

Neue Ansätze zur systembiologischen Untersuchung der Mitochondrien und des Metabolismus in tierischen Zellkulturen

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von Janina Stephanie Bahnemann

aus Pasadena, USA

2014

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. An-Ping Zeng

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese

Prüfungsausschussvorsitzender:

Prof. Dr.-Ing. Stefan Heinrich

Tag der mündlichen Prüfung:

04. April 2014

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 2010 und März 2013 während meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik der Technischen Universität Hamburg-Harburg. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. An-Ping Zeng für die wirklich interessante Themenstellung, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die fachliche Betreuung dieser Arbeit. Herrn Prof. Andreas Liese danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats. Bei Herrn Prof. Stefan Heinrich möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die gute Kooperation im Zuge des Projektes „SysCompart“ bedanken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Bioprozess- und Biosystemtechnik bin ich zu großem Dank für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihre unermüdliche Unterstützung bei allen Fragen verpflichtet. Insbesondere möchte ich dabei Prof. Ralf Pörtner, Dr. Oscar Platas Barradas, Dr. Uwe Jandt, Dr. Christiane Goepfert, Sabrina Kayo, Grit Blume und Rebecca Faschian danken, die mich sowohl experimentell als auch außerhalb der Labore immer tatkräftig unterstützt haben. Max Becker, Helge Berger und Linda Schoedter möchte ich für die Ergebnisse und den Erkenntnisgewinn aus Diplom- und Bachelorarbeiten danken.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Müller vom Institut für Mikrosystemtechnik danke ich für die gute Kooperation. Ein besonderes Dankeschön für die wirklich tolle und produktive Zusammenarbeit richtet sich hierbei an Negar Rajabi, die durch ihre Begeisterungsfähigkeit, immer wieder neuen Ideen und ständige Diskussionsbereitschaft maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön für die tolle Kooperationsarbeit möchte ich Prof. Thomas Scheper, Dr. Andreas Prediger und Alexander Babitzky vom Institut für Technische Chemie aussprechen. Außerdem möchte ich Judith Wahrheit und Dr. Stefan Stoldt für die experimentelle Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft danken.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Alexander Brinkmann, der immer an mich geglaubt und mich stets durch alle Lebenslagen begleitet hat.

Meine größte Dankbarkeit gilt meinen Eltern, meinem Bruder – meiner Familie – für die grenzenlose Unterstützung während meiner Promotion, meines Studiums und meines bisherigen Lebens.

Abstract

Metabolomic analysis constitutes a crucial step for understanding cellular functions at a genomic level. In particular for systems biology studies, e.g. to describe the interplay of metabolic reactions and their dynamics, a reliable metabolomic analysis under physiological or *in vivo* conditions is required. While genomic, proteomic, and transcriptomic data can be obtained with high accuracy nowadays, the determination of metabolic profiles and fluxes still proves to be complicated. On the one hand, this is due to the fast turnover rates, the interaction between various metabolic pathways, and the chemical diversity of metabolites. On the other hand, the compartmentalization of metabolism in mammalian cells poses a huge challenge because of the dynamic range of metabolite concentration within the cytosol and the mitochondria.

To overcome these limitations of metabolomic analysis, attempts have been made in this work to achieve a fast and efficient separation of the cytosolic and mitochondrial compartments by using new technological approaches in both macro and microscales. Due to its significant value, the well-known industrial cell line CHO-K1 was used as a model organism within this research project. To investigate the isolation of mitochondria in macroscale, different cell disruption methods were modified and tested. The efficiency and sensitivity of each were determined by the measure of mitochondrial yield and the integrity of isolated mitochondria. Here, the highest yields of intact mitochondria were obtained using ultrasound for cell disruption and subsequent differential centrifugation. In addition to the large-scale procedures, a microfluidic device for metabolic analysis, providing a complete sample preparation (including cell disruption) within seconds, was developed in project cooperation. In this work, a prototype of the Lab-on-a-Chip (LoaC) was successfully integrated into a bioreactor and operated for a period of 18 h. Continuous sampling was carried out by applying overpressure onto the bioreactor. Besides dynamic pulse experiments, this microchip-bioreactor system implemented an efficient separation of cells and extracellular media. Moreover, a selective cell lysis using digitonin and a subsequent separation of released cytosol from the remaining cellular and mitochondrial compartments was realised on-chip. Thus, this integrated microfluidic system provides high potential to overcome the limitations of analyses concerning compartmentalized metabolism. In the last part of this work, CHO-K1 cells were cultivated in a controlled small-scale bioreactor in

order to perform systems biology studies. Therefore, detailed analyses of extracellular metabolites using LC-MS were performed under batch and continuous cultivation conditions. In addition, the mitochondrial structure and distribution of mitochondrial proteins were studied using confocal and high resolution STED microscopy. Furthermore, the relative level of enzymes involved in metabolic reactions was measured intracellularly by using the in-cell ELISA technology. To investigate the dependence of metabolic reactions on different cell cycle phases, the cultivation of synchronized cells was performed. For this purpose, cells from heterogeneous populations were enriched in the G1- and S-phase, respectively, using the centrifugal elutriation method. The synchrony during batch cultivation was determined flow cytometrically by analysing the DNA content and the cell size distribution. In addition, the cell count was observed continuously due to the effective integration of an *at-line* microscope. Metabolomic and microscopic studies of synchronized cells were performed during cultivation and the resultant data were compared to that obtained during cultivation of heterogeneous cell populations. The cell cycle dependency of metabolism was shown by the increased consumption rates of glucose and glutamine within the S-phase and the shifted increased lactate production during G1-phase, amongst others.

Keywords: Cell compartmentalization, mitochondria, compartmentalized metabolism, CHO-K1 cells, cell disruption, mitochondria isolation, microfluidics, systems integration

Zusammenfassung

Metabolomische Analysen bilden einen entscheidenden Schritt zum Verständnis zellulärer Funktionen auf genomischer Ebene. Verlässliche metabolomische Analysen unter physiologischen oder *in vivo* Bedingungen werden insbesondere für systembiologische Untersuchungen zur Beschreibung der Interaktionen von Stoffwechselreaktionen und ihrer Dynamik benötigt. Während genomische, proteomische und transkriptomische Daten heutzutage mit hoher Präzision generiert werden können, gestaltet sich die Bestimmung von Metabolitenprofilen nach wie vor schwierig. Dies liegt einerseits an den schnellen Umsatzraten, den Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Stoffwechselwegen und der chemischen Diversität von Metaboliten. Auf der anderen Seite bildet die Kompartimentierung des Stoffwechsels tierischer Zellen eine große Herausforderung, da hierdurch eine dynamische Spannbreite von Metabolitkonzentrationen innerhalb des Zytosols und der Mitochondrien vorliegt.

Zur Bewältigung der Schwierigkeiten der Zellkompartimentierung wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, die schnelle und effiziente Separation zytosolischer und mitochondrialer Kompartimente von Säugetierzellen durch neue technologische Ansätze sowohl im Makromaßstab als auch im Mikromaßstab, auf einem „Lab-on-a-Chip“ (LoaC), zu erzielen. Wegen ihrer beachtlichen industriellen Bedeutung wurde innerhalb dieser Forschungsarbeit die Suspensionszelllinie CHO-K1 als Modellorganismus verwendet. Für die Mitochondrienisolation im Makromaßstab wurden verschiedene Zellaufschlussverfahren modifiziert und getestet. Die Effizienz und Sensitivität einer jeden Methode wurden durch die Messung der Mitochondrienausbeute und der Integrität isolierter Mitochondrien bestimmt. Hierbei konnten die höchsten Ausbeuten intakter Mitochondrien für einen Zellaufschluss mittels Ultraschall und anschließender differentieller Zentrifugation erzielt werden. Parallel zu den makroskopischen Methoden wurde als Kooperationsprojekt ein Mikrochipssystem entwickelt, das innerhalb weniger Sekunden eine vollständige Probenverarbeitung (einschließlich Zellaufschluss) für metabolische Analysen ermöglichen sollte. Der Prototyp des LoaC wurde innerhalb dieser Arbeit erfolgreich in einen Bioreaktor integriert und für eine Gesamtdauer von 18 h betrieben. Eine kontinuierliche Probenahme konnte hierbei mittels Überdruck realisiert werden. Neben dynamischen Pulsexperimenten wurde durch dieses Mikrochip-Bioreaktor-

System eine effiziente Separation der Zellen vom extrazellulären Medium erzielt. Durch eine vorangestellte Zelllyse mittels Digitonin und die anschließende Abtrennung des freigesetzten Zytosols von den verbleibenden zellulären und mitochondrialen Kompartimenten, erwies das integrierte Mikrochipsystem großes Potential, um die Limitierungen zur Analyse des kompartimentierten Metabolismus zu überwinden. Im letzten Teil der Arbeit wurden die CHO-K1 Zellen für systembiologische Untersuchungen in einem geregelten Kleinmaßstab-bioreaktor kultiviert. Hierfür wurden neben Batch-Verfahren ebenfalls kontinuierliche Kultivierungen von Mischpopulationen durchgeführt und detaillierte extrazelluläre Metabolitanalysen mittels LC-MS vorgenommen. Darüber hinaus wurden durch konfokale und hochauflösende STED-Mikroskopie die Mitochondrienstrukturen und die Verteilung mitochondrialer Proteine in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen analysiert. Zudem konnte der relative Gehalt stoffwechselrelevanter Enzyme intrazellulär durch Einsatz der ELISA-Technologie bestimmt werden. Zur Untersuchung der Abhängigkeit metabolischer Reaktionen vom Zellzyklus wurden Kultivierungen synchronisierter Zellen erfolgreich durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen im Vorfeld aus heterogenen Populationen mittels Elutriationszentrifugation in der G1- bzw. der S-Phase angereichert. Die Synchronität über den Zeitraum einer Batch-Kultivierung konnte mittels durchflusszytometrischer Analysen zur Bestimmung des DNA-Gehalts und des Zelldurchmessers sowie durch die erfolgreiche Applikation eines *at-line* Mikroskops zur kontinuierlichen Bestimmung der Zellzahl verfolgt werden. Metabolische und mikroskopische Untersuchungen synchronisierten Zellen wurden parallel dazu durchgeführt und mit den Daten der Kultivierungen von Mischpopulation verglichen. Unter anderem durch deutlich erhöhte Verbrauchsraten der Hauptsubstrate Glukose und L-Glutamin in der S-Phase und eine versetzt eintretende erhöhte Bildung von Laktat während der G1-Phase, konnte eine Zellzyklusabhängigkeit des Metabolismus gezeigt werden.

Schlagerwörter: Zellkompartimentierung, Mitochondrien, kompartimentierter Stoffwechsel, CHO-K1 Zellen, Zellaufschluss, Mitochondrienisolation, Mikrofluidik, Systemintegration

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Möglichste getan hat.“*

-J.W. Goethe, Italienische Reise
Caserta, den 16. März 1787-

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	5
2.1	Industrielle Bedeutung tierischer Zellen.....	5
2.1.1	Prokaryotische kontra eukaryotische Zellsysteme.....	6
2.1.2	Chinesische Hamster Ovary Zellen.....	7
2.1.3	Systemintegration in der tierischen Zellkultur.....	9
2.1.4	Microfluidics in der tierischen Zellkultur.....	10
2.2	Der Metabolismus tierischer Zellen.....	12
2.2.1	Glykolyse und Tricarbonsäurezyklus.....	13
2.2.2	Pyruvatstoffwechsel: Verbindung zwischen Glykolyse und TCA-Zyklus.....	16
2.2.3	Glutaminolyse.....	17
2.2.4	Aminosäurestoffwechsel.....	18
2.3	Systembiologie und metabolische Analyse.....	19
2.4	Mitochondrien.....	23
2.4.1	Struktur und Aufbau.....	24
2.4.2	Mitochondrien und Apoptose.....	26
2.4.3	Isolation von Mitochondrien.....	27
2.5	Der Zellzyklus im metabolischen Zusammenhang.....	30
2.5.1	Mitochondriale Zellzyklusabhängigkeit.....	32
2.5.2	Zellsynchronisation.....	33
3	Materialien und Methoden.....	35
3.1	Verbrauchsmaterial.....	35
3.2	Chemikalien und Reagenzien.....	36
3.3	Antikörper.....	38
3.4	Kits.....	38
3.5	Geräte.....	39
3.6	Zelllinien.....	42
3.7	Zellkulturmedien.....	42
3.8	Puffer und Lösungen.....	43
3.9	Steriles Arbeiten.....	45
3.10	Zellkulturtechniken.....	45

3.10.1	Optimierung der CHO-K1 Batch-Kultivierung.....	45
3.10.2	CHO-K1 Erhaltungskultur	46
3.10.3	CHO ^{SFS} GFP Kultivierung	47
3.10.4	Kryokonservierung.....	48
3.10.5	Revitalisierung von Zellen	48
3.10.6	Kultivierung im Bioreaktor Vario 1000	48
3.10.7	Reaktorkultivierung: Mess- und Regelgrößen.....	50
3.10.8	Batch-Kultivierung.....	51
3.10.9	Kontinuierliche Kultivierung	53
3.10.10	Inbetriebnahme und Animpfen des Vario 1000 Bioreaktors.....	54
3.11	<i>At-line</i> Mikroskopie	55
3.12	Zellsynchronisierung mittels Elutriation.....	57
3.13	Analytik.....	60
3.13.1	Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung	60
3.13.2	Wachstumskinetik: Batch-Kultivierung	61
3.13.3	Wachstumskinetik: Kontinuierliche Kultivierung.....	62
3.13.4	Bestimmung der Zellgrößenverteilung.....	64
3.13.5	Enzymatische Bestimmung extrazellulärer Metaboliten.....	64
3.13.6	Bestimmung extrazellulärer Metaboliten mittels HPLC	65
3.13.7	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	66
3.14	Mitochondrienpräparation.....	69
3.14.1	Zellaufschlussmethoden für die Mitochondrienisolation	69
3.14.1.1	Vorbereitung der Zellen	69
3.14.1.2	Zellaufschlussmethoden	69
3.14.1.3	Quantifizierung des Zellaufschlusses	71
3.14.2	Mitochondrienseparation.....	72
3.14.3	Bestimmung der Mitochondrienausbeute.....	72
3.14.4	Mitochondrienintegrität.....	73
3.14.5	Visualisierung isolierter Mitochondrien.....	74
3.14.6	Intrazelluläre Mitochondrienanalytik	74
3.15	Mikroskopische Methoden.....	75
3.15.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	75
3.15.2	Fluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie.....	76

