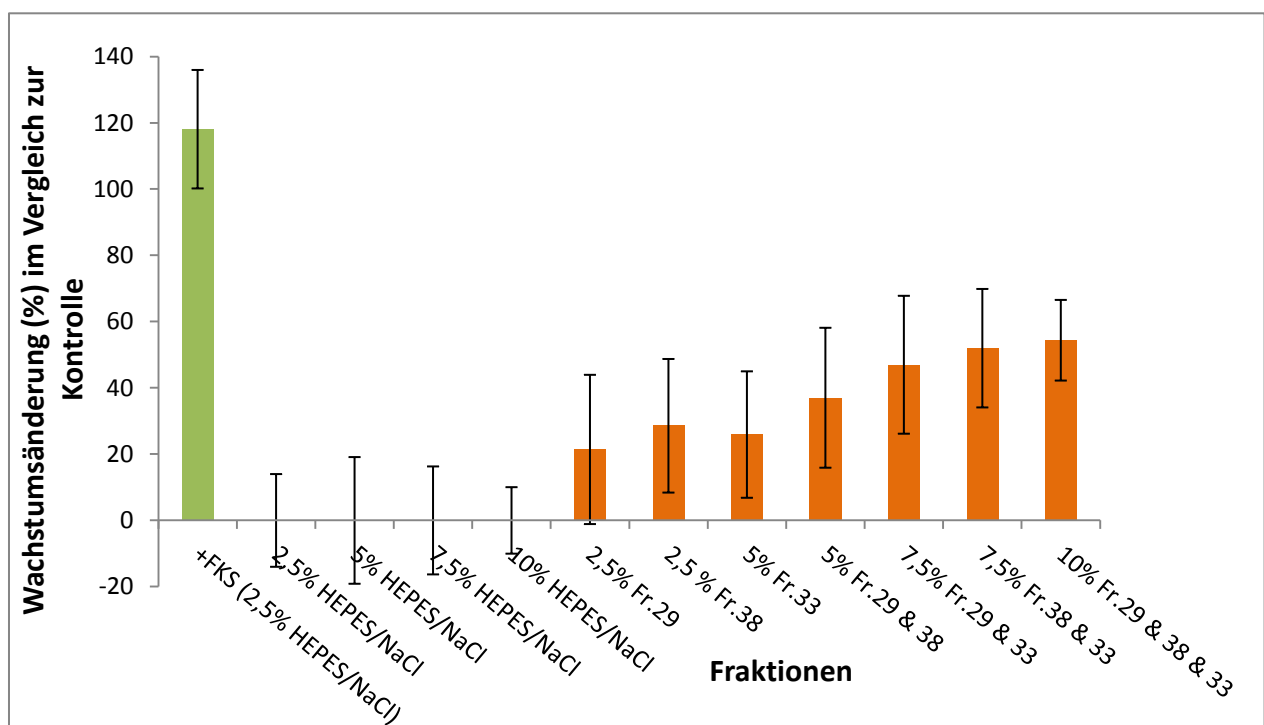


Abb. 4-17 Einfluss thermisch behandelter Fraktionen 29, 33 und 38 der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakt auf das Wachstum von CHO-Zellen.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (Pufferkontrollen 2,5%, 5%, 7,5% und 10% HEPES/NaCl). Dazu wurden die Zellzahlen der Kontrollen (2,5%ige $11,7 \times 10^4$ Zellen, 5%ige $11,3 \times 10^4$ Zellen, 7,5%ige $9,9 \times 10^4$ Zellen und 10%ige $8,6 \times 10^4$ Zellen) gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die +FKS-Zellzahl wurde auf 2,5% HEPES/NaCl normiert und die Zahl 100 von ergebenden Prozentzahl abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 2,5%, 5%, 7,5% und 10% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrollen) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr, orange) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

Abbildung 4-18 zeigt den Vergleich der theoretisch berechneten Werte (orange schraffiert) im Vergleich mit den experimentell ermittelten Zellzahlen (orange) der thermisch behandelten

vereinigten Fraktionen 29, 33 und 38 (siehe Ergebnisse aus Abb. 4-17). In zwei Fällen liegen, auch bei thermischer Behandlung für die Kombinationen 29 & 38 und 29 & 38 & 33 die praktisch ermittelten Wachstumsstimulationen unterhalb der theoretisch addierten Werte. Stimulierende und inhibierende Substanzen scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen. Die Zellzahlen aus Kombinationen 29 & 33 und 38 & 33 sind fast gleich der theoretisch addierten Werten.