3.15.3	STED-Mikroskopie	77
3.16	In-Cell ELISA	80
3.16.1	In-Cell ELISA Protokoll	81
3.16.2	Detektion von PDH und OGDH.....	82
3.16.3	AP-Entwicklung für die Detektion der PDH Untereinheit E1 α (total)	82
3.16.4	HRP-Entwicklung	83
3.16.5	Komplette Zellfärbung mittels Janusgrün	83
3.16.6	In-Cell ELISA Datenanalyse.....	84
3.17	Mikrofluidische Experimente.....	85
3.17.1	Kultivierung im VSF2000 Bioreaktor mit Überdruck.....	85
3.17.2	Mikrofluidische Systeme.....	86
3.17.3	Design des integrierten Lab-on-a-Chip	86
3.17.4	Herstellung des integrierten Lab-on-a-Chip.....	89
3.17.5	Integration des Lab-on-a-Chip in den Bioreaktor	89
3.17.6	Medienaustausch und Separation von CHO-K1 Zellen	90
3.17.7	Biologische Experimente im Lab-on-a-Chip.....	90
3.17.8	Fluoreszenzfärbung von CHO-K1 Zellen	93
4	Ergebnisse und Diskussion.....	94
4.1	Makroskopische Separation von Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen	94
4.1.1	Zellaufschlusseffizienz und Mitochondrienausbeute	95
4.1.2	Integrität und Morphologie der Mitochondrien.....	101
4.1.3	Evaluierung der Zellaufschlussmethoden für die Mitochondrienisolation	105
4.1.4	Zusammenfassende Diskussion.....	108
4.2	Mikrofluidische Systemintegration für metabolische Untersuchungen.....	110
4.2.1	Medienaustausch und Separation von CHO-K1 Zellen	111
4.2.2	Visualisierung des Zellflusses im Spiralseparator.....	114
4.2.3	Zellpermeabilisierung mittels Digitonin: Off-Chip.....	115
4.2.4	Zellpermeabilisierung mittels Digitonin: On-Chip	118
4.2.5	Dynamische Experimente mit definiertem Substratpuls	121
4.2.6	Zusammenfassende Diskussion.....	124
4.3	Systembiologische Untersuchungen von CHO-K1 Zellen	126
4.3.1	Batch-Kultivierung von CHO-K1 Mischpopulationen im Bioreaktor	127
4.3.1.1	Zelldichte und Wachstumsrate	127

4.3.1.2	Integration eines <i>at-line</i> Mikroskops	129
4.3.1.3	Substratverbrauch und Produktbildung	131
4.3.1.4	Detaillierte Analyse extrazellulärer Metaboliten mittels HPLC.....	133
4.3.1.5	Struktur und Verteilung der Mitochondrien	135
4.3.1.6	Abbildung mitochondrialer Proteine mittels STED-Mikroskopie.....	138
4.3.1.7	Bestimmung des mitochondrialen Enzymlevels mittels In-Cell ELISA	142
4.3.1.8	Zusammenfassende Diskussion.....	145
4.3.2	Kontinuierliche Kultivierung von CHO-K1 Mischpopulationen	146
4.3.2.1	Zelldichte und Wachstumsrate	146
4.3.2.2	Substratverbrauch und Produktbildung	148
4.3.2.3	Detaillierte Analyse extrazellulärer Metaboliten mittels HPLC.....	151
4.3.2.4	Zellzyklusanalyse	153
4.3.2.5	Zellgrößenverteilung	154
4.3.2.6	Struktur und Verteilung der Mitochondrien	156
4.3.2.7	Abbildung mitochondrialer Proteine mittels STED-Mikroskopie.....	157
4.3.2.8	Bestimmung des mitochondrialen Enzymlevels mittels In-Cell ELISA	160
4.3.2.9	Zusammenfassende Diskussion.....	162
4.3.3	Synchrone Kultivierungen von CHO-K1 Zellen.....	163
4.3.3.1	Kalibrierung des Elutriators nach Zellzyklusphasen	163
4.3.3.2	Wachstumsverlauf und Zellzyklusanalyse synchronisierter CHO-K1 Zellen.....	165
4.3.3.3	Zellgrößenverteilung synchronisierter CHO-K1 Zellen.....	168
4.3.3.4	Wachstumsrate synchronisierter CHO-K1 Zellen.....	170
4.3.3.5	Substratverbrauch und Produktbildung	171
4.3.3.6	Detaillierte Analyse extrazellulärer Metaboliten mittels HPLC.....	172
4.3.4	Mitochondriale Analysen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen	175
4.3.4.1	Struktur und Verteilung der Mitochondrien	175
4.3.4.2	Abbildung mitochondrialer Proteine mittels STED-Mikroskopie.....	177
4.3.4.3	Bestimmung des mitochondrialen Enzymlevels mittels In-Cell ELISA	180
4.3.4.4	Zusammenfassende Diskussion.....	183
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	185
6	Literaturverzeichnis	189

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Oberflächenstruktur von CHO-K1 Suspensionszellen.	7
Abb. 2:	Schematische Darstellung wesentlicher Interaktionen der kompartimentierten Stoffwechselreaktionen.	14
Abb. 3:	Schematische Darstellung der zentralen Rolle von PDH und OGDH im TCA-Zyklus.	17
Abb. 4:	Übersicht der drei Omics-Technologien.	19
Abb. 5:	Struktur und Aufbau eines Mitochondriums.	25
Abb. 6:	Schematische Darstellung zur Separation extrazellulärer, zytosolischer und mitochondrialer Metaboliten.	28
Abb. 7:	Schematische Darstellung des Zellzyklus tierischer Zellen.	31
Abb. 8:	Morphologie und Verteilung von Mitochondrien in Abhängigkeit vom Zellzyklus.	32
Abb. 9:	CHO-K1 Erhaltungskultur im CO ₂ -Inkubator.	46
Abb. 10:	Aufbau des Vario 1000 Bioreaktors.	49
Abb. 11:	Skizze der Deckelanschlüsse des Vario 1000 Bioreaktors.	52
Abb. 12:	Versuchsaufbau des Vario 1000 Bioreaktors während der Batch-Kultivierungen.	53
Abb. 13:	Aufbau eines <i>at-line</i> Mikroskops.	57
Abb. 14:	Gesamtaufbau der zentrifugalen Elutriationsapparatur.	58
Abb. 15:	Ergebnis der Zellzyklusanalyse einer CHO-K1 Mischpopulation im Histogramm.	68
Abb. 16:	BSA-Standardreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay.	73
Abb. 17:	Schema zur Datenanalyse der mitochondrialen Proteincluster, die mittels STED-Mikroskopie visualisiert wurden.	79
Abb. 18:	Übersicht des Protokolls zur In-Cell ELISA Messung.	81
Abb. 19:	Aufbau des VSF2000 Bioreaktors (in Betrieb).	85
Abb. 20:	Design des integrierten LoaC.	87
Abb. 21:	Einfluss der Zellaufschlussmethoden in Hinblick auf die Zellaufschlusseffizienz, die Integrität der äußeren Mitochondrienmembranen und die Gesamtausbeute an isoliertem Protein bezogen auf 1•10 ⁸ CHO-K1 Zellen.	96
Abb. 22:	Einfluss der Zellaufschlussmethode in Hinblick auf die Zellmorphologie.	98

Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CHO-K1 Zellen bzw. dem Zellhomogenat nach erfolgtem Zellaufschluss.	100
Abb. 24: Fluoreszenzaufnahmen isolierter Mitochondrien nach differentieller Zentrifugation.	103
Abb. 25: Messergebnisse unter den besten Konditionen der verwendeten Zellaufschlussmethoden im direkten Vergleich.....	106
Abb. 26: Experimenteller Aufbau des integrierten LoaC und Bioreaktors und detaillierte Ansicht des hergestellten LoaC.	111
Abb. 27: Einfluss des Überdrucks im Bioreaktor	112
Abb. 28: Fluoreszenz- und auflichtmikroskopische Aufnahmen im Overlay vom Verlauf der CHO-K1 Zellen im Spiralseparator.	114
Abb. 29: Permeabilisierung von CHO-K1 Zellen mittels Digitonin (0,01 % (w/v)).....	116
Abb. 30: Austritt des Zytosols nach der Permeabilisierung von CHO-K1 Zellen mittels Digitonin (0,01 % (w/v)).....	117
Abb. 31: Verteilung der permeabilisierten CHO-K1 Zellen und des Mediums an den Mikrochip-Ausgängen 1, 2 und 3.	119
Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von anti-Tom20 markierten Mitochondrien innerhalb von Digitonin permeabilisierten CHO-K1 Zellen.....	120
Abb. 33: Skizze des experimentellen Aufbaus des integrierten Mikrochip-Bioreaktor-Systems für Glutaminpuls-Experimente.	121
Abb. 34: Messung der Reproduzierbarkeit der Separationseffizienz des Mikrochip-Bioreaktor-Systems.....	122
Abb. 35: Typischer Verlauf einer Batch-Kultivierung von CHO-K1 Zellen im Vario 1000 Bioreaktor.	128
Abb. 36: Aufnahmen des integrierten at-line Mikroskops von CHO-K1 Zellen im Laufe einer Batch-Kultivierung.	130
Abb. 37: Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen sowie die entsprechenden Verbrauchs- und Bildungsraten während der Batch-Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.	131
Abb. 38: Metabolitenbestimmung mittels HPLC über den Verlauf der CHO-K1 Batch-Kultivierung.....	134
Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Struktur und Verteilung von Mitochondrien in CHO-K1 Zellen in verschiedenen Kultivierungsphasen.....	137

Abb. 40: Konfokale und STED-mikroskopische Aufnahme isolierter Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen.	138
Abb. 41: STED-mikroskopische Aufnahmen PDH-markierter Mitochondrien in CHO-K1 Zellen.....	139
Abb. 42: Bestimmung der Verteilung von PDH-, OGDH- und Tom20-Clustern in CHO-K1 Zellen.....	140
Abb. 43: Bestimmung des Proteinlevels von PDH und OGDH in CHO-K1 Zellen.	143
Abb. 44: Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von PDH in CHO-K1 Zellen im Verlauf der Batch-Kultivierung.	144
Abb. 45: Zelldichte und Viabilität über den Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.	147
Abb. 46: Wachstumsrate über den Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung im Bioreaktor.	147
Abb. 47: Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen sowie die entsprechenden Verbrauchs- und Bildungsraten während der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.	149
Abb. 48: Metabolitenbestimmung mittels HPLC über den Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung von CHO-K1 Zellen.	152
Abb. 49: Zellzyklusphasenverteilung der CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.....	153
Abb. 50: Gemittelte Verteilungsdichte des CHO-K1 Zelldurchmessers während der Batch-Phase und der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.	154
Abb. 51: Mittlerer Durchmesser während der Batch-Phase und der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.....	155
Abb. 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Struktur und Verteilung von Mitochondrien in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung. ...	156
Abb. 53: STED-mikroskopische Aufnahmen Tom20-markierter Mitochondrien in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung (nach 185 h).....	157
Abb. 54: STED-mikroskopische Aufnahmen PDH-markierter Mitochondrien in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung (nach 185 h).....	158
Abb. 55: Bestimmung der Verteilung von PDH-, OGDH- und Tom20-Clustern in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung.	159

Abb. 56: Bestimmung des Proteinlevels von PDH und OGDH in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung.	160
Abb. 57: Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von PDH in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung.	161
Abb. 58: Wachstumsverlauf und Zellzyklusphasenverteilung von Batch-Kultivierungen synchronisierter CHO-K1 Zellen.	166
Abb. 59: Modellierung der Zellzyklusphasenverteilung während der G1-Phasen-Synchronisierung.	168
Abb. 60: Bestimmung des Zelldurchmesser synchronisierter CHO-K1 Zellen während der Batch-Kultivierung.	169
Abb. 61: Bestimmte Wachstumsraten von CHO-K1 Zellen über den Verlauf synchroner Batch-Kultivierungen.	170
Abb. 62: Bestimmte Konzentrationen von Glukose, Glutamin und Laktat sowie die entsprechenden Verbrauchs- bzw. Bildungsraten von CHO-K1 über den Verlauf synchroner Batch-Kultivierungen.	171
Abb. 63: Metabolitenbestimmung mittels HPLC über den Verlauf der synchronen Kultivierungen von CHO-K1 Zellen.	173
Abb. 64: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Struktur und Verteilung von Mitochondrien in CHO-K1 Zellen abhängig von den Zellzyklusphase.	176
Abb. 65: STED-mikroskopische Aufnahmen Tom20-markierter Mitochondrien in CHO-K1 Zellen zu verschiedenen Zellzyklusphasen.	178
Abb. 66: Bestimmung der Verteilung von PDH-, OGDH- und Tom20-Clustern in CHO-K1 Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen.	179
Abb. 67: Bestimmung des Proteinlevels von PDH und OGDH in CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen.	181
Abb. 68: Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von PDH in CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2/M-Phase).	182

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammenfassung der Messdaten zum Vergleich der verwendeten Zellaufschlussmethoden.....	102
Tab. 2:	Zellzyklusphasenverteilung von Zellfraktionen, die nach der Elutriation einer CHO-K1 Mischpopulation erhalten wurden.....	164

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Arbeitskreis
Ala	Alanin
AP	Alkalische Phosphatase
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Baby Hamster Kidney
BSA	Bovines Serum-Albumin
CCD	Charge-coupled Device
CHO	Chinese Hamster Ovary
CoA	Coenzym A
CS	Citratsynthase
Cys	Cystein
DHFR	Dihydrofolatreductase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRIE	Deep Reactive Ion Etching
DTNB	5,5' Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunsobent Assay
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc-Cl	Fluorenylmethoxycarbonylchlorid

Fum	Fumarat
x g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GDH	Glutamatdehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glucose
Gln	L-Glutamin
GLS	Glutaminase
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunden
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Meerrettichperoxidase
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICE	In-Cell ELISA
Ile	Isoleucin
α -KG	α -Ketoglutarat
L	Liter
Lac	Laktat
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie)
LDH	Laktatdehydrogenase
LED	Lichtemittierende Diode
Leu	Leucin
LoaC	Lab-on-a-Chip
Lys	Lysin
Mal	Malat
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (Zellen)
Met	Methionin
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer

μ-TAS	Micro Total Analysis Systems
mM	Millimolar
min	Minute
MIP	Mitochondrien-Isolatitons-Puffer
mL	Milliliter
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MPI	Max-Planck-Institut
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonucleinsäure
mV	Millivolt
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
NMR	Kernspinnresonanzspektroskopie
NS0	Maus Myelom
OAA	Oxalacetat
OGDC	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase Komplex
OGDH	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase
OPA	Ortho-Phtaldialdehyd
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Pyruvat-Carboxylase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDHC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PEEK	Polyetheretherketon
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
PI	Propidiumiodid
pO ₂	Gelöstsauerstoff
Pro	Prolin
PTFE	Polytetrafluorethylen
Pyr	Pyruvat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonucleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	Split-and-Recombine
Ser	Serin
SHM	Staggered Herringbone Micromixer
STED	Stimulated Emission Depletion
Succ	Succinat
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TCD	Gesamtzellichte
TCI	Institut für Technische Chemie
TIM	Translocase of the inner membrane
Thr	Threonin
TOM	Translocase of the outer membrane
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
TUHH	Technische Universität Hamburg-Harburg
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
USD	United States Dollar
UV	Ultraviolette Strahlung
Val	Valin
VCD	Lebendzellichte
w/v	Gewichtsprozent (Gewicht pro Volumen)

1 Einleitung

Die Antworten auf eine Vielzahl grundlegender Fragen in der Systembiologie beruhen auf detaillierten, quantitativen Analysen der Stoffwechselwege und Metabolitkonzentrationen innerhalb der Mitochondrien und dem Zytosol. Mitochondrien spielen unter anderem eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel tierischer Zellen und regulieren den programmierten Zelltod [1]. Der Verlust ihrer Funktionalität kann zu gravierenden Krankheiten führen, wie beispielsweise Krebs, Alzheimer, nervendegenerative Erkrankungen oder Diabetes [2–6]. Um den Einfluss der Mitochondrien bei der Entstehung solcher Krankheiten verstehen zu können, ist eine detaillierte Untersuchung der zentralen Stoffwechselreaktionen von großer Bedeutung. Stoffwechselreaktionen laufen sowohl in den Mitochondrien, als auch im Zytosol einer Zelle ab, wobei Stoffwechselprodukte, die sogenannten Metaboliten, gebildet werden. Während die Glykolyse im Zytosol der Zelle stattfindet, ist der TCA-Zyklus in den Mitochondrien lokalisiert. Die Verteilung der Metaboliten variiert daher innerhalb der Zellorganellen, des Zytosols und des extrazellulären Mediums und hängt u.a. von der metabolischen Aktivität der Zelle ab. Obwohl bereits Stoffwechselmodelle zur Beschreibung der Stoffflüsse *in vivo* existieren, fehlen quantitative, experimentelle Daten über die Dynamik des Metabolismus innerhalb der Zellkompartimente. Bei derzeit gängigen Stoffwechseluntersuchungen wird in der Regel die Zelle als Ganzes betrachtet, ohne dabei die Kompartimentierung der Zelle und somit der Metaboliten zu berücksichtigen. Um das Wissen über die Dynamik der Hauptstoffwechselreaktionen der Glykolyse und dem TCA-Zyklus zu erweitern, ist eine separate Analyse der Metaboliten essentiell. Eine diskrete Metabolitbestimmung setzt jedoch die Trennung der mitochondrialen und zytosolischen Zellkompartimente im Vorfeld der Analyse voraus. Darüber hinaus sind schnelle und dynamische Experimente mit tierischen Zellen unter physiologischen Bedingungen für die systematische Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus und dessen Regulationen von großer Bedeutung. Besonders die quantitative Bestimmung intrazellulärer Metaboliten und metabolischer Flüsse erfordert eine schnelle und gezielte Probenverarbeitung unter physiologischen Bedingungen [7, 8]. Konventionelle Anwendungen, die manuelle Standardverfahren im Labormaßstab verwenden, können diesen Anforderungen jedoch nicht gerecht werden. Grund hierfür ist, dass die Zeit, die für eine manuelle Probenverarbeitung benötigt wird (im Bereich von Minuten bis Stunden),

die Zeitskala von biologischen Reaktionen (Millisekunden bis Sekunden) um ein Vielfaches übersteigt. Integrierte mikrofluidische Systeme bieten eine Möglichkeit um diese Zeitlimitierungen zu umgehen und liefern eine zusätzliche Funktionsvielfalt, die auf dem veränderten Verhalten physikalischer Kräfte im Mikromaßstab beruht. Die Zell- und Partikelseparation mittels Mikrofluidik-Technologien hat in den letzten Jahren besonders bei der Verarbeitung biologischer und chemischer Proben stark an Bedeutung gewonnen [9, 10]. Verglichen mit herkömmlichen Apparaturen und Laborgeräten bieten mikrofluidische Systeme einen sehr viel geringeren Verbrauch an Probenmaterial und Reagenzien, besitzen ein großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, ermöglichen eine schnelle und präzise Probenverarbeitung und zeigen ebenfalls ein hohes Automatisierungspotential [11–13]. Darüber hinaus können mikrofluidische Systeme kontrollierte Umgebungen erzeugen, wodurch metabolomische und andere zellbasierte Experimente unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen ablaufen können [14]. Eine besondere Eigenschaft der Mikrofluidik ist das Potential alle Komponenten, die zur Beantwortung einer bestimmten Fragestellung notwendig sind, in einem einzigen integrierten System miteinander zu vereinen („Lab-on-a-Chip“). Ein geeignetes mikrofluidisches System, das direkt in einen Bioreaktor integriert wird und eine Separation der mitochondrialen von den zytosolischen Kompartimenten erzielt, könnte einen entscheidenden Beitrag zur Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus leisten. Mit zunehmendem Verständnis der Hierarchie zellulärer Vorgänge wird auch der regulatorische Einfluss des Metaboloms auf die Genexpression deutlich [15]. In Hinblick auf die steigende Bedeutung der Synthese rekombinanter Proteine in tierischen Zelllinien zur Produktion von Pharmazeutika ist die Entwicklung präziser Stoffwechselmodelle daher auch über die Grundlagenforschung hinaus von großem wirtschaftlichen Interesse [16]. Das Verständnis der komplexen Regulationen des Energiestoffwechsels während der Zellkultivierung könnte einen wesentlichen Beitrag zur Zelllinienoptimierung leisten und somit eine Steigerung der Produktivität ermöglichen. Ein entscheidender Aspekt, der sowohl Einfluss auf den Metabolismus als auch die Genexpression hat, stellt hierbei der Zellzyklus dar, den jede Zelle während ihres Lebens immer wieder durchläuft. Während jeder Phase des Zellzyklus werden unterschiedliche Zwischenschritte durchgeführt, die zur Replikation der Zelle für die Zellteilung erforderlich sind. Dementsprechend verändern sich auch der Metabolismus und die Genexpression innerhalb eines Zellzyklus mehrfach.

Systembiologische Untersuchungen dynamischer, zellulärer Prozesse stoßen aus diesem Grund bei der Analyse von Mischpopulationen an ihre Grenzen. Eine Möglichkeit dies zu umgehen besteht in der Synchronisation der Zellpopulation, bei der die Zellen entsprechend ihrer Zellzyklusphasen aufgetrennt werden. Eine Analyse des Metabolismus synchronisierter Zellen könnte einen Aufschluss über die zellulären Interaktionen innerhalb einzelner Phasen eines Zellzyklus geben und damit einen weiteren Beitrag zur Optimierung der Produktivität einer Zelllinie leisten [17].

Aufgabenstellung

Im Zuge dieser Arbeit soll durch neue Strategien und Technologien die Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus tierischer Zellen unter physiologischen und dynamischen Bedingungen realisiert werden. Um dieses Ziel erreichen zu können, soll eine separate Analyse der Metaboliten im Zytosol und den Mitochondrien durch die Trennung dieser Kompartimente ermöglicht werden. Aufgrund ihres hohen industriellen Stellenwertes soll innerhalb dieser Forschungsarbeit eine CHO Suspensionszelllinie verwendet werden, die zur Gestaltung reproduzierbarer Kultivierungsbedingungen in protein- und serumfreiem, chemisch definiertem Medium kultiviert werden kann.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll der Einfluss unterschiedlicher Zellaufschlussmethoden auf den Isolationserfolg und die Integrität der Mitochondrien im Labormaßstab getestet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollen entscheidende Informationen für die Entwicklung und Optimierung mikrofluidischer Systeme liefern, die für eine Probenverarbeitung und Organellenseparation im Mikromaßstab eingesetzt werden sollen. Die Evaluierung eines solchen „Lab-on-a-Chip“, das in einem Vorgang eine Trennung der zellulären Kompartimente und der entsprechenden Metaboliten für eine anschließende Charakterisierung des Metaboloms ermöglicht, soll in einem zweiten Teil dieser Arbeit stattfinden. Um möglichst den *in vivo* Zustand der Zellen beschreiben zu können, sollen durch die mikrofluidische Systemintegration in einen geregelten Bioreaktor Analysen unter physiologischen und dynamischen Bedingungen realisiert werden. Längerfristig sollen hierdurch auch zeitliche Veränderungen im Metabolom als Folge äußerer Einwirkungen (z.B. Substratmangel oder Substratpuls) kontinuierlich untersuchbar werden.

Als Grundlage für die Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus soll ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit die systembiologische Untersuchung der CHO Zellen in einem Kleinmaßstabbioreaktor bilden. Durch Batch- und kontinuierliche Kultivierungen sollen grundlegende Informationen über das Wachstumsverhalten, den Metabolismus und die mitochondriale Verteilung während des Kultivierungsverlaufes erhalten werden. Darüber hinaus soll durch Kultivierungen synchronisierter CHO Zellen der Einfluss des Zellzyklus auf stoffwechselrelevante Reaktionen untersucht werden. Eine detaillierte Betrachtung der Mitochondrien und der submitochondrialen Verteilung zentraler Enzyme des Stoffwechsels soll hierbei durch neue, hochauflösende mikroskopische Methoden und immunochemische Detektion des intrazellulären Proteingehalts erfolgen, wodurch der Wissensstand über das regulatorische und dynamische Verhalten der Mitochondrien erweitert werden soll.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Industrielle Bedeutung tierischer Zellen

Die biotechnologische Nutzung tierischer Zellkulturen spielt eine immer wichtigere Rolle bei der Entwicklung biopharmazeutischer Arzneimittel [18]. Den Großteil der Biopharmazeutika stellen rekombinante Proteinwirkstoffe dar [19, 20]. Hierzu gehören in erster Linie Enzyme, virale Impfstoffe, Antikörper und therapeutische Proteine, wie etwa Wachstumshormone oder der Blutgerinnungsfaktor VIII [21]. In den 50er Jahren wurde als eines der ersten Produkte ein Impfstoff gegen Kinderlähmung mithilfe tierischer Zellen hergestellt [22]. Derzeit sind in Deutschland bereits 156 biotechnologisch hergestellte Arzneimittel für die medizinische Anwendung zugelassen¹, wobei der prozentuale Anteil der aus kultivierten Säugerzellen gewonnenen Proteine ständig zunimmt [23]. Der weltweit wachsende Markt für Biopharmazeutika hat im Jahr 2010 einen Gesamtwert von über 100 Milliarden USD erreicht und weist mit einer prognostizierten Steigerung um weitere 69 Milliarden USD bis 2014 großes Potential auf [24]. Nicht zuletzt aus diesem Grund besteht ein stetiges Interesse an der intensiven Erforschung und Optimierung tiersicher Produktionszelllinien und der entsprechenden Zellkulturprozesse [25]. Für die weitere Steigerung der Produktivität und damit Wirtschaftlichkeit einer jeden Zelllinie ist das tiefgehende Verständnis der Abläufe innerhalb der Zellen erforderlich. Dazu zählt in erster Linie auch die Analyse des Zellmetabolismus, welcher über den Verbrauch an Substrat und weitergehend über die quantitative Umsetzung in das Zielprodukt entscheidet [26]. Aufgrund der hohen Sicherheitsanforderungen bei der Zulassung neuer Pharmazeutika werden für die biotechnologische Produktion rekombinanter Proteine hauptsächlich etablierte Zellsysteme von Bakterien, Hefen und Säugerzellen eingesetzt, deren Wachstumsverhalten, Genetik und Metabolismus ausreichend charakterisiert sind [27].

¹ Stand: Mai 2013, Quelle: Die forschenden Pharma-Unternehmen www.vfa.de/gentech

2.1.1 Prokaryotische kontra eukaryotische Zellsysteme

Vergleicht man die Charakteristika tierischer Zellen mit denen von Bakterien, so scheinen auf den ersten Blick prokaryotische Zellsysteme für die Herstellung von Produkten im industriellen Maßstab geeigneter zu sein. Sie bieten wesentlich geringere Verdopplungszeiten bei einer höheren Robustheit, stellen deutlich geringere Anforderungen an ihre Umgebung und sind damit wirtschaftlich attraktiver [28]. Prokaryoten, wie *Escherichia coli*, sind allerdings nicht oder nur bedingt in der Lage, eine korrekte Faltung des Zielproteins durchzuführen, was oftmals eine chemische Renaturierung zum Erhalt der korrekten Proteinfaltung während des Produktionsprozesses erforderlich macht. Außerdem bilden sich bei der Proteinsynthese häufig sogenannte „Inclusion bodies“, die als intrazelluläre Proteinaggregate vorliegen und die Produktaufarbeitung erschweren. Darüber hinaus können prokaryotische Organismen keine posttranslationalen Modifikationen durchführen, was bei der Synthese komplexerer Proteine häufig zu signifikanten Fehlfaltungen und dem Verlust der biologischen Aktivität führt [27]. Sie sind daher als Produktionsorganismen für die Herstellung komplexer Säugerproteine ungeeignet. Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, sind hingegen als eukaryotische Organismen in der Lage posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Glykosylierungen, durchzuführen. Allerdings unterscheidet sich das durch Hefen erzeugte Glykosylierungsmuster meist stark von denen humaner Proteine [29].

Insbesondere für die Produktion von therapeutischen Proteinen ist jedoch die korrekte Modifizierung bzw. Glykosylierung der Proteine von großer Bedeutung. Hierbei werden komplexe Zuckerverbindungen, die so genannten Glykane, im Laufe der posttranslationalen Prozessierung in Säugerzellen an die synthetisierten Proteine gebunden. Die Glykosylierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung, der Stabilität sowie der Bioaktivität der Proteine [19, 20, 30, 31]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass glykosylierte Proteine länger im Organismus verbleiben als ihre entsprechenden nicht glykosylierten Varianten, weshalb sie oft effektiver wirken können [29]. Zudem werden die in Säugerzellen synthetisierten Glykoproteine in der Regel sekretiert und können daher relativ einfach aus dem Kulturmedium aufgereinigt werden. Die biochemischen Eigenschaften der produzierten Proteine ähneln dabei denen der natürlicherweise im Menschen vorkommenden Proteine stark [32]. Dieses Alleinstellungsmerkmal treibt die Entwicklung tierischer Zellkulturprozesse sowohl zahlenmäßig als auch die Optimierung

betreffend immer weiter voran. Heutzutage werden bereits 60-70 % aller rekombinanten pharmazeutischen Produkte in Zelllinien aus Säugerzellen produziert und stellen damit eines der wichtigsten Wirtssysteme für die Produktion rekombinanter Proteine dar [18]. Rekombinante Gene wurden in den 1970er-Jahren erstmals in kultivierten Säugerzellen stabil transfiziert [33]. Für die industrielle Herstellung von Biopharmazeutika haben sich vor allem die Zelllinien CHO (Chinese Hamster Ovary), BHK (Baby Hamster Kidney), NS0 (Maus Myelom) und HEK-293 (Human Embryonic Kidney) bewährt [19, 20].

2.1.2 Chinese Hamster Ovary Zellen

Im Jahr 1957 wurde der Chinesische Hamster (*Crietulus griseus*) zum Ursprung für die CHO Zelllinie, als nach einer Gewebeentnahme Zellen aus den Ovarien des Hamsters erfolgreich *in vitro* kultiviert werden konnten [34]. Dabei zeigten sich schnell eine für tierische Zellen hohe Widerstandsfähigkeit und kurze Verdopplungszeit, sodass diese Zelllinie das Ziel weiterer Untersuchungen und Entwicklungen wurde. Als Folge war das erste in tierischen Zellen hergestellte und offiziell zugelassene rekombinante therapeutische Protein, der gewebespezifische Plasminogenaktivator, ein von CHO Zellen exprimiertes Produkt [35].