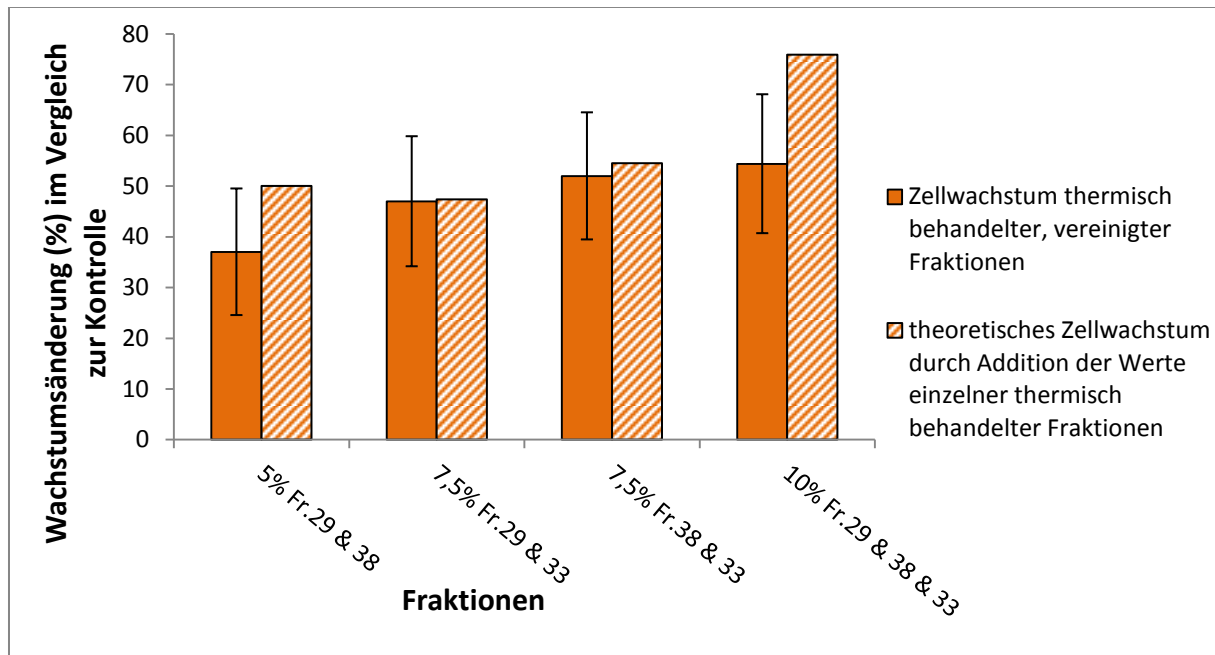


Abb. 4-18 Vergleich des Zellwachstums der vereinigten Fraktionen mit den theoretisch berechneten Summen der Einzelfraktionen bei thermischer Behandlung der Proben.

Die Ordinate zeigt die prozentuale Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (Pufferkontrollen 2,5%, 5%, 7,5% und 10% HEPES/NaCl). Dazu wurden die Zellzahlen der Kontrollen (2,5%ige $11,7 \times 10^4$ Zellen, 5%ige $11,3 \times 10^4$ Zellen, 7,5%ige $9,9 \times 10^4$ Zellen und 10%ige $8,6 \times 10^4$ Zellen) gleich 100 gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen. Die +FKS-Zellzahl wurde auf 2,5% HEPES/NaCl normiert und die Zahl 100 von ergebenden Prozentzahl abgezogen. Auf der Abszisse sind die getesteten Proben dargestellt. Die Zellen wurden in einer 24-Well-Mikrotiterplatte für 48 h kultiviert. Alle prozentualen Zellzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Zum Vergleich wurden CHO-Zellen mit 10 % FKS (+FKS, grün) bzw. ohne FKS mit 2,5%, 5%, 7,5% und 10% HEPES/NaCl-Puffer (Kontrollen) kultiviert. Zudem erfolgte die Kultivierung der Zellen mit unterschiedlichen Fraktionen (Fr, orange) aus der SEC (Abb. 4-8). Die Prozentwerte entsprechen der Konzentration der Proben im Medium.

4.5 Charakterisierung des Extraktes und der Fraktionen

4.5.1 SDS-PAGE des Extraktes und der Fraktionen

Um den Hokkaido-Kürbisextrakt näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Proben des Extrakts mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese, siehe Abschnitt 2.6.3) untersucht. Hierbei sollten die Proteinmuster der verschiedenen Aufarbeitungsschritte miteinander verglichen werden, um zu sehen, ob das Proteinmuster beständig bleibt. Nach dem Aufschluss, nach der Sterilfiltration und nach der Aufkonzentrierung wurden Proben

gleicher Volumina genommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Um einen möglichst großen Trennbereich im niedermolekularen Bereich zu erhalten, wurden, wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben, Gele mit 20% Acrylamid verwendet. Dies war wichtig, da die wachstumsfördernden Effekte bei Fraktionen mit geringen molekularen Massen beobachtet wurden (siehe Abschnitte 4.2-4.4). Um die Proteine und Peptide nach der Trennung im elektrischen Feld im Gel sichtbar zu machen, erfolgte eine Silberfärbung des SDS-Gels, die auch die notwendige Sensitivität lieferte. Die Ergebnisse der SDS-PAGE sind in Abbildung 4-19 dargestellt.

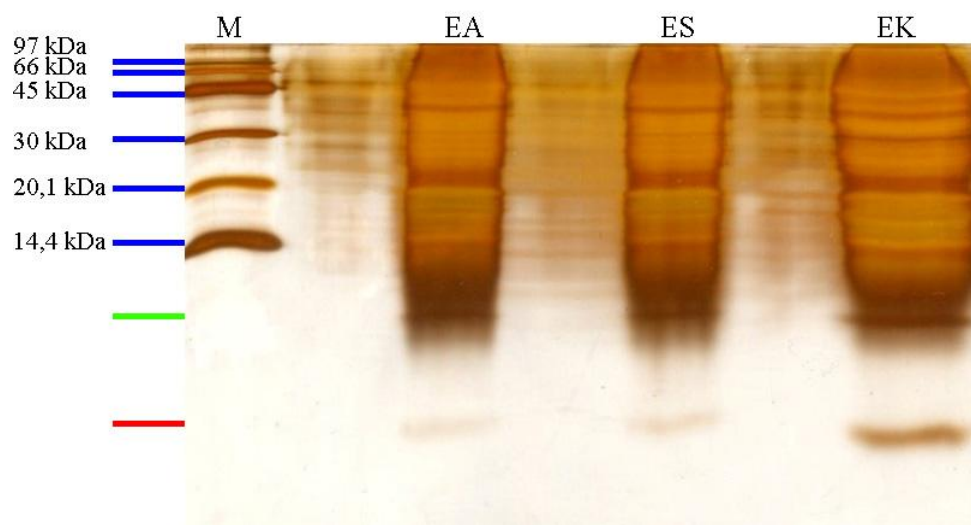


Abb. 4-19 SDS-PAGE und Silberfärbung des aufgeschlossenen (EA), sterilfiltrierten (ES) und aufkonzentrierten (EK) HK-Extraktes.

Die Abbildung zeigt die Trennung der Proteine des HK-Extraktes nach ihrer Größe in einem 20%-igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Silberfärbung. Die grün und rot markierten Banden sind die vorletzte und die letzte Bande der Probe. Blau dargestellt sind die Banden des Proteinmarkers.