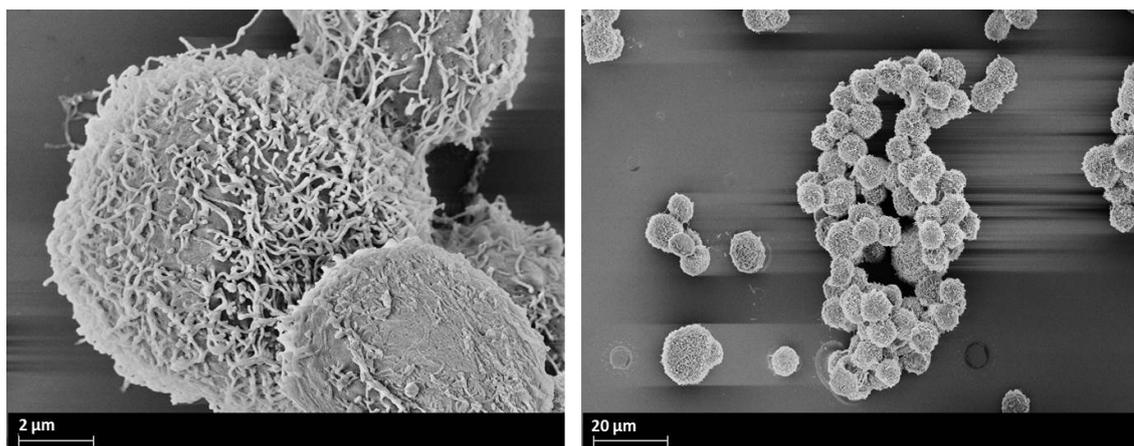


Abb. 1: Oberflächenstruktur von CHO-K1 Suspensionszellen.

Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) bei 50.000- bis 100.000-facher Vergrößerung (für Details siehe Kapitel 3.15.1).

CHO Zellen gehören heutzutage zu den gebräuchlichsten tierischen Zellen, die für Transfektion, Expression und Produktion von Proteinen im industriellen Maßstab eingesetzt werden. Inzwischen werden rund 70 % aller rekombinanten Proteintherapeutika in CHO Zellkulturen hergestellt [35]. Dabei werden bei Fed-Batch-Prozessen Zelldichten von über $2 \cdot 10^7$ Zellen/mL mit Endproduktkonzentrationen von bis zu 10 g/L erreicht [23]. In den 80er Jahren lagen die maximalen Werte noch bei $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL beziehungsweise Produktausbeuten von 100 mg/L [35]. Diese rasante Entwicklung der CHO Zelllinie innerhalb der letzten Jahre lässt sich durch mehrere Faktoren begründen. Einerseits haben die CHO Zellen, als eine seit über 20 Jahren in der pharmazeutischen Industrie genutzte Zelllinie, bewiesen, ein sicherer Wirt für die Produktion therapeutischer Proteine zu sein, was die Genehmigung neuer Herstellungsverfahren vereinfacht.

Ein zweiter Faktor ist eine hohe spezifische Produktivität, die durch eine gezielte Genamplifizierung des Zielprodukts erreicht werden kann. Bei der Genamplifizierung spielt die CHO-dhfr-Wirtszelllinie, die durch Mutagenese einer CHO-K1 Zelllinie etabliert wurde [36], eine entscheidende Rolle. Bei dieser Zelllinie sind beide Allele des Gens für das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) inaktiviert. Mit Hilfe eines Expressionsplasmids, das ein funktionelles DHFR-Gen enthält, und durch Verwendung eines entsprechenden Selektionsmediums entsteht ein effizientes Selektionssystem [35]. Dabei werden untransformierte Zellen erfolgreich selektiert, da diese kein Expressionsplasmid enthalten und ohne intaktes DHFR-Gen nicht in der Lage sind, in dem Selektionsmedium (ohne Glycin, Thymidin und Adenosin) zu wachsen. Mittlerweile haben sich auch weitere Selektionssysteme für CHO Zellen etabliert [37].

Der dritte entscheidende Aspekt ist die Fähigkeit der Zellen, eine korrekte Proteinfaltung und posttranslationale Modifikationen durchführen zu können [23]. Für viele rekombinante Proteine aus CHO Zellen wurde gezeigt, dass ihre Glykosylierung derjenigen des humanen Produkts entspricht bzw. sehr ähnlich ist [19]. Dadurch lassen sich mittels CHO Zellen, in Hinblick auf die pharmazeutische Entwicklung, Glykoproteine mit für den Menschen typischen Glykosylierungsmustern produzieren, wodurch die Gefahr von Immunreaktionen, wie sie bei nicht humaner Glykosylierung auftreten können, minimiert werden können [27].

Als letzter Faktor ist die leichte Adaption der ursprünglich adhärent wachsenden CHO Zellen an das Wachstum in Suspension in chemisch definierten, serumfreien Medien zu

nennen. Serumfreie Medien ermöglichen das Arbeiten unter definierten und kontrollierten Bedingungen, wodurch ein reproduzierbares Kultivierungsmilieu erzeugt und das Risiko von Kontaminationen minimiert werden kann [38, 39]. Außerdem vereinfachen protein- und serumfreie Medien den Aufreinigungsprozess des Endprodukts, da die Aufarbeitung des Zielproteins nicht durch andere Proteine beeinträchtigt wird. Dadurch kann eine der höchsten Kostenquellen in der biopharmazeutischen Produktion reduziert werden [19, 35]. Darüber hinaus ermöglichen Kultivierungen in Suspension eine kontinuierliche, direkte Probenahmen und somit auch die Kontrolle und Analyse von Zellen unter exakt definierten und physiologischen Bedingungen.

Durch genetische Anpassungen im Zuge der Etablierung einer Zelllinie sowie durch große Beanspruchungen bei der folgenden Kultivierung verändert sich der Metabolismus einer Zelle hinsichtlich der Effizienz oft auf nachteilige Weise [40]. Durch das Verständnis des Metabolismus können derartige Auswirkungen erkannt und beispielsweise durch eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen der Ausstoß toxischer Abfallprodukte wie Laktat oder Ammonium minimiert werden [23, 41–44]. Trotz der intensiven Erforschung der CHO Zellen und anderer tierischer Produktionszelllinien ist nur relativ wenig über den intrazellulären Metabolismus tierischer Zellkulturen bekannt [45, 46]. In Kapitel 2.2 werden die Grundlagen der Hauptstoffwechselwege von Zelllinien erläutert und mit denen primärer Zellen verglichen.

2.1.3 Systemintegration in der tierischen Zellkultur

In industriellen Prozessen werden tierische Zellen zumeist in Suspension in geregelten Bioreaktoren kultiviert. Nachteile bei der Kultivierung tierischer Zellen liegen in den niedrigen Proliferationsraten sowie den hohen Kontaminationsrisiken. Für die Prozessanalytik, die Kontrolle der Zellproliferation und die Optimierung ablaufender Prozesse müssen die Zellkulturen permanent überwacht werden. Eine manuelle Probenahme und die anschließende *off-line* Analyse der Proben sind zeitaufwendig, liefern die Ergebnisse zeitverzögert und erhöhen zudem das Kontaminationsrisiko. Daher sind automatisierbare, direkt an den Bioreaktor integrierbare Methoden zur Analyse und Überwachung tierischer Zellkulturen wünschenswert. Eine dauerhafte Integration von analytischen Systemen kann die Beeinflussung der Zellen, die durch manuelle Probenahmen entsteht, minimieren und sorgt dadurch für interpretierbare, reproduzierbare

und unmittelbare Ergebnisse [47]. Hierbei haben nicht-invasive, optische Methoden in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen [48–50]. Aber auch fluoreszenz-mikroskopische oder spektroskopische *on-line* Methoden werden bereits für die Überwachung von Zellkulturen eingesetzt [51–53]. Mit Hilfe sogenannter *In-situ* oder *At-line* Mikroskope können beispielsweise Informationen über die Zelldichte, Zellgröße und Morphologie gewonnen und gleichzeitig mikrobielle Kontaminationen frühzeitig erkannt werden [54, 55]. Insbesondere auch in Hinblick auf metabolomische Untersuchungen, bei denen der Einfluss auf die Zellen durch äußere Einwirkungen zu vermeiden ist, kann der Einsatz mikroskopischer *on-line* Analytik einen entscheidenden Vorteil darstellen. Der Einsatz eines *At-line* Mikroskop-Prototyps soll für diesen Zweck innerhalb dieser Arbeit getestet werden. Detaillierte Informationen können dem Kapitel 3.11 entnommen werden. Neben mikroskopischen Systemen hat in den letzten Jahren die Implementierung mikrofluidischer Systeme für *on-line* Messungen in der tierischen Zellkultur ein großes Forschungsinteresse erlangt. Der Einsatz von „Microfluidics“ in biologischen Experimenten wird im folgenden Kapitel kurz erläutert.

2.1.4 Microfluidics in der tierischen Zellkultur

Das Forschungsgebiet der Mikrofluidik stellt eine technologische Erweiterung im Bereich der Systembiologie dar, welches die Entwicklung von Technologien im Größenbereich von 1-1000 μm für die Prozessierung, Manipulation und Detektion von Flüssigkeiten und den in ihnen enthaltenen Molekülen oder Zellen umfasst [56]. Die Mikrofluidik bildet die Grundlage für eine Vielzahl von Anwendungen in der Medizintechnik, der Biotechnologie, der Biologie und in der Chemie. Mikrofluidische Systeme zeichnen sich besonders durch die hohe Parallelisierbarkeit von Prozessen, den geringen Probenverbrauch und niedrigere Kosten im Vergleich zu makroskopischen Analysesystemen aus [57]. Darüber hinaus bieten sie den Vorteil, funktionale Einheiten beispielsweise für die Probenahme, gezieltes Mischen, Inkubation, Auftrennung und Detektion auf einem einzigen Chip integrieren zu können. Dadurch besitzen mikrofluidische Technologien das Potential für die Realisierung ganzer miniaturisierter Labore [58, 59]. Das Konzept für solche Miniaturlabore (Lab-on-a-Chip) wurde Anfang der 1990er Jahre durch Manz et al. [60] und Harrison et al. [61] geprägt und hat bis heute zu einer rasanten Entwicklung auf dem Gebiet der Mikrofluidik geführt. In mikrofluidischen Systemen treten mit der Verringerung der strukturellen

Dimensionen physikalische Effekte in den Vordergrund, die makroskopisch vernachlässigbar klein sind [56]. Je kleiner die Systemstrukturen sind, desto größer ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Daher dominieren Kapillarkräfte und Oberflächenladungen über die Gravitation, so dass durch die Kapillarkraft ein rein passiver Flüssigkeitsantrieb in solchen Mikrosystemen erzeugt werden kann [62]. Zahlreiche Forschungsberichte befassen sich ausführlich mit den wirkenden physikalischen Kräften innerhalb der Mikrofluidik [63, 64]. Aufgrund der Systemminiaturisierung werden zudem reproduzierbare, experimentelle Bedingungen geschaffen, was beispielsweise den Erhalt einer nativen, physiologischen Umgebung von Zellen ermöglicht [65–67]. Insbesondere die Manipulation von Zellen und anderer biologischer Proben in mikrostrukturierten Systemen hat aufgrund ihres großen Anwendungspotenzials in der Biotechnologie ein weites Interesse geweckt und bietet neue Möglichkeiten um das dynamische Verhalten auf verschiedene äußere Einflüsse zu testen [67–69]. Neben der Verknüpfung funktionaler Mikromodule hat innerhalb der letzten Jahre auch die Entwicklung und Integration von komplett miniaturisierten analytischen Systemen, den sogenannten „micro total analysis systems“ (μ -TAS), stark zugenommen. Durch den Einsatz solcher Analysesysteme können die Limitierungen der Detektionsgrenzen, die in makroskopischen Systemen vorliegen, für die Messung diverser Moleküle umgangen werden [70–72].

Die Fortschritte in der Mikrofluidik ermöglichen neuartige Experimente zu grundlegenden Fragen in der Biologie, der Biotechnologie und in der biomedizinischen Forschung. Besonders im Bereich der Metabolomik treibt das Potential der mikrofluidischen Systeme, den Ablauf biologischer Reaktionen verfolgen und Metaboliten separieren und messen zu können, die Entwicklung stark voran [73]. So konnte beispielsweise der Arzneistoffwechsel in Leberzellen durch den Einsatz von mikrofluidischen Modulen für eine Festphasenextraktion sowie den integrierten Test der Zytotoxizität imitiert werden [74]. Auch qualitative und quantitative Stoffwechseluntersuchungen tierischer Zellen konnten durch die direkte Integration von Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie in einem Lab-on-a-Chip durchgeführt werden [75]. In Hinblick auf die Isolation von Zellkompartimenten für die separate Analyse zytosolischer und mitochondrialer Fraktionen wurde bereits ein mechanischer Zellaufschluss mittels sogenannter „Nanoknives“ (Nanomesser) durchgeführt [76, 77]. Dabei handelt es sich um mikrofluidische Prozess-

einheiten, bei denen die Zellen eine Schnittstelle passieren müssen, die kleiner ist als ihr Zelldurchmesser, so dass sie aufgrund der wirkenden Scherkräfte zerrissen werden. Bei experimentellen Anwendungen zeigte sich jedoch, dass der verwendete Mikrochip durch das aufgeschlossene Zellmaterial sehr schnell verblockt und unpassierbar wird, weshalb er für kontinuierliche Anwendungen nicht geeignet ist [76]. Um die Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus auf Basis integrierter, mikrofluidischer Systeme zu ermöglichen, besteht weiterhin der Bedarf an geeigneten Zellaufschlussmethoden, die das Potential der mikrofluidischen Implementierung besitzen.

2.2 Der Metabolismus tierischer Zellen

Bei vielen der heutzutage verwendeten Zellkultursysteme, wie auch den CHO Zellen, handelt es sich um kontinuierliche tierische Zelllinien, die beispielsweise durch ungerichtete Immortalisierung mittels Chemikalien erzeugt wurden [78]. Derartig immortalisierte Zellen weisen eine große Ähnlichkeit zu Tumorzellen auf und zeichnen sich durch einen hohen, deregulierten Metabolismus aus [79]. Aus diesem Grund unterscheidet sich der Stoffwechsel tierischer Zellkulturen *in vitro* in einigen Punkten signifikant von dem primärer Zellen *in vivo*. Im Gegensatz zu primären Zellen haben kontinuierliche Zellkulturen neben Glukose auch einen hohen Bedarf an Glutamin und setzen bei der Kultivierung große Mengen an Laktat und Ammonium in das Zellkulturmedium frei [80, 81]. Die Akkumulation dieser Stoffwechselprodukte beeinträchtigt sowohl das Zellwachstum und die Viabilität als auch die Qualität der gewünschten Produkte [82]. Das Ausscheiden dieser unvollständig oxidierten Intermediate ist durch eine äußerst ineffiziente Nutzung der Energiequellen begründet und führt zu einem erhöhten Bedarf an Substraten [83]. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über einige der wesentlichen Stoffwechselforgänge in tierischen Zellen gegeben werden. Zu den Hauptstoffwechselwegen zählen die Glykolyse, der Pentosephosphatweg, der TCA-Zyklus, die oxidative Phosphorylierung, die Glutaminolyse und der Metabolismus für andere Aminosäuren. Glukose und Glutamin stellen dabei die Hauptsubstrate der meisten Zellkulturmedien dar und bilden das Rückgrat der Energiegewinnung und der Proteinbiosynthese.