Auf dem Gel (Abb.4-19) sind viele dicht beieinander liegende Banden zu erkennen. Die Größen einiger Proteine oder Peptide können nur grob geschätzt werden, da ihre Banden ober- oder unterhalb der Markerbanden liegen. Die grün markierte Bande wurde auf ca. 5-7 kDa und die rot markierte Bande auf ca. 1-2 kDa geschätzt. Betrachtet man die Proteinmuster der drei Proben, so erkennt man, dass der Extrakt nach dem Aufschluss und nach der Sterilfiltration ein indentisches Muster besitzen. Dies deutet darauf hin, dass durch die Sterilfiltration kaum Proteine verloren gehen. Wird das Muster des Extrakts nach der Aufkonzentrierung mit anderen Proben verglichen, so erkennt man, dass das Muster dem der anderen Proben gleicht, die Dicke der Banden jedoch zugenommen hat. Diese Beobachtung passt zu einer erfolgreichen Aufkonzentrierung des Extrakts.



Abb. 4-20 SDS-PAGE und Silberfärbung der SEC-Fractionen des aufkonzentrierten HK-Extraktes

Die Abbildung zeigt die Auftrennung der mittels SEC aufgereinigten Fractionen des HK-Extraktes in einem 20%-igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels Silberfärbung. Blau dargestellt sind die Banden des Proteinmarkers.

Auf dem silbergefärbten SDS-Gel (Abb. 4-20) sind nur die Banden des Proteinmarkers und der Fraktion 6 sichtbar. In den anderen Fractionen sind keine Proteine / Peptide angefärbt, wonach in den untersuchten Fractionen keine Proteine / Peptide detektiert werden konnten. Dieses Ergebnis konnte nicht durch die Proteinbestimmung nach Biuret bestätigt werden. Vermutlich war die Konzentration für diese Methode an Störsubstanzen wie Glucose (Tab. 2-8) zu hoch, um eine aussagekräftige Messung zu ermöglichen.

5 Diskussion

Zur effizienten *in vitro*-Kultivierung, d.h., für Wachstum, Proliferation und zellspezifische Differenzierung von eukaryotischen Zellen in Zellkulturgefäßen, ist der Zusatz von Serum zum Kulturmedium üblich. Am häufigsten wird dabei Fetales Kälberserum (FKS) verwendet. FKS ist aber ein undefinierter und für die meisten Zelllinien unphysiologischer Medienzusatz, dessen genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist. Die Qualität unterliegt außerdem starken Schwankungen [Gstraunthaler, 2003]. Zudem werden in der Bevölkerung massive ethische Bedenken bezüglich des möglichen Leidens der Rinderföten bei der Rohserumgewinnung geäußert [van der Valk *et al.*, 2010]. Als tierisches Produkt ist Serum außerdem eine potentielle Quelle für Kontaminationen mit Mikroorganismen, Viren und Pyrogenen, sodass insbesondere in der pharmazeutischen Industrie das Serum in der Zellkultur ersetzt werden muss. FKS kann nicht hitzesterilisiert werden, da wichtige Substanzen dadurch zerstört würden. Durch Sterilfiltration können jedoch nur Mikroorganismen entfernt werden, Viren und Pyrogene verbleiben in Serum.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als pflanzliche Alternative zu Serum ein Hokkaido-Kürbisextrakt (HK-Extrakt) mittels SEC aufgereinigt und die Fraktionen in verschiedenen Konzentrationen als Serumersatz getestet. Die Ergebnisse einer vorangegangenen Studienarbeit [Klepko & Kaschubowski, 2010], in der ein wachstumsstimulierender Effekt von Kürbisextrakt auf CHO-Zellen nachgewiesen wurde, konnten reproduziert werden. Dabei wurden die Versuchsbedingungen leicht verändert. Die Adhäsionsdauer nach der Aussaat in Anwesenheit von 10% FKS im Medium wurde von 24 Stunden auf 6 Stunden reduziert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Zellen zwar während der kritischen Adhäsionsphase mit ausreichend Kollagen, Fibronectin und Laminin versorgt sind, dass aber die Proliferation vor dem bevorstehenden Medienwechsel durch Serumfaktoren nicht unnötig stimuliert wird. Hierdurch lässt sich das relativ geringe Wachstum der Kontrollzellen ohne FKS und der Proben erklären, die keine wachstumsstimulierenden Substanzen enthalten. Des Weiteren wurden die CHO-Zellen in dieser Arbeit in definierter Zellzahl ausgesät um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, und wurden nicht, wie im Studienprojekt, nach einem fixen Faktor verdünnt und ausgesät. Außerdem wurde die Inkubationsdauer mit den Medienzusätzen von 72 Stunden auf 48 Stunden reduziert, damit Unterschiede im Wachstum mit Erreichen der Konfluenz nicht verloren gehen.

Um die Wachstumsänderung im Vergleich zur Kontrolle (-FKS) darstellen zu können, wurden die Zellzahlen der Kontrolle gleich 100% gesetzt und die Zahl 100 dann von allen sich ergebenden Prozentzahlen abgezogen.

Der für die Zellkulturversuche hergestellte HK-Extrakt wurde in Konzentrationen von 0,8-2% in serumfreien Grundmedium zu in den 24-Well-Mikrotiterplatten ausgesäten CHO-Zellen gegeben.

Die Ergebnisse der Zellzählung (Abb. 4-2) zeigten, dass die Zellzahl bei 0,8 %Extrakt zunächst zunimmt, dann aber mit steigender Extraktkonzentration wieder abnimmt. Dieses überraschende Ergebnis könnte an einer hohen Glucosekonzentration im Extrakt liegen, da es bei hoher Glucosekonzentration zu toxischen Lactat-Akkumulationen in den Zellen kommen kann [Lindl & Gstraunthaler, 2008 S. 89]. Im Extrakt könnten darüber hinaus inhibitorische Substanzen das Wachstum der Zellen stören, wie z.B. bakterielle Pyrogene und Toxine, auch wenn der Kürbis von Erde und Schale befreit wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen aus dem Studienprojekt überein. Gegenüber der -FKS-Kontrolle ließ sich auch der Wachstumseffekt reproduzieren, welcher in vielen Faktoren begründet sein kann. Der Hokkaido-Kürbis ist eine Gattung des Riesenkürbis (*Cucurbita maxima*). Der Kürbis ist ein orangeroter Speisekürbis mit einem Gewicht von etwa 1 bis 2 Kilogramm. 100 g von rohen Fruchtfleisch des Hokkaido-Kürbisses enthalten 1,69 g Eiweiß, 0,48 g Fett, 13,6 g Kohlenhydrate, 2,37 g Ballaststoffe, 1,18 g Mineralstoffe, 0,49 g Kalium, 3,74 mg Gesamt- β -Carotine, 34 μ g Vitamin B1, 67 μ g B2, 293 μ g B6 und 30 mg Vitamin C [Bognar, 2006]. Der HK-Extrakt enthält demnach viele bekannte Komponenten wie Vitamine, Spurenelemente, Kohlenhydrate, Aminosäuren, Fettsäuren und Lipide, welche auch in FKS enthalten sind. Aufgrund der Komplexität der Substanzen im Extrakt kann die Zellvermehrung ebenfalls durch unbekannte Wachstumsfaktoren hervorgerufen worden sein. Mit dem Ziel, die wachstumsstimulierenden Effekte von den inhibitorischen Substanzen separieren zu können, wurde der Extrakt mittels SEC in verschiedene Fraktionen aufgetrennt.

Es ist zu erwarten, dass Pflanzenextrakte in gleicher Weise wie tierisches FKS mit qualitativen und quantitativen Schwankungen behaftet sind. Durch eine Aufreinigung des pflanzlichen Extrakts könnten diese Schwankungen möglicherweise weitgehend reduziert werden. Eine Trennung nach bestimmten Stoffeigenschaften, wie der molekularen Masse, könnte im Idealfall wachstumsfördernde Substanzen von inhibierenden Stoffen trennen und definierte Konzentrationen im Zellkulturmedium könnten sich realisieren lassen.

Die Summe der im Extrakt enthaltenen Bestandteile ist sehr komplex, und eine aufwendige Aufreinigung in Einzelkomponenten würde sich finanziell sicherlich nicht lohnen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine grobe Trennung des Extrakts nach der molekularen Größe mittels SEC realisiert. In Abbildung 4-5 ist das Chromatogramm des HK-Extraktes zu sehen, welches mehrere Peaks aufweist. In diesen Peaks verbirgt sich jeweils eine Summe mehrerer Substanzen mit ähnlichem Molekulargewicht bzw. aufgrund von Interaktionen. Von jedem Peak wurden Fraktionen genommen, deren enthaltene molekulare Größen nach Gl. 4-3 bestimmt wurden. Die molekularen Gewichte in Fraktionen 5-7 lagen bei ca. 110 kDa, in Fraktionen 28-29 bei ca. 7,2 kDa bis 9,5 kDa und in Fraktionen 32-33 bei ca. 5 kDa bis 6,2 kDa. Die Peaks < 5 kDa wurden schlecht aufgetrennt, weshalb das Molekulargewicht von 5 kDa die obere Grenze der Kalibrierung bildete. Die Substanzen der Fraktionen 38, 40, 43, 45 und 50 besaßen ein geringeres Molekulargewicht als 5 kDa. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels einer Durchflussküvette bei 280 nm, da eine Absorption bei dieser Wellenlänge relativ spezifisch für Proteine und Peptide ist. Es wurde vermutet, dass die wachstumsfördernden Effekte von Proteinen und Peptiden hervorgerufen würden. Demzufolge wurden viele Fraktionen die keine Absorption bei 280 nm zeigten, nicht weiter auf ihren Einfluss auf das Zellwachstum untersucht. Sie könnten jedoch ebenfalls positiv auf das Wachstum der Zellen wirken. Darum sollten zukünftig alle Fraktionen unabhängig von der Absorption in einem Screeningverfahren getestet werden.

Die in Abbildung 4-5 markierten Fraktionen wurden den CHO-Zellen in einer Konzentration von 10% im Kulturmedium zugeführt. Da durch den eingesetzten Elutionspuffer HEPES/NaCl bei der SEC eine Verdünnung des Extraktes stattgefunden hatte, wurde die Konzentration von 0,8-2% aus den Vorversuchen auf 10% erhöht.

Die prozentualen Zellzahlen der untersuchten Fraktionen 5, 6, 7 und 50 (Abb. 4-6) liegen sehr nah an der Kontrolle die mit 10% HEPES/NaCl kultiviert wurden. Demzufolge besitzen die Substanzen dieser Fraktionen keinen oder nur einen sehr geringen wachstumsstimulierenden Effekt auf CHO-Zellen. Aus diesem Grund wurden diese Fraktionen in den weiteren Versuchen nicht näher untersucht. Die SDS-PAGE der Fraktion 6 (Abb. 4-20) zeigt Proteine mit molekularen Gewichten von 14-100 kDa. Die Kalibrierung ordnete der Fraktion eine Masse von ca. 105 kDa zu. Dies lässt darauf schließen, dass die Proteine Aggregate bilden, die bei der SDS-PAGE wieder separiert wurden.

Das prozentuale Zellwachstum der mit den Fraktionen 28, 29, 32, 33, 38, 40, 43 und 45 behandelten Zellen war gering. Die Substanzen der Fraktionen 29, 32, 43 und 45 erreichen

eine Wachstumsverbesserung von ca. 10%, verglichen mit der 10% HEPES/NaCl-Kontrolle. Um zu untersuchen, ob eine Verbesserung der Wachstumseffekte durch konzentrierte Fraktionen möglich war, wurde der Hokkaido-Kürbisextrakt mit Hilfe eines Rotationsverdampfers vor der SEC dreifach aufkonzentriert. Der Rotationsverdampfer wurde bei einer Temperatur von 32 °C betrieben, um eine thermische Denaturierung der Substanzen möglichst zu verhindern. Trotz der erwähnten Maßnahmen kam es zu einer starken Flockulation und Präzipitation im Konzentrat. Da die Einengung des Extraktes in einem 100 mL-Kolben durchgeführt wurde, vergrößerte sich die Oberfläche und somit die Phasengrenze zur Luft um ein Vielfaches, was die Wahrscheinlichkeit der Denaturierung von Proteinen stark erhöht. Zudem wird die Konzentration von Salzen im Extrakt durch das Einengen ca. um das Dreifache erhöht, da der Extrakt etwa auf ein Drittel des Anfangsvolumens reduziert wurde. Die Kohäsion der Wassermoleküle drängt die Proteine aus der Lösung, wodurch deren Fällung beschleunigt wird [Melander & Horváth, 1977]. Der dreifach eingengte Extrakt zeigte eine höhere Viskosität, was sich durch die Aufkonzentrierung der Kohlenhydrate im Extrakt erklären lässt, da der Hokkaido-Kürbis 13,6 g Kohlenhydrate pro 100 g Fruchtfleisch enthält.