2.2.1 Glykolyse und Tricarbonsäurezyklus

Als Hauptenergiequelle wird Glukose im Zytosol zum größten Teil über die Glykolyse durch mehrere enzymatische Reaktionen zu Pyruvat verstoffwechselt, wodurch 2 Mol Adenosintriphosphat (ATP) pro Mol Glukose gebildet werden. Ausgehend vom Pyruvat können prinzipiell zwei Reaktionswege folgen. Der erste Weg katalysiert mittels Laktatdehydrogenase (LDH) die direkte Umsetzung zu Laktat, wobei NADH zu NAD^+ umgewandelt wird, welches dann wieder für den Ablauf der Glykolyse zur Verfügung steht. In primären Zellen und Insektenzellen wird der Großteil des Pyruvats jedoch in die Mitochondrien transportiert, wo es im Tricarbonsäurezyklus (TCA) durch die dehydrierende Decarboxylierung mithilfe des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDHC) zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. In einer weiteren Reaktion wandelt die Pyruvat-Carboxylase (PC) einen Teil des Pyruvats zu Oxalacetat um und füllt somit den TCA-Zyklus immer wieder mit neuen Intermediaten auf (anaplerotische Reaktion) [84]. Der TCA-Zyklus dient der Energiegewinnung durch den Katabolismus von Metaboliten, die in verschiedenen Stoffwechselwegen gebildet werden. Diese Metaboliten können an unterschiedlichen Reaktionsstellen in den Kreislauf des TCA-Zyklus einfließen, wobei die Hauptzufuhr über Acetyl-CoA erfolgt, das aus dem in der Glykolyse gebildeten Pyruvat erzeugt wird. Da der TCA-Zyklus im Gegensatz zur Glykolyse in den Mitochondrien tierischer Zellen stattfindet, entsteht eine Kompartimentierung der Stoffwechselreaktionen und der gebildeten Metaboliten. Wegen der direkten Interaktion beider Stoffwechselwege müssen die Intermediate von einem Kompartiment in das andere transportiert werden, wodurch letztendlich in Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität dynamische Konzentrationsunterschiede der Metaboliten vorliegen. Eine schematische Darstellung wesentlicher Interaktionen der kompartimentierten Stoffwechselreaktionen ist in Abbildung 2 gezeigt.

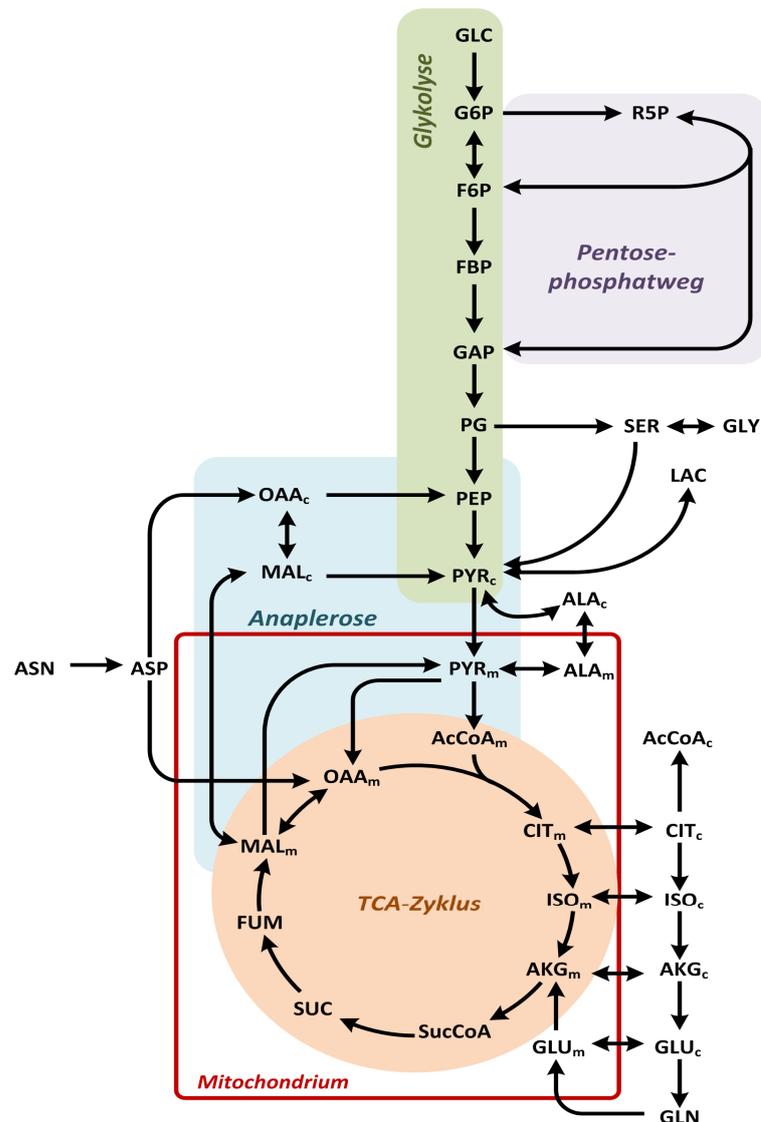


Abb. 2: Schematische Darstellung wesentlicher Interaktionen der kompartimentierten Stoffwechselreaktionen.

Metaboliten, die sowohl zytosolisch als auch mitochondrial vorliegen, sind aus Gründen der Übersichtlichkeit entsprechend markiert: Metaboliten im Zytosol der Zelle sind mit einem _c markiert; Metaboliten in den Mitochondrien sind durch ein _m gekennzeichnet. (Mit freundlicher Unterstützung von Judith Wahrheit.)

Das Acetyl-CoA hält innerhalb der Mitochondrien den TCA-Zyklus aufrecht, indem es mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert (katalysiert durch die Citratsynthase) und anschließend im TCA-Zyklus und während der oxidativen Phosphorylierung vollständig zu CO₂ und H₂O oxidiert wird [85]. Bei diesem Prozess werden theoretisch maximal 36 Mol ATP je Mol Glukose gewonnen, wobei die tatsächliche Ausbeute unter physiologischen Bedingungen niedriger ist (etwa 30 Mol ATP pro Mol Glukose) [86].

Im Vergleich dazu ergibt sich bei der Umwandlung des Pyruvats zu Laktat lediglich eine Energieausbeute von insgesamt 4 Mol ATP [87]. Obwohl dieser Reaktionsweg für die Energielieferung deutlich weniger effektiv ist, läuft er in vielen Tumorzellen dennoch bevorzugt ab [88]. In tumorigenen Zellen erfolgt die Verstoffwechslung von Glukose, wie bei vielen kontinuierlichen Zelllinien auch, über die aerobe Glykolyse [40, 89]. Diese Deregulierung führt dazu, dass die Glykolyse deutlich schneller abläuft und hierbei 95 bis 99,8 % der Glukose zu Laktat und Alanin umgesetzt werden [90, 91]. Das ausgeschiedene Laktat senkt einerseits den pH-Wert im Medium und führt selbst bei einem durch Regelung konstant gehaltenen pH-Wert zur Inhibierung des Wachstums und der Produktbildung [92–94].

Das Phänomen der aeroben Glykolyse („Warburg-Effekt“), das sich auch in Anwesenheit von Sauerstoff durch hohe Glykolyseraten bei gleichzeitiger Laktatbildung auszeichnet, ist bereits seit den 30er Jahren als ein Charakteristikum von Tumorzellen bekannt [95, 96]. Untersuchungen haben gezeigt, dass der Übergang der glykolytischen Intermediate in den TCA-Zyklus aufgrund fehlender Aktivität der entsprechenden Verbindungsenzyme Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), Pyruvat-Carboxylase (PC) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) unterbunden ist [81, 97, 98]. Als Gründe hierfür werden einerseits niedrige Expressionsraten der entsprechenden Enzyme angegeben [97] und andererseits die Hemmung der Enzymaktivitäten aufgrund von Phosphorylierungen genannt [99]. Die Blockade der enzymatischen Verbindung zum TCA-Zyklus führt somit zu einer Anhäufung des Pyruvats, da dieses nicht mehr über Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus eingebracht wird. Darüber hinaus können die erhöhten Glykolyseraten durch die Überexpression von Glukosetransportern und entsprechender Enzyme der Glykolyse erklärt werden [43, 100]. Damit der Ablauf der Glykolyse nicht zum Stillstand kommt, wird zur Regeneration des Wasserstoffakzeptors NAD^+ das Pyruvat im Zytosol in Laktat umgewandelt. Das erklärt die hohe Laktatfreisetzung und die hohe Laktatdehydrogenase-Aktivität in tierischen Zelllinien [99]. Die typischen Ausbeuten an Laktat liegen dabei zwischen 1 bis 2 Mol pro Mol Glukose [101, 102]. Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in einigen Zelllinien im Falle einer Glukose- und Glutaminlimitierung für die Energiegewinnung auch eine Wiederverwertung des akkumulierten Laktats erfolgen kann [103–105].

2.2.2 Pyruvatstoffwechsel: Verbindung zwischen Glykolyse und TCA-Zyklus

Als zentrale Enzyme des Pyruvatmetabolismus bilden die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (OGDH) das Rückgrat des Energiestoffwechsels tierischer Zellen. Beide Enzyme sind innerhalb der Mitochondrienmatrix lokalisiert. Sowohl bei dem PDH- als auch dem OGDH-Komplex handelt es sich um Multienzymkomplexe, die aus jeweils drei interagierenden Enzymen bestehen. Ihre Reaktionsmechanismen bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat bzw. α -Ketoglutarat sind analog zueinander [106]. Besonders der PDH-Komplex hat wegen seiner zentralen Rolle bei der Energiegewinnung und der Biosynthese während der vergangenen Jahre ein gesteigertes Forschungsinteresse erlangt. Innerhalb des zellulären Stoffwechsels werden Pyruvat, CoA und NAD^+ mittels PDH zu Acetyl-CoA, NADH und CO_2 umgesetzt, wodurch PDH eine direkte Verbindung der Glykolyse im zytosolischen Kompartiment mit dem TCA-Zyklus im mitochondrialen Kompartiment herstellt. Die Aktivität und Dynamik des PDH-Komplexes können dabei von Zelltyp zu Zelltyp variieren und unterscheiden sich unter *in vitro* Bedingungen deutlich von denen *in vivo* [107–109]. Die komplexen Regulationsmechanismen umfassen beispielsweise die Phosphorylierung und Dephosphorylierung, die allosterische Hemmung oder die Genexpression des PDH-Komplexes oder einzelner Proteine [110–112]. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsrate von PDH keiner linearen Dynamik folgt, die allein von der Pyruvatkonzentration abhängig ist, sondern einen oszillierenden Charakter aufweist [109]. Das α -Ketoglutarat hat im Metabolismus tierischer Zellkulturen einen besonderen Stellenwert, da es sowohl durch den Abbau von Pyruvat durch den TCA-Zyklus geleitet wird, andererseits aber auch durch den Abbau von Glutamin in diesen eingebracht werden kann. Diese Reaktion ist aufgrund der Deregulation des Stoffwechsels tierischer Zellen *in vitro* entscheidend, weshalb der OGDH-Komplex, der den weiteren Abbau des α -Ketoglutarats im TCA-Zyklus katalysiert, ebenfalls eine zentrale Rolle einnimmt. Aufgrund der Homologie des PDH- und des OGDH-Komplexes, können für OGDH ähnliche Wirk- und Regulationsmechanismen wie für PDH angenommen werden [106]. Eine schematische Darstellung der zentralen Rolle von PDH und OGDH im TCA-Zyklus ist in Abbildung 3 gezeigt.

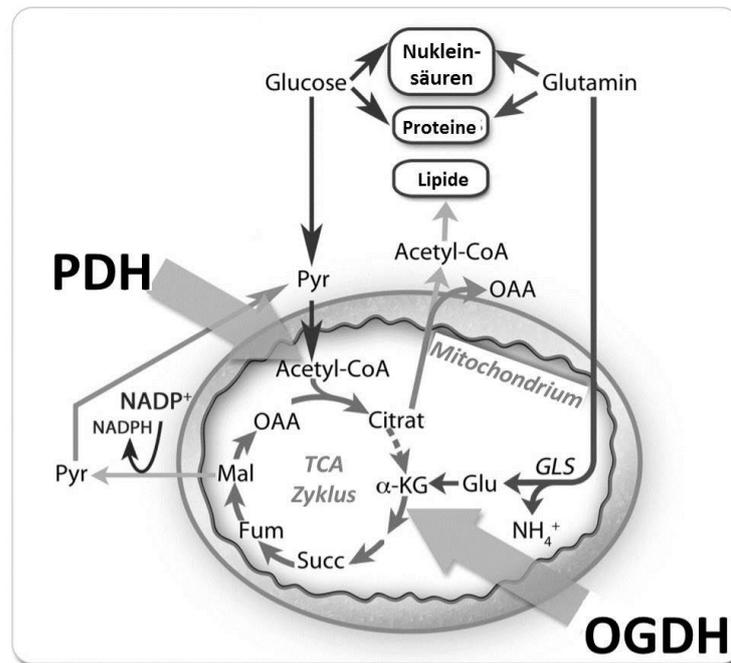


Abb. 3: Schematische Darstellung der zentralen Rolle von PDH und OGDH im TCA-Zyklus.

Der PDH- und OGDH-Komplex kontrollieren und leiten den Eintritt von Glukose- und Glutamin-abstammenden Kohlenstoffen in den TCA-Zyklus (adaptiert nach [106]).

Eine detaillierte Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus könnte neue Erkenntnisse über den Pyruvatstoffwechsel liefern und zu einer Optimierung tierischer Zelllinien beitragen oder letztendlich auch zu neuen Ansätzen im Bereich der Tumorforschung führen. In dieser Hinsicht könnte die Untersuchung der submitochondriale Verteilung der Enzyme PDH und OGDH und ihre dynamischen Veränderungen durch äußere Einflüsse einen entscheidenden Beitrag leisten.

2.2.3 Glutaminolyse

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln angesprochen, kann der glykolytische Abbau von Glukose in tierischen Zellen nur einen geringen Teil des gesamten Energiebedarfs decken [113, 114]. Daher wird das zweite im Medium enthaltene Hauptsubstrat Glutamin nach der Umwandlung zu Glutamat durch Glutaminase (GLS) ebenfalls zur Energiegewinnung verwendet [115]. Im Glutaminstoffwechsel wird das Glutamat durch die Glutamatdehydrogenase (GDH) zu α -Ketoglutarat deaminiert und in den TCA-Zyklus eingeleitet [45] (vergleiche Abb. 3). Das α -Ketoglutarat bildet dabei einen wichtigen Verbindungspunkt des TCA-Zyklus mit der Glutaminolyse bzw. der Glutaminsynthese und steht über verschiedene durch Enzyme katalysierte Reaktionen im Gleichgewicht mit Glutamat [116].

Als Nebenprodukt entsteht vorrangig Ammonium (0,7 Mol Ammonium pro Mol Glutamin), welches neben Laktat ebenfalls einen toxischen Effekt auf die Zellen hat [117, 118]. Für CHO Zellen wurde bei einer Ammoniumkonzentration von 8 mM/L ein Rückgang der Wachstumsrate um rund 50 % beobachtet [119]. Eine Optimierung des Metabolismus erscheint daher nicht nur für die Steigerung der Produktivität als sinnvoll, sondern auch für die Reduzierung unerwünschter Nebenprodukte wie Laktat und Ammonium. Neben seiner Funktion als Energiequelle dient das Glutamin auch als Stickstoffquelle bei der Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Aminosuktern und Asparginen. Die Verbrauchsraten der aeroben Glykolyse und der Glutaminolyse sind dabei stark miteinander verknüpft und hängen unter anderem von der Verfügbarkeit der einzelnen Substrate ab [83, 116, 120–122]. Untersuchungen in tierischen Zelllinien weisen darauf hin, dass eine erhöhte Aktivität des Glutaminstoffwechsels unter Glukose-limitierten Bedingungen mit einer erhöhten GDH-Aktivität korreliert [123].