Der eingengte HK-Extrakt wurde ebenfalls mittels SEC aufgereinigt (Abb. 4-8), wobei die vorherigen Parameter zwecks der Vergleichbarkeit der Versuche beibehalten wurden. Durch die dreifache Aufkonzentration war zu erwarten, dass die Peakfläche proportional um das Dreifache steigen würde, da die Fläche des Peaks der Konzentration der Substanzen entspricht. Bei der Betrachtung des ersten Peaks (Abb.4-7) erkennt man, dass die Flächen von aufkonzentriertem und nicht aufkonzentriertem Extrakt fast identisch sind. Dies könnte durch die starke Fällung der Proteine während des Verdampfens erklärt werden. Vergleicht man die Fläche der Peakgruppe von aufkonzentriertem HK-Extrakt die zwischen 85 mL und 128 mL eluiert, erkennt man ca. eine Verdopplung der Peakfläche. Wird die Fläche des letzten Peaks verglichen, so ist etwa eine Verzehnfachung der Peakfläche zu erkennen. Demzufolge findet die Einengung ungleichmäßig statt. Auch könnte die thermische Einwirkung während der Einengung zu chemischen Veränderungen geführt haben, die die Absorption erhöhen. Des Weiteren kann eine Verschiebung der Peakgruppe beobachtet werden, die zwischen 110 mL und 125 mL eluiert, was ein typisches Zeichen einer Stoffüberladung in der Säule ist [Meyer, 2006 S. 290]. Durch die Peakverschiebung musste das Fraktionsmuster leicht geändert werden (Abb. 4-8). Die Fraktion 40 wurde durch Fraktion 39 ersetzt und die Fraktionen 43 und 45 wurden durch die Fraktionen 41 und 42 ersetzt. Die Fraktionen wurden in den Konzentrationen 5% und 10% zu den Zellen gegeben, was in Abbildungen 4-9 und 4-10

dargestellt ist. Aus der Abbildung 4-9 ist zu erkennen, dass das maximale Zellwachstum durch die 10%ig eingesetzten Extraktfraktionen bei 17% liegt. Im Vergleich dazu liegt das maximale Zellwachstum durch die 5%ig eingesetzten Extraktfraktionen (Abb. 4-10) bei 39%. Demzufolge zeigte die Konzentrationsverdopplung der getesteten Fraktionen eine reduzierte Wachstumsstimulation, wie dies in ähnlicher Weise bei den Extrakten beobachtet wurde. Dies lässt darauf schließen, dass durch die Aufreinigung nicht alle inhibitorisch wirkenden Substanzen abgetrennt werden konnten, sie wurden eventuell sogar bei der Aufkonzentrierung erhöht. Einer dieser Inhibitoren könnten Kohlenhydrate sein, da Glucose osmotisch und Lactat-akkumulierend auf die Zellen wirkt [Lindl & Gstraunthaler, 2008]. Diese Erkenntnis führte zu einer Titration der bisher als wachstumsfördernd charakterisierten Fraktionen mit Konzentrationen von 1, 2, 5 und 5%. Die Ergebnisse der Titration (Abb. 4-11 bis 4-14) zeigten für die aufkonzentrierte Fraktion 29 mit einer Konzentration von 2,5% ein um 26,6% erhöhtes Wachstum gegenüber der -FKS-Kontrolle. Fraktion 38 wies bei einer Konzentration von 2,5% ein um 46,2% erhöhtes Zellwachstum und Fraktion 33 wuchs bei einer Konzentration von 5% um 49% besser als die Kontrolle (-FKS). Diese Konzentrationen zeigten den geringsten inhibitorischen Effekt und die größte Wachstumsstimulanz auf die Zellen. Im folgenden Versuch wurden die stimulierenden Fraktionen mit den zuvor als beste Konzentrationen ermittelten prozentualen Verhältnissen im Medium miteinander in allen möglichen Kombinationen addiert. Hierdurch wurde untersucht, ob die zuvor beobachteten Effekte einzelner Fraktionen sich direkt addieren. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Vereinigung der Fraktionen in allen Fällen zwar zu einem besseren Zellwachstum führt als die Einzelfraktionen (Abb. 4-15), dass die Werte aber nicht das durch die Addition thermische Wachstum erreichen (Abb. 4-16). Es scheint, dass die Fraktionen nur bis zu einem bestimmten Grad stimuliert wirken, dass darüber hinaus andere Faktoren zusätzlich das Wachstum limitieren. Hierbei könnte es sich um tierische Hormone, Wachstumsfaktoren oder Cytokine handeln. Eines der wichtigsten Hormone ist Insulin, da es für den Transport von Glucose aus dem Medium in das Zellinnere zuständig ist [Reaven, 1988]. Häufig wird in serumfreien Medien ITS, eine Mischung aus Insulin, Transferrin und Selen, zugegeben [Kisiday *et al.*, 2005 S. 141-151]. Um die wachstumsfördernden Effekte der HK-Fraktionen weiter zu untersuchen, würde sich die Zugabe von ITS anbieten. Einen weiteren Ansatz bieten Thrombozytenextrakte, welche bei der Zugabe bekanntlich eine wachstumsfördernde und mitogene Wirkung zeigen. Thrombozyten setzen Faktoren, wie PDGF, FGF, TGF- β , VEGF, etc. frei [Rauch *et al.*, 2007]. Diese könnten ebenfalls einen ähnlichen Effekt auf das

Zellwachstum haben, wie FKS und hier helfen, die beobachtete Wachstumslimitierung aufzuheben.

Im nächsten Versuch wurden die Fraktionen zwei Minuten auf 90 °C erhitzt. Ziel dieses Versuchs war zu untersuchen, ob hitzeempfindliche Faktoren wie Proteine die wachstumsfördernden Effekte der Fraktionen 29 und 33 verursachen, deren molekulare Masse im Bereich zwischen 5 kDa und 8,5 kDa liegen. Proteine werden in der Regel bei 90 °C thermisch denaturiert, wobei es eher unwahrscheinlich ist, dass die Proteine sich anschließend wieder in den nativen Zustand zurückfalten. Die Ergebnisse aus diesem Versuch (Vgl. Abb. 4-17 mit Abb.4-15) zeigten Wachstumsinhibierung der Fraktionen 29 und 33 um ca. 6% und Wachstumsstimulierung der Fraktion 38 um ca. 8 %. Die Zellzahlen von kombinierten Fraktionen nach Aufkochen waren leicht verbessert. Dies könnte durch gleichzeitige Zerstörung inhibitorischer Faktoren und hitzeempfindlicher Stimulatoren zu erklären sein.

Die Frage, welche Substanzen der HK-Fraktionen die Effekte verursachen, bleibt offen. Näherliegend ist, dass ein positiver Effekt auf das Wachstum an Proteinen und Peptiden liegt. Demzufolge wurde in der Aufreinigung eine Absorption von 280 nm zur Detektion der Fraktionen verwendet, welche weitgehend spezifisch für die meisten Proteine ist. Eine SDS-PAGE der positiv getesteten Fraktionen zeigte jedoch, dass weder Proteine noch Polypeptide detektiert werden konnten. Dies ist widersprüchlich zu der deutlichen Absorption bei 280 nm in dem Chromatogramm und legt die Vermutung nahe, dass sich andere Substanzen hinter den Peaks verbergen, die möglicherweise auch eine Absorption bei 280 nm besitzen. Denkbar wären Nucleotide, DNA-Fragmente und Polyphenole, die bei Pflanzen vorkommen. Die Identifikation der aktiven Substanzen müsste mit anderen analytischen Methoden durchgeführt werden, wie z.B. der Massenspektrometrie. Die HK-Fraktionen eignen sich in der vorherliegenden Form noch nicht als serumfreie Medienzusätze für die Kultivierung der CHO-Zellen. Die Wachstumseffekte der Fraktionen sind im Vergleich zum serumhaltigen Medium zu gering.

6 Zusammenfassung

Die Verwendung von wachstumsförderndem fetalen Kälberserum in der Zell- und Gewebekultur birgt eine Reihe von Nachteilen in sich. Seren können Viren und Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze, sowie unerwünschte Substanzen wie Toxine und infektiöse Prionen enthalten. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung einzelner Serumchargen kann schwanken, da sie von verschiedenen Faktoren wie dem Ernährungs- und Gesundheitszustand der Tiere abhängig ist. Insbesondere ist die Serumgewinnung ethisch bedenklich, da für die Herstellung von Serum das Blut von Rinderföten benötigt wird.

Als Alternative zu tierischem Serum hätten pflanzliche Extrakte ein prinzipiell deutlich geringeres biologisches Risiko. Zusätzlich wäre die Extraktgewinnung aus Pflanzen ethisch unproblematisch. Die pflanzlichen Extrakte könnten kostengünstiger produziert werden als Rohserum aus Rinderföten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein Hokkaido-Kürbisextrakt mittels Größenausschlusschromatographie aufgereinigt und die Fraktionen in verschiedenen Konzentrationen als Alternative für fetales Kälberserum auf das Wachstum von CHO-Zellen getestet.

Nach Herstellung des Kürbisextraktes konnte ein um etwa 10% erhöhter wachstumsfördernder Effekt auf CHO-Zellen gegenüber serumfreien Medium festgestellt werden. Die Titration des Extraktes zeigte eine Überlagerung der stimulierenden Effekte durch inhibitorische Aktivität bei höheren Konzentrationen. Daraufhin wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, zur selektiven Anreicherung der wachstumsfördernden Faktoren, was in der Tat zu einer geringfügigen Verbesserung der Qualität führte. Erst die vorherige Aufkonzentrierung des Extraktes und anschließende Größenausschlusschromatographie führten zu einer weiteren Steigerung des Effekts. Durch die Kombination einzelner Fraktionen konnte ein um bis zu 50% gesteigertes Wachstum, im Vergleich zur serumfreien Kontrolle festgestellt werden. Weitere Steigerungen waren nicht möglich, wahrscheinlich aufgrund anderer limitierender Medienbestandteile. Die unbekannt stimuliert wirksamen Faktoren im Kürbisextrakt, stellten sich als bedingt hitzeempfindlich heraus. Die Hokkaido-Kürbis-Fraktionen eignen sich in der vorherliegenden Form noch nicht als serumfreie Medienzusätze für die Kultivierung der CHO-Zellen. Die Wachstumseffekte der Fraktionen sind im Vergleich zum serumhaltigen Medium zu gering.

7 Literaturverzeichnis

Dormont, D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathy agents and animal sera. *Dev. Biol. Stand.* 99, 25-34.

Boxberger, H. J. (2007). Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur (1. Ausg.). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Bognar, A. (2006). Nährwert- und Vitamingehalte ausgewählter Winterkürbissorten. *Ernährungs-Umschau* 53. Heft 8.

Chmiel, H. (2006). Bioprozesstechnik, Spektrum Akademischer Verlag, München.

Chodorowska, G., Glowacka, A., Tomczyk, M, (2004). Leukemia inhibitory factor (LIF) and its biological activity. *Ann. Univ. Mariae. Curie Sklodowska Med.* 59.

Friedler, S., Giudice, L. C., Lamb, E. J. (1988). Cryopreservation of embryos and oocytes. *Fertil. Steril.* 49: 743-764.

Grahn, W. und Follmann, H. (1999). Chemie für Biologen: Praktikum und Theorie. (2. Ausg.). Stuttgart : Teubner Studienbücher: Chemie.

Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: Serum-free cell culture. *ALTEX* 20: 275-281.

Horton, H. R. Moran, L.A. Scrimgeour, K. G. Rawn, J. D. Perry, M. D. (2008). Biochemie. München : Pearson Studium.