2.2.4 Aminosäurestoffwechsel

Der Aminosäurestoffwechsel dient hauptsächlich der Synthese von Proteinen und ist über den TCA-Zyklus eng mit dem Primärmetabolismus verknüpft. Die Aminosäuren dienen jedoch nicht nur als Bausteine für die Proteinbiosynthese, sondern können beim Abbau ebenfalls zur Energielieferung durch die Bildung von Intermediaten des TCA-Zyklus dienen. In Zelllinien ist die Funktion der Aminosäuren als Energie- und Intermediatenlieferanten besonders ausgeprägt [40]. So kann der Abbau von ketogenen Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin und Tryptophan zur Bildung von Acetyl-CoA dienen und damit in Zelllinien die sehr schwache PDH-Reaktion kompensieren [124]. Einen Hinweis auf die energieliefernde Funktion dieser Aminosäuren bildet die Tatsache, dass diese während der Kultivierung in weitaus größeren Mengen konsumiert werden als für die Synthese von Proteinen nötig wäre [125–127]. Die Aminosäuren Alanin und Asparagin, die unter normalen Glutaminkonzentrationen ins Medium ausgeschieden werden, stehen bei Glutaminmangel wieder für die Energiegewinnung zur Verfügung. Beispielsweise durch die Bestimmung von Verbrauchs- und Produktraten mittels ¹³C-Markierungsexperimenten können direkte Rückschlüsse über den Aminosäurestoffwechsel – auch im Zusammenhang mit der Kompartimentierung des Stoffwechsels – erhalten werden [45, 81, 128–130].

2.3 Systembiologie und metabolische Analyse

Zur Optimierung und Steigerung der Produktivität bei der Kultivierung tierischer Zellen ist ein tieferes Verständnis der Zelle und der in ihr ablaufenden Vorgänge notwendig. Diesem Ansatz widmet sich der relativ neue Wissenschaftszweig der Systembiologie, dessen Etablierung auf einen Zeitraum um die Jahrtausendwende zu legen ist [131]. Ziel der Systembiologie ist das systematische Verständnis komplexer und dynamischer Abläufe der Zelle und der ihr zugrundeliegenden Prinzipien unter der Mitwirkung unterschiedlicher Disziplinen, wie beispielsweise der Biologie, der Computersimulation oder der Nanotechnik [132]. Als Basis zur Charakterisierung einer Zelle und aller regulatorischen Prozesse dient dabei die Technologie der „Omics“, die sich in drei Untergebiete, die Transkriptomics, Proteomics und Metabolomics, aufteilen lässt, wie sie in Abbildung 4 dargestellt sind [133]. Im Gesamtzusammenhang sollen die Daten, die auf genomischer, proteomischer und metabolomischer Ebene gewonnen werden, der Erforschung der komplexen Eigenschaften biologischer Systeme und dessen Wechselwirkungen dienen.

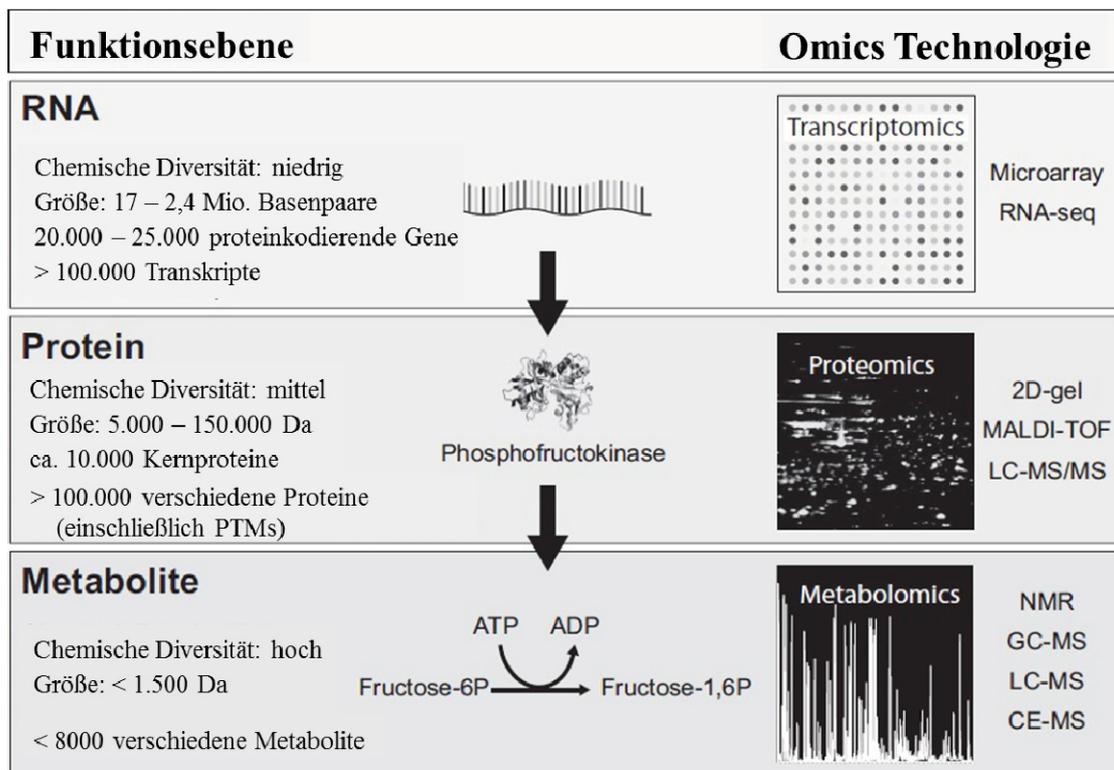


Abb. 4: Übersicht der drei Omics-Technologien.

Das Transkriptom dient der Erfassung der kompletten transkribierten RNA, das Proteom der Erfassung aller Proteine und das Metabolom der Analyse aller Metaboliten [133].

Hierfür werden die experimentell erarbeiteten Daten durch mathematische und heuristische Methoden simuliert, um so dynamische, realitätsnahe Modelle von physiologischen Reaktionen innerhalb der Zelle oder sogar ganzer Organismen zu entwickeln [131]. Durch Verwendung der erhaltenen Modelle sollen biologische Prozesse und ihr Verhalten gegenüber äußeren Einflüssen vorhersagbar werden, wodurch letztendlich neue Strategien entwickelt werden können um Zellen oder Zellverbänden gezielt zu manipulieren, zu kontrollieren und eine Optimierung der Zelleigenschaften zu ermöglichen.

Der Bedarf der metabolischen Optimierung von Organismen wird im Besonderen dadurch bedingt, dass tierische Zellen bei der Kultivierung *in vitro* einen deregulierten Metabolismus aufweisen. Wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, schlägt sich dies in erster Linie in überhöhten und ineffizienten Substratverbrauchsrate nieder, die zu einer vermehrten Produktion von häufig toxischen Stoffwechselprodukten und einer verminderten Produktivität bzw. Synthese des Zielprodukts führen [40].

Für die Steigerung der Produktivität von CHO Zellen wurden bereits zahlreiche Strategien entwickelt, um beispielsweise die Bildung dieser unerwünschten Stoffwechselprodukte zu vermeiden [45, 134]. Hierfür wurden Prozessparameter wie der pH-Wert, die Temperatur, CO₂ oder die Osmolarität optimiert [135–137] und komplexe Zufütterungsstrategien entwickelt, bei denen eine minimale Glukose- und Glutaminzufuhr oder der Austausch dieser durch andere Substrate getestet wurden [44, 138, 139]. Zudem wurde der Metabolismus von CHO Zellen gezielt genetisch verändert, um die anaplerotischen Reaktionen durch die Überexpression von Pyruvatcarboxylase-Genen [140] und Anti-Apoptose-Genen, wie beispielsweise Bcl-2 oder Bcl-xl [134, 141], zu erhöhen [22].

Um eine Optimierung einer Zelllinie durch eine positive Regulation des Metabolismus erzielen zu können, ist eine detaillierte Charakterisierung der metabolischen Reaktionen entscheidend. In diesem Zusammenhang hat der Forschungsbereich der Metabolomik in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Die Metabolomik (im Englischen: „Metabolomics“) befasst sich mit der Untersuchung des Metaboloms, welches die Gesamtheit aller charakteristischen Stoffwechseleigenschaften einer Zelle oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt beschreibt. In Anlehnung an die Bereiche der Transkriptomik und Proteomik bezeichnet die Metabolomik die gezielte Suche und Erfassung von Metaboliten, welche die funktionalen Endpunkte physiologischer Prozesse darstellen (siehe Abb. 4) [142]. Als ein derzeit aufstrebender Bereich innerhalb der

Systembiologie wurde der Begriff Metabolomik durch verschiedene Forschungsarbeiten geprägt, die einerseits grundlegende metabolomische Erkenntnisse beschreiben [131, 143, 144] und sich andererseits auf die angewandte Methodik für industrielle Zwecke [66] oder den Einsatz innerhalb der Zellkultur und der Arzneimittelforschung beziehen [145, 146]. Neben der Analyse von Metabolitkonzentrationen, Durchflussraten und Enzymaktivitäten einzelner, sowie der Untersuchung von Interaktionen verschiedener Stoffwechselwege, nimmt im Bereich der Metabolomik die Kompartimentierung der Stoffwechselwege innerhalb tierischer Zellen eine zentrale Rolle ein [147]. Eine besondere Herausforderung bei der Bestimmung des Metaboloms liegt in der hohen Diversität der Metaboliten, den schnellen Umsetzungsraten und der großen Konzentrationsunterschiede der Metaboliten, die von Kompartiment zu Kompartiment variieren können [45, 148]. Die Stoffflussanalyse (metabolic flux analysis) bildet hierbei eine wichtige Technik für die Charakterisierung intrazellulärer metabolischer Flüsse [149, 150]. Durch die Bestimmung der Stoffflüsse in lebenden Zellen können quantitative Informationen über die Wechselwirkungen und Verbindungen der verschiedenen Stoffwechselwege gewonnen werden [45]. Die Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten wird heutzutage routinemäßig mittels geeigneter Standardanalytik (z.B. LC-MS, NMR-Spektroskopie, GC-MS) ermöglicht. Manche Metaboliten oder Abweichungen im Metabolitenprofil können als Marker für bestimmte Krankheiten dienen oder Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden enzymatischen Reaktionen oder Stoffwechselwege zulassen, was die große Bedeutung für die gezielte Erforschung des Metaboloms aufzeigt. Für die Erforschung des Metaboloms wurden bereits verschiedene methodische Ansätze beschrieben, wie beispielsweise das „Metabolic Profiling“, „Metabolic Fingerprinting“, „Targeted Metabolomics“, oder „Metabolic Engineering“ [151–153]. Beim Metabolic Profiling wird nur eine spezielle Gruppe von Metaboliten analysiert, die mit einem bestimmten Stoffwechselweg assoziiert wird. Im Gegensatz dazu beschreibt das Metabolic Fingerprinting eine Gesamtanalyse des Metaboloms, wodurch eine Differenzierung zwischen Proben unterschiedlicher biologischer Herkunft ermöglicht wird. Der Bereich der Targeted Metabolomics befasst sich hingegen mit der gezielten quantitativen Analyse von ausgewählten Metaboliten. Diese Methode, wie auch das Metabolic Profiling, erlauben eine direkte biochemische Interpretation der erhaltenen Daten.

Die ausführliche Analyse metabolischer Netzwerke stellt einen zentralen Bereich der Systembiologie dar und soll letztendlich in der gezielten Optimierung des Stoffwechsels durch gentechnische Veränderungen der Ursprungszelle resultieren, dem sogenannten „Metabolic Engineering“ [154]. Die Anwendungsspektren des Metabolic Engineering sind sehr weitreichend und umfassen neben der Optimierung von Organismen für die Produktion von Biopharmazeutika oder Biokraftstoffen unter anderem die Entwicklung von neuen Diagnose- und Behandlungsmethoden für Krankheiten sowie Untersuchungen zur evolutionären Optimierung metabolischer Netzwerke [155].

2.4 Mitochondrien

Als Organellen eukaryotischer Zellen nehmen die Mitochondrien eine zentrale Rolle bei zahlreichen Stoffwechselreaktionen ein und stehen im regen Austausch mit dem Zytosol der Zelle. So wird das zuvor bei der Glykolyse im Zytosol entstandene Pyruvat in den Mitochondrien oxidativ decarboxyliert, wobei es mithilfe des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDHC) zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Der innerhalb der Mitochondrien stattfindende TCA-Zyklus und die oxidative Phosphorylierung dienen zum einen der Energiegewinnung in Form von ATP und zum anderen der Bereitstellung wichtiger Zwischenprodukte des Anabolismus [40]. Unter anderem durch die Beteiligung an diesen zwei wichtigen Abläufen bilden die Mitochondrien als räumlich abgeschlossene Organellen eine Schlüsselfunktion zum Verständnis der intrazellulären, kompartimentierten Stoffwechselvorgänge. Zahlreiche schwerwiegende Krankheiten wie beispielsweise Krebs, Alzheimer, nervendegenerative Erkrankungen oder Diabetes [2–6] können heutzutage auf eine Fehlfunktion der Mitochondrien zurückgeführt werden. Nicht zuletzt aus diesem Grund besteht ein außerordentliches Forschungsinteresse hinsichtlich der Mitochondrien, das unter anderem durch die modernen Bereiche der Systembiologie, Proteomic und Metabolomic stark vorangetrieben wird [156–158].

Mitochondrien unterscheiden sich von anderen Organellen insbesondere dadurch, dass sie eigene Ribosomen sowie eine eigene DNA, die mtDNA, besitzen und somit in der Lage sind einen Teil ihrer funktionellen Proteine selbständig zu synthetisieren. Da diese mtDNA im Gegensatz zur zellulären DNA nur geringe Reparatursysteme besitzt, ist sie besonders anfällig für Mutationen und kann bei pathogenem Verlauf zu Muskel- und Nervenkrankheiten führen [157]. Der Großteil der mitochondrialen Proteine wird durch die nukleäre DNA kodiert und im Zytosol synthetisiert. Die synthetisierten Proteine müssen anschließend über spezielle Transportproteine in die Mitochondrien transportiert werden. Zum Transport größerer Proteine sind sogenannte Protein-Translokasen (TOM: *translocase of the outer membrane*) notwendig, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind [159]. Sie transportieren die mitochondrialen Proteine, die nicht von den Mitochondrien selbst synthetisiert werden, vom Zytosol in den Intermembranraum. Analog zu den TOM-Komplexen befinden sich für den weiteren Proteintransport TIM-Komplexe (TIM: *translocase of the inner membrane*) in der inneren Mitochondrienmembran [160].