Jelkmann, W. und Krämer, I. (2008). Rekombinante Arzneimittel - medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Kisiday, J. D., Kurz, B., DiMicco, M. A., Grodzinsky, A. J. (2005). Evaluation of medium supplemented with insulin-transferrin-selenium for culture of primary bovine calf chondrocytes in three-dimensional hydrogel scaffolds. *Tissue Engineering* (11).

Klepko, I. und Kaschubowski, K. E. (2010). Suche nach pflanzlichem Serumersatz für CHO-Zellen. Studienprojekt, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

Lindl, T. und Gstraunthaler, G. (2008). Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank (6. Ausg.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Löffler, G. Petrides, P. E. Heinrich, P. C. (2006). Biochemie und Pathobiochemie (8. Ausg.) Springer Verlag.

Lottspeich, F und Engels, J.W. (2006). Bioanalytik (2. Ausg.). Spektrum Akademischer Verlag.

Melander, W. und Horváth, C. (1977). Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Arch. Biochem. Biophys.* 183: 200-215.

Merten, O.-W. (2002). Virus contamination of cell cultures - a biotechnological view. *Cytotechnology.* 39: 91-116.

Meyer, V. R. (2004). Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (9. Ausg.). Weinheim: WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA.

Minuth, W. W., Strehl, R., Schumacher, K. (2003). Zukunftstechnologie Tissue Engineering: von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Weinheim : Wiley-VCH.

Neumann, J. (2005). Skript: Kurs Immunbiologie. Universität Bonn : s.n.

Rauch, C., Feifel, E., Schöffl, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G. (2007). Alternatives to the use of fetal bovine serum: Platelet lysates as serum replacement in cell and tissue culture. ALTEX 24(4): 353.

Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. Banting Lecture. 37: 1595-607.

Schmitz, S. (2009). Der Experimentator: Zellkultur (2. Ausg.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Urlaub, G. und Chasin, L.A. (1980). Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 77: 4216-4220.

van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M.L., Gstraunthaler, G. (1993). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. Toxicol. in Vitro 24: 1053-1063.

• **Internetseiten**

Biochrom AG. Zitat vom 20. 10 2011. http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/produktinformation/deutsch/BC_Katalog_47_F12.pdf.

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Zitat vom 14. 10 2011. http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2010-TierversuchszahlenGesamt.pdf?__blob=publicationFile.

Focus on alternatives. Zitat vom 12. 11 2011. <http://focusonalternatives.org.uk/>.

Invitrogen. Zitat vom 12. 10 2011. http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/applications/cell_culture/entry.Par.11287.Image.-1.-1.1.gif.

Invitrogen. Zitat vom 12. 10 2011. http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/applications/cell_culture/entry.Par.86681.Image.-1.-1.1.gif.

Roth. Zitat vom 09. 10 2011. http://www.carlroth.de/media/_de-de/usage/0120.pdf.

Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen. Zitat vom 12. 11. 2011. <http://www.zet.or.at/>.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1 Countess® Cell Counter Bildauswertung	21
Abb. 2-2 Normalverteilung der Zellgrößen.....	21
Abb. 2-3 FPLC-Anlage im Labor für Molekularbiologie und Zellkulturtechnik der AG Prof. Dr. B. Anspach...	24
Abb. 2-4 Darstellung des Funktionsprinzips einer SDS-PAGE.....	27
Abb. 4-1 Zellwachstum von CHO-Zellen aus dem Versuch der Studienarbeit [Klepko & Kaschubowski, 2010] in Abwesenheit und Gegenwart von FKS bzw. 1 – 20% Hokkaido-Kürbisextrakt.	34
Abb. 4-2 Zellwachstum von CHO-Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von FKS bzw. 0,8 – 2% Hokkaido-Kürbisextrakt (HK).	36
Abb. 4-3 Chromatogramm der SEC-Standardproteine.	37
Abb. 4-4 Kalibrierungsgerade der HiPrep™ Sephacryl™ S-200-Säule.....	38
Abb. 4-5 SEC-Chromatogramm des HK-Extrakts der FPLC–Anlage.	39
Abb. 4-6 Einfluss der Fraktionen aus der SEC des HK-Extrakts auf das Zellwachstum von CHO-Zellen.	41
Abb. 4-7 SEC-Chromatogramm des aufkonzentrierten und des nicht aufkonzentrierten HK-Extrakts.	42
Abb. 4-8 SEC-Chromatogramm des aufkonzentrierten HK-Extrakts der FPLC–Anlage.	43
Abb. 4-9 Einfluss der Fraktionen aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts auf das Zellwachstum von CHO-Zellen bei einer Endkonzentration von 10% im Medium.....	45
Abb. 4-10 Einfluss der Fraktionen aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts auf das Zellwachstum von CHO-Zellen bei einer Endkonzentration von 5% im Medium.	45
Abb. 4-11 Titrierung der Fraktionen 28 bis 29 aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts.	46
Abb. 4-12 Titrierung der Fraktionen 32 bis 33 aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts.	47
Abb. 4-13 Titrierung der Fraktionen 38 bis 39 aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts.	48
Abb. 4-14 Titrierung der Fraktionen 41 bis 42 aus der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakts.	49
Abb. 4-15 Einfluss der stimulierende Fraktionen 29, 33 und 38 der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakt auf das Wachstum von CHO-Zellen.	50
Abb. 4-16 Vergleich des Zellwachstums bei vereinigten Fraktionen mit den theoretisch berechneten Summen der Einzelfraktionen.	51
Abb. 4-17 Einfluss thermisch behandelte Fraktionen 29, 33 und 38 der SEC des aufkonzentrierten HK-Extrakt auf das Wachstum von CHO-Zellen.....	52
Abb. 4-18 Vergleich des Zellwachstums der vereinigten Fraktionen mit den theoretisch berechneten Summen der Einzelfraktionen bei thermischer Behandlung der Proben.	53
Abb. 4-19 SDS-PAGE und Silberfärbung des aufgeschlossenen (EA), sterilfiltrierten (ES) und aufkonzentrierten (EK) HK-Extraktes.	54
Abb. 4-20 SDS-PAGE und Silberfärbung der SEC-Fraktionen des aufkonzentrierten HK-Extraktes	55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Chemische Zusammensetzung von HAM's F-12 Medium [Biochrom AG]	7
Tab. 1-2 Nicht (rechts) - und essenzielle (links) L-Aminosäuren. * werden häufig als semi-essenziell bezeichnet.	9
Tab. 1-3 Wasserlösliche Vitamine der Gruppe B und ihre Wirkung im Organismus.	11
Tab. 1-4 Bestandteile tierischer Seren für die Zellkultur [Lindl & Gstraunthaler, 2008].	12
Tab. 1-5 Übersicht über Zell-Adhäsionsmoleküle [Löffler, 2006 S. 197]	15
Tab. 2-1 Ablösen und Passagieren von Zellen	19
Tab. 2-2 Programm der FPLC-Anlage zum Waschen und Äquilibrieren der SEC-Säule.	25
Tab. 2-3 Versuchsprogramm der FPLC-Anlage.....	25
Tab. 2-4 Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele(für 4 Gele). (Gelsystem von Bio-Rad Mini-PROTEAN®3. Ausmaße des Gels 8,3 cm (Briete) x 7,3 cm (Länge)).....	28
Tab. 2-5 GE Healthcare <i>Low Molecular Weight</i> Marker-Zusammensetzung (Produkt-Nr: 17-0446-01).....	28
Tab. 2-6 Benötigte Lösungen für die Silberfärbung.....	29
Tab. 2-7 Färbeprotokoll	30
Tab. 2-8 Störkomponenten für die Proteinbestimmung [Roth].	31
Tab. 2-9 Verdünnungsreihe des Standards	32
Tab. 0-1 Puffer für die SEC	68
Tab. 0-2 Fertiglösungen	69
Tab. 0-3 Laborgeräte	69
Tab. 0-4 Software.....	70
Tab. 0-5 Verwendete Zellkulturgefäße	71
Tab. 0-6 Weitere Materialien	71

Anhang

I. Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
cm^2	Quadratcentimeter
Co	<i>Cobalt</i>
Con A	Concanavalin
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECGF	<i>Endothelial Cell Growth Factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
<i>etc.</i>	und so weiter (lat. <i>et cetera</i>)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
h	Stunde
H_2PO_4^-	Dihydrogenphosphat
HCO_3^-	Hydrogencarbonate
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HK	Hokkaido-Kürbis
HPO_4^{2-}	Hydrogenphosphat
Ig	Immunglobulin
IGFs	<i>Insulin-like Growth Factors</i>
IST	Insulin, Selen und Transferrin
KCl	Kalziumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kalziumdihydrogenphosphat
L	Liter
M	Mol
mg	Milligramm
Mg^{2+}	zweiwertige Magnesium-Ionen
MIC	<i>minimum inhibition concentration</i>
min	Minute
Mio	Million

mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ³	Kubikmillimeter
Na ⁺	einwertiger Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NGF	Nerve Growth Factor
nm	Nanometer
PBS ⁻	phosphatgepufferte Salzlösung ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺ (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PHA	Phytohamagglutinin
r	Radius
	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
rpm	
SDS-	
PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl. <i>size exclusion chromatography</i>)
Tab.	Tabelle
TGFs	<i>Transforming Growth Factors</i>
THF	Tetrahydrofolsäure
u. a.	unter anderem/anderen
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel

II. Verwendete Zellen

Tab. 0-1 Puffer für die SEC

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lauf-/ Äquilibrierungspuffer	50 mM HEPES 150 mM NaCl

Tab. 0-2 Fertiglösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
EDTA	1,00 %	Biochrom AG
Fetales Kälberserum		Biochrom AG
Ham's F12		Biochrom AG
HEPES	1 M	Biochrom AG
L-Glutamin	200 mM	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	10.000 µg/ml	Biochrom AG
Trypsin/EDTA	0,05 % / 0,02 % (w/v)	Biochrom AG

III. Laborgeräte

Tab. 0-3 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav V-150	Systemec
Brutschrank	Binder
Einkanalpipetten 10 - 1000 µl	Eppendorf
Fraktionssammler LKB Frac-100	Pharmacia
Inverses Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss
Kühltruhe, -20 °C	Liebherr
Liquid Chromatographie Controller LCC-500 Plus	Pharmacia
Magnetrührer big-squid ocean	IKA
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Peristaltic Pump P-1	Pharmacia
pH-Meter InoLab pH720	WTW
Pipettierhilfe	Accu-Jet

PowerShot A95 Digitalkamera	Canon
Präzisionswaage TE 1502S	Sartorius
Pump P-500	Pharmacia
Rotationsverdampfer Laborota 4000 efficient	Heidolph
Sicherheitswerkbank Klasse 2 Hera Safe	Thermo Scientific
Spülmaschine Professional G7883	Miele
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf
Tischzentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Trockenschrank Function Line T12	Heraeus
UltrafilterBioPak Synergy	Millipore
Umlaufkühler Julabo FL601	Heidolph
UV-Detektor LKB Unicord SII	Pharmacia
Vakuumpumpe Rotavac valve control	Heidolph
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	GFL

IV. Software

Tab. 0-4 Software

Bezeichnung	Hersteller
Engauge Digitizer 4.1	Mark Mitchell
FPLC Director 1.03	Pharmacia LKB Biotechnology (GE Healthcare)
Microsoft Office 2007 (Word und Excel)	Microsoft Corporation

V. Verwendete Materialien

Tab. 0-5 Verwendete Zellkulturgefäße

Kulturgefäße	Hersteller	Wachstumsfläche	Arbeitsvolumen
T-25 Kulturflasche	TPP	25 cm ²	10 ml
T-75 Kulturflasche	TPP	75 cm ²	20 ml
24-Well-Mikrotiterplatte	TPP	1,9 cm ² pro Well	1 ml

Tab. 0-6 Weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Einmalpipetten 2, 5, 10 und 25 ml	TPP
Mikroreaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf
Nasenkolben 50 und 100 ml	Duran
Pipettenspitzen	Eppendorf
SEC-Säule Hiprep TM 16/60 Sephacryl TM S-200 High Resolution	GE Healthcare
Spritzen 1 ml	Norm-Ject
Spritzen 5 und 10 ml	Omnifix
Spritzenfilter 0,22 µm	Rotilabor
Spritzenfilter 0,22 µm	Millex
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Roth