Somit erfüllen diese Protein-Translokasen essentielle Aufgaben, die für die Funktionalität der Mitochondrien entscheiden sind und bilden eine direkte Verbindung zwischen Zytosol und Mitochondrium. Obwohl bereits die zugrundeliegenden Transportmechanismen der beiden Translokase-Komplexe detailliert untersucht wurden [159], existieren kaum Untersuchungen, die sich mit der Dynamik und Verteilung der TOM- und TIM-Komplexe befassen [161]. Die Generation neuer Daten könnten in diesem Zusammenhang jedoch zusätzliche Informationen über die komplexen Regulationsmechanismen der Mitochondrien liefern und einen Beitrag für die Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus leisten.

2.4.1 Struktur und Aufbau

Strukturell nehmen Mitochondrien ebenfalls eine wesentliche Rolle innerhalb der Zelle ein. Das Verständnis der Struktur und des Aufbaus der Mitochondrien kann dabei helfen, die mitochondrialen Funktionen und die damit verbundenen zellinternen Abläufe zu verstehen und somit einen weiteren Faktor für die Optimierung des gesamten Metabolismus darstellen. Mitochondrien belegen einen Großteil des Zytoplasmas tierischer Zellen, wobei die Anzahl und Verteilung innerhalb der Zelle je nach Zelltyp stark variieren kann. In den meisten Zellen liegt die relative Menge des mitochondrialen Volumens zwischen 15 und 22 % [162], wobei die Volumendichte von den physiologischen Bedingungen abhängig ist [163, 164]. Die Form bewegt sich dabei meist von rund, sphärisch bis zylindrisch [165]. Die Durchmesser liegen bei 0,1 bis 0,5 μm sowie die Längen bei 1 bis 2 μm bei den zylindrischen Formen [166]. Der Aufbau eines Mitochondriums ist anhand einer elektronenmikroskopischen Aufnahme und einem simulierten Querschnitt in Abbildung 5 dargestellt. Der innere Raum des Mitochondriums wird als Mitochondrienmatrix bezeichnet. Die Matrix ist von einer Doppelmembran umgeben, deren Zwischenraum den Intermembranraum bildet. Die glatte, äußere Membran enthält zahlreiche Poren und Transportproteine (z.B. Porine), weshalb sie für die meisten Moleküle und kleinere Proteine durchlässig ist. Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die innere stark gefaltet und bildet sogenannte Cristae. Diese vergrößern die Membranoberfläche stark, was zu einem verbesserten Stoffaustausch zwischen der Matrix und der Umgebung führt [167].

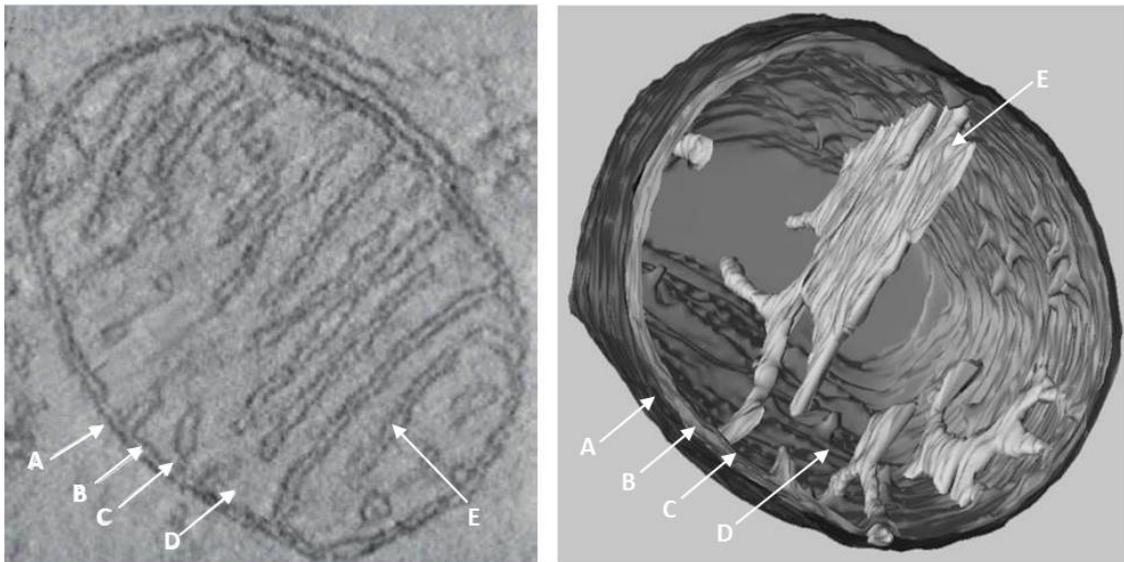


Abb. 5: Struktur und Aufbau eines Mitochondriums.

links: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondriums isoliert aus dem Kleinhirngewebe eines Huhns; rechts: Simulierter Querschnitt eines Mitochondriums in Anlehnung an elektronenmikroskopische Aufnahmen. A) Außenmembran, B) Membranzwischenraum, C) Innenmembran, D) Matrix, E) Cristae (angepasst nach [167] und [157])

Auf der inneren Membran sind die Proteine der oxidativen Phosphorylierung sowie Transportproteine, die Substrate und Stoffwechselprodukte in die Matrix hinein bzw. heraus transportieren, lokalisiert. Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die innere auch für kleinere Ionen selektiv, wodurch sie in der Lage ist einen Protonengradienten für die ATP-Synthese aufrechtzuhalten [157]. Aufgrund der Permeabilität der äußeren Membran ähnelt die Zusammensetzung des Intermembranraumes der des Zytosols, während die selektive innere Membran die Matrix sehr spezifisch umschließt und einen freien Austausch der mitochondrialen und zytosolischen Metaboliten verhindert [157].

Die Mitochondrien sind über das komplette Zytoplasma verteilt und an die länglichen Strukturen der Mikrotubuli gebunden [168, 169]. Bei Untersuchungen der Verteilung und Dynamik von Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass diese innerhalb tierischer Zellen generell nicht als starre und separierte Organellen vorliegen sondern in ständiger Interaktion miteinander stehen [170]. Die Dynamik, Form und Funktion von Mitochondrien wird dabei stark durch die Proteine des Zytoskeletts beeinflusst [168, 171]. Mithilfe der Mikrotubuli sind die Mitochondrien in der Lage sich innerhalb der Zelle zu bewegen und dabei durch die Mechanismen der kontinuierlichen Fusion und Teilung

komplexe Netzwerke untereinander auszubilden [171–173]. Hierbei kann mitochondriales Material ausgetauscht werden, sodass es zu einer Vergrößerung oder Verkleinerung der Organellen kommen kann. Diese dynamischen Interaktionen können einerseits dem Austausch von Proteinen dienen oder andererseits die Reparatur von schadhafter oder mutierter mitochondrialer DNA fördern und somit eine frühzeitige Zellalterung verhindern [174, 175]. Gleichzeitig verändern sich die mitochondrialen Strukturen auch in Abhängigkeit der physiologischen Bedingungen und des Energiebedarfs der Zelle [176]. Die Morphologie und Dynamik der Mitochondrien hat darüber hinaus auch eine zentrale Bedeutung bei der Apoptose. Bei vielen Krankheiten, die in Verbindung mit einer mitochondrialen Fehlfunktion gebracht werden, konnten veränderte Strukturen von Mitochondrien beobachtet werden, die daher auf eine Störung ihrer Morphogenese zurückzuführen sein könnten [177].

2.4.2 Mitochondrien und Apoptose

Neben der Energiebereitstellung erfüllen Mitochondrien weitere wichtige Funktionen beispielsweise durch die Regulation des Calcium-Haushaltes der Zelle und insbesondere durch die Auslösung des programmierten Zelltodes, der Apoptose. Die Apoptose kann z.B. durch DNA-Schädigung, oxidativen Stress oder hohe Ca^{2+} -Konzentration induziert werden [178], was zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt. Hierbei spielen als Apoptoseregulatoren die Proteine der Bcl-2 Familie eine entscheidende Rolle [179, 180]. Die Bcl-2 Proteine kontrollieren die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran und bewirken ebenso die Entstehung von proteinleitenden Poren, was zur Freisetzung mehrerer apoptotischer Faktoren, wie beispielsweise Cytochrom c und AIF (Apoptose induzierender Faktor), führt [180]. Das Protein Cytochrom c ist normalerweise an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt und löst durch seine Freisetzung in das Zytosol eine zum Zelltod führende Kettenreaktion aus. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass es während der Apoptose zu einer starken Strukturveränderung in den Mitochondrien kommt. Die innere Matrix verdichtet sich, sodass die einzelnen Verzweigungen der Cristae anschließend kaum noch zu differenzieren sind [167]. Die Mitochondrien beginnen sich komplett zu fragmentieren und erscheinen unter dem Mikroskop nun punktförmig. In der weiteren Folge kommt es zu einer Ansammlung der Mitochondrien um den Zellkern, bis schließlich ein Abbau der apoptotischen Zelle erfolgt [181, 182].

2.4.3 Isolation von Mitochondrien

In Hinblick auf die Kompartimentierung der Stoffwechselwege in tierischen Zellen ist eine separate Analyse der mitochondrialen und zytosolischen Metaboliten essentiell, um das Wissen über die *in vivo* Dynamik der wesentlichen Stoffwechselreaktionen zu erweitern [147, 183, 184]. Die effiziente Isolation und Separation der Mitochondrien bilden hierbei einen entscheidenden Schritt. Die Analyse der extrazellulären Metaboliten ist im Vergleich zur Analyse intrazellulärer Metaboliten relativ einfach und kann durch direkte Untersuchungen des Zellkulturmediums erzielt werden [46]. Durch eine Separation der Zellen von ihrem extrazellulären Medium und einer anschließenden Homogenisation des Zellmaterials, können auch die intrazellulären Metaboliten für entsprechende Analysen zugänglich gemacht werden. Hierbei werden jedoch die Stoffwechselprodukte der Zelle als Ganzes bilanziert, weswegen keine Informationen über die Interaktionen zwischen den Kompartimenten der Zelle erhalten werden können [45, 129]. Um eine separate Analyse der Metabolitenverteilung innerhalb der Zellkompartimente zu ermöglichen, ist eine Trennung der zytosolischen und mitochondrialen Kompartimente notwendig. Wegen des enormen Forschungsinteresses im Bereich der Mitochondrien wird die gezielte Isolation der Zellorganellen neben metabolischen Analysen auch für proteomische oder für genomische Untersuchungen eingesetzt. In der Literatur sind daher bereits mehrere Methoden für die Isolation von Mitochondrien beschrieben [185–188]. Dabei erfordert der Isolationsprozess meist mehrere Schritte der Probenvorbereitung. Hierzu gehören die Abtrennung der Zellen von ihrem extrazellulären Medium, das Abstoppen der Stoffwechselreaktionen (Quenching), der effiziente Zellaufschluss und schließlich die Separation der Organellen von den restlichen Zellbestandteilen [189]. Die am häufigsten angewendeten Separationsmethoden sind die Differentielle Zentrifugation und die Dichtegradientenzentrifugation [187]. Bei der Differentiellen Zentrifugation werden die einzelnen Zellbestandteile bei unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von ihrer Größe sedimentiert. Im Gegensatz dazu werden die Mitochondrien bei der Dichtegradientenzentrifugation aufgrund ihrer Dichte in einem Dichtegradienten von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt. Die Wahl einer geeigneten Isolationsmethode hängt dabei von den experimentellen Anforderungen an das isolierte Probenmaterial ab, wie beispielsweise die gewünschte Reinheit, Integrität, Aktivität oder

Ausbeute der Mitochondrien. Für Untersuchungen des kompartimentierten Metabolismus sind die Anforderungen an eine entsprechende Methode hoch:

- Die Methode muss aufgrund der hohen metabolischen Umsatzgeschwindigkeit möglichst schnell sein,
- sie darf den nativen Stoffwechsel nicht beeinträchtigen,
- sie muss hohe, quantifizierbare Ausbeuten liefern
- und die Methode sollte die Mitochondrien idealerweise nicht beschädigen.

Besonders in Hinblick auf separate, metabolomische Analysen ist der Erhalt der Mitochondrienintegrität zwingend notwendig, um eine Vermischung der kompartimentierten Metabolitenpools zu umgehen [190]. Eine schematische Darstellung zur Separation der verschiedenen Metabolitenpools ist in Abbildung 6 gezeigt.

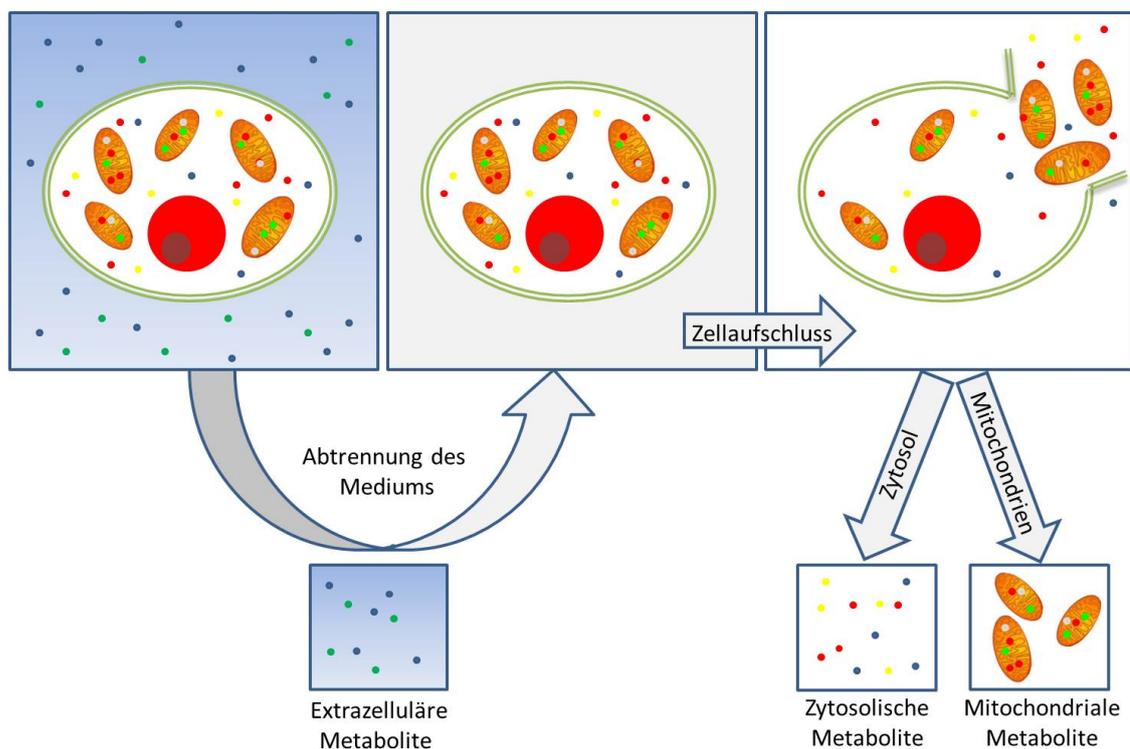


Abb. 6: Schematische Darstellung zur Separation extrazellulärer, zytosolischer und mitochondrialer Metaboliten.

Aufgrund der Kompartimentierung tierischer Zellen können unterschiedliche Metaboliten in verschiedenen Konzentrationen im Zytosol und in den Mitochondrien vorliegen. Durch einen Zellaufschluss und die Freisetzung der Mitochondrien kann eine Separation der Metabolitenpools erzielt werden.

Zellaufschlussmethoden für die Isolation von Mitochondrien

Während des Isolationsprozesses kann insbesondere der Zellaufschluss eine Beschädigung der Mitochondrien bewirken. Als Zellaufschluss bezeichnet man die Zerstörung der Zellwand bzw. Zellmembran, welche in der Regel für die Gewinnung intrazellulärer Bestandteile (Proteine oder Organellen) eingesetzt wird. Während der Aufschluss effizient erfolgen muss, um eine hohe Produktfreisetzung zu erzielen, sollte der destruktive Einfluss auf die gewünschten Isolate so gering wie möglich gehalten werden. Zu den gängigen Methoden, die für den Aufschluss tierischer Zellen verwendet werden, zählen die Dounce- und Potter-Elvehjem Homogenisation [191, 192], die Stickstoff-Dekompression [193–195], die Ultraschallbehandlung [196, 197], chemische oder enzymatische Zelllyse sowie das Schockgefrieren und Auftauen [197, 198]. Da diese Methoden die Zellmembranen zerstören, besitzen sie ebenso das Potential die Mitochondrienmembranen zu beschädigen [199]. Besonders Ultraschallbehandlungen, die auch für den Aufschluss von Bakterienzellwänden herangezogen werden, haben häufig einen negativen Einfluss auf die Integrität der Mitochondrienmembranen [187, 200, 201]. Aus diesem Grund muss jede dieser Anwendungen in Hinblick auf die Isolation intakter Mitochondrien kritisch betrachtet und optimiert werden.

Für die Isolation von Organellen aus tierischen Zellen hat sich in den vergangenen Jahren der Zellaufschluss mittels Dounce- oder Potter-Elvehjem Homogenisator zur Methode der Wahl entwickelt und wird daher bevorzugt für zahlreiche experimentelle Analysen von Mitochondrien eingesetzt [185, 188, 191, 202]. Hierbei werden die Zellen durch die Scherkräfte bei der mechanischen Reibung eines Pistills in einem Glaskolben homogenisiert. Als die derzeit gängigste Methode soll innerhalb dieser Arbeit der Zellaufschluss mittels Dounce-Homogenisator als Referenz für alle weiteren Methoden dienen.

Im Vergleich zur Dounce-Homogenisation wurden bislang nur wenige Untersuchungen über die Mitochondrienisolation mittels Ultraschall durchgeführt [196]. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass bei der Ultraschallhomogenisation Wärmeenergie freigesetzt wird, die zur Denaturierung von Proteinen und somit zur Beeinträchtigung der Mitochondrien führen könnte. Andererseits kann der hohe Energieeintrag auch zur Zerstörung der Mitochondrienmembranen führen, weshalb diese Methode für den Erhalt intakter Organellen potentiell als ungeeignet erscheint. Allerdings konnten

Forschungsergebnisse unlängst zeigen, dass durch den Einsatz von Ultraschall ebenfalls Mitochondrien in hoher Quantität und Qualität aus tierischen Zellen isoliert werden konnten. Da der Einsatz von Ultraschall schnell erfolgen kann und diese Methode ebenfalls ein hohes Automatisierungspotential im Bereich der Mikrochiptechnologie aufweist, sollte Ultraschall auch innerhalb dieser Arbeit verwendet werden.

Die Verwendung von chemischen Detergenzien (z.B. Triton) für den Zellaufschluss könnte zu einer Beeinträchtigung des Metabolismus führen und zudem eine Lyse der Mitochondrienmembranen bewirken. Andererseits haben aktuelle Untersuchungen bewiesen, dass das Detergens Digitonin eine effektive Permeabilisierung der Zellmembran bewirkt, während die Mitochondrienmembranen unbeschädigt bleiben [203].

Die irreversible Elektroporation steht im Fokus vieler aktueller Studien [204, 205]. Diese Methode besitzt das Potential Organellen freizusetzen, ohne dabei deren Integrität zu beeinträchtigen [206, 207]. Sowohl eine chemische Permeabilisierung, als auch die Verwendung von Elektroporation ließen sich technologisch in mikrofluidische Systeme integrieren [208, 209], weshalb auch diese Methoden im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen sollen.

2.5 Der Zellzyklus im metabolischen Zusammenhang

Der Stoffwechsel und mit ihm die Aktivität und Dynamik von Mitochondrien in tierischen Zellen sind von zahlreichen Faktoren abhängig. Neben den physiologischen Bedingungen betrifft ein wesentlicher Faktor die Zellproliferation. Die Vermehrung tierischer Zellen im Kultivierungsprozess erfolgt durch direkte Zellteilung, der sogenannten Mitose. Dabei durchlaufen die Zellen eine wiederkehrende Folge von Schritten, die schließlich zur Verdopplung der Zellen führt. Dieser Vorgang wird auch als Zellzyklus bezeichnet. Die Länge des Zellzyklus variiert je nach Zelltyp und beläuft sich für tierische Zellen auf einen Zeitraum zwischen zwei und 50 Stunden [210]. Der Zellzyklus lässt sich in mehrere Phasen unterteilen. Eine erste grobe Unterteilung erfolgt durch die Aufteilung in zwei Abschnitte, den reinen Prozess der Zellteilung, die Mitose, und den Prozess des Wachstums und der Verdopplung des gesamten Zellinhaltes, die Interphase. Die Interphase lässt sich wiederum in drei weitere Phasen unterteilen, wie in Abbildung 7 veranschaulicht ist. Die zentrale Phase der Interphase ist die S-Phase (S = Synthese), in der eine Verdopplung der Chromosomen und somit die Replikation der DNA stattfindet [211].

Dieser Vorgang gewährleistet, dass eine identische Kopie des genetischen Materials der Ausgangszelle gebildet wird. Die S-Phase nimmt in den meisten tierischen Zellen zeitlich etwa die Hälfte der Zellzyklusdauer ein [212].

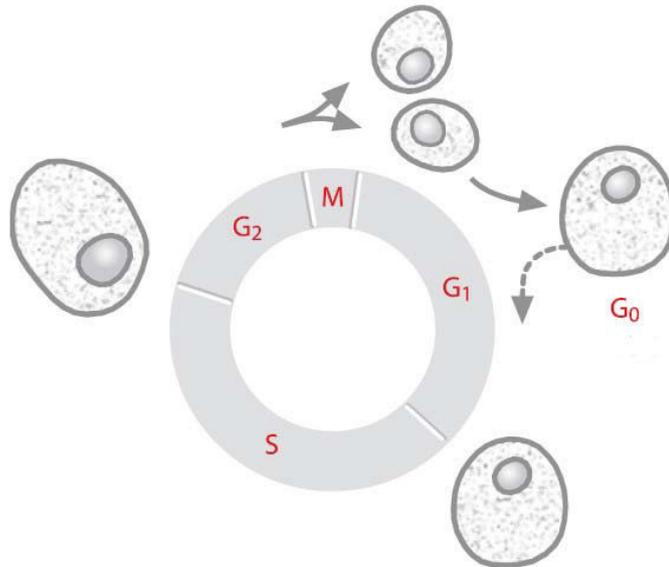


Abb. 7: Schematische Darstellung des Zellzyklus tierischer Zellen.

Die Länge der jeweiligen Phasen kann je nach Zelltyp variieren. (übernommen aus [213])

(G0/1: diploid = Chromosomensatz $1n$, G2: tetraploid = Chromosomensatz $2n$, S: zwischen di- und tetraploid = Chromosomensatz zwischen $1n$ und $2n$)

Zwischen der Mitose und der S-Phase befinden sich zwei sogenannte Lückenphasen, um den Zeitbedarf für die Synthese von einem zweiten Satz an Organellen und Proteinen zu decken. Diese Lücken werden als G1- und G2-Phasen (G = Gap) bezeichnet [211]. Da der Übergang von der G2- zur Mitose- (M) Phase oft nicht direkt differenziert werden kann, werden diese Phasen auch zusammengefasst als G2/M-Phase deklariert.

Entsprechend der verschiedenen Phasen und Energieansprüche für die Replikation der Zelle verändern sich auch der Metabolismus und die Genexpression innerhalb eines Zellzyklus mehrfach [214, 215].

2.5.1 Mitochondriale Zellzyklusabhängigkeit

Auch die Verteilung und Morphologie der Mitochondrien innerhalb der Zellen verändert sich in Abhängigkeit des Zellzyklus [216, 217]. Für die Morphologie der Mitochondrien in Abhängigkeit des Zellzyklus sind in der Literatur drei verschiedene Formen beschrieben: die retikuläre Form, die fragmentierte Form und die intermediäre Form, die eine Zwischenform von retikulär zu fragmentiert darstellt [218–220]. Diese morphologischen Formen sind am Beispiel humaner Osteosarkomzellen in Abbildung 8 veranschaulicht. Bei der retikulären Form bilden die Mitochondrien netzwerkartige, längliche Strukturen aus und können nicht als separate Organellen identifiziert werden. Für eine normale Mischpopulation, in welcher die Zellen in einer heterogenen Zellzyklusphasenverteilung vorliegen, wurde gezeigt, dass die intermediäre Form am häufigsten auftritt [220]. Die Mitochondrien liegen dort zum Teil fragmentiert als auch retikulär, in einigen Netzwerken vor. Im Laufe der Interphase von der G1-Phase bis hin zum Anfang der S-Phase findet eine vermehrte Bildung von Netzwerken statt. Die Bildung der Netzwerke lässt sich auf den erhöhten Energiebedarf und eine flächige Energiedistribution, die während der Interphase benötigt wird, zurückführen. Bedingt durch die Bildung der Netzwerke entstehen ein höherer ATP-Ausstoß und eine gesteigerte Biosyntheserate für Proteine und Fette, was für eine Zellreplikation essentiell ist. Im Anschluss spalten sich die Netzwerke auf, sodass gegen Ende der G2-Phase größtenteils fragmentierte Mitochondrien vorliegen. Für die dann folgende Zellteilung kann somit eine gleichmäßige Verteilung der Mitochondrien und ihrer mtDNA auf die Tochterzellen gewährleistet werden [219, 220].

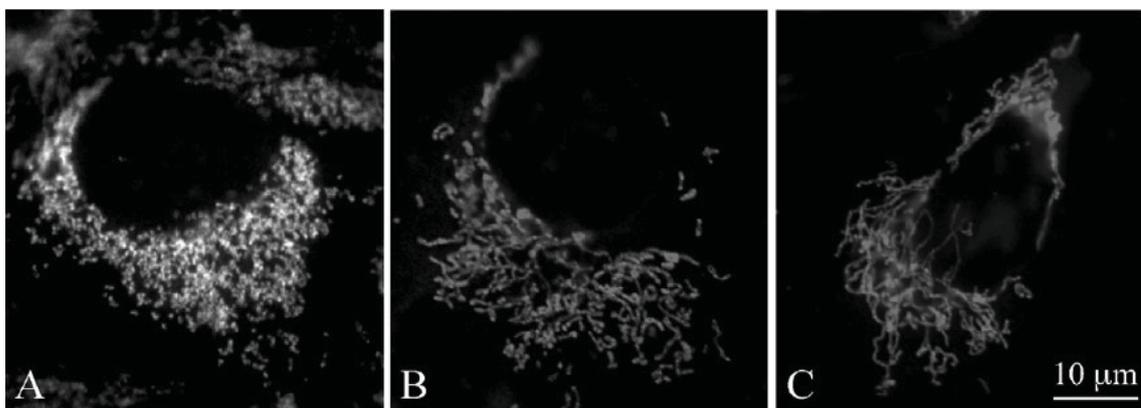


Abb. 8: Morphologie und Verteilung von Mitochondrien in Abhängigkeit vom Zellzyklus.

Die Morphologie und Verteilung ist am Beispiel von humanen Osteosarkomzellen (Färbung mittels MitoTracker rot) gezeigt. A) fragmentiert (G2/M-Phase), B) intermediär, C) retikulär (Interphase). (übernommen aus [219]).

2.5.2 Zellsynchronisation

Die Kultivierung tierischer Zellen erfolgt normalerweise mit einer Mischpopulation, bei der die Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus heterogen verteilt vorliegen, sodass keine differenzierten Untersuchungen der einzelnen Phasen erfolgen können. Zum weiteren Verständnis des Zellzyklus und den mit diesem verbundenen Abläufen innerhalb der Zelle besteht der Bedarf, die Zellzyklusphasen getrennt voneinander zu betrachten. Eine Möglichkeit dies zu erreichen besteht in der Kultivierung einer synchronisierten Zellpopulation. Bei einer Zellsynchronisation wird eine Mischpopulation den Zellzyklusphasen entsprechend aufgetrennt. Hierbei stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich hauptsächlich in chemische und physikalische Varianten einteilen lassen. Bei den chemischen Verfahren wird meistens ein Detergens eingesetzt, das den Zellzyklus in einer bestimmten Phase blockiert. So sind für die Arretierung der S-Phase mehrere Chemikalien bekannt, die die DNA-Replikation durch die Inhibierung bestimmter Enzyme aufhalten [221–224]. Durch den Einsatz des Alkaloids Demecolcin kann eine Rückhaltung der Zellen in der M-Phase erzielt werden, indem die Bildung der bipolaren Spindel während der Mitose verhindert wird [225]. Die chemischen Methoden können zwar hohe Synchronitätsraten erzielen, allerdings wird durch das erzwungene Zurückhalten der DNA-Synthese und die toxischen Wirkungen der Chemikalien ein fehlerhaftes weiteres Wachstum induziert [221–224]. Zudem beeinträchtigen die eingesetzten Chemikalien den Metabolismus der Zellen stark [17], weshalb diese Methoden zur Zellsynchronisierung für metabolische Analysen nicht geeignet sind.

Den physikalischen Methoden ist der Vorteil gemein, dass der Metabolismus und die Viabilität der Zellen nicht oder nur in sehr geringem Maß beeinträchtigt wird [17]. Dies macht sie bei einer sich an die Synchronisierung anschließenden Kultivierung mit Untersuchung des Metabolismus zum Mittel der Wahl. Zu den ältesten physikalischen Methoden der Zellsynchronisierung zählt das „Mitotic-shake-off“, welches bei adhären wachsenden Zelllinien angewandt werden kann. Dabei werden Zellen, die sich gerade geteilt und noch keine feste Bindung erlangt haben, losgeschüttelt und so von den restlichen Zellen abgetrennt [221, 226]. Allerdings ist diese Methode nicht für Suspensionszellen anwendbar und auch aufgrund der sehr geringen Ausbeute limitiert [17, 222]. Durch die Reduktion der Kultivierungstemperatur (30-34°C) konnte gezeigt werden, dass Zellen in der G1/G0-Phase arretiert werden können [214, 227, 228]. Diese Methode

wurde bereits für CHO Zellen eingesetzt, allerdings führt die eingesetzte Temperatursenkung zu einer erheblichen Änderung der physiologischen Bedingungen, so dass ebenfalls eine Änderung des Metabolismus während dieses Prozesses stattfindet [228]. Für Zellen, die in Suspension wachsen, kann die Elutriation mittels Gegenstromzentrifugation für die Fraktionierung der Zellzyklusphasen verwendet werden [229]. Bei dieser Methode erfolgt eine Auftrennung der Zellpopulation entsprechend ihrer Größe und Dichte, die aufgrund des Zellwachstums im Laufe der Interphase mit den jeweiligen Zellzyklusphasen korrelieren. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der Einfluss auf den Metabolismus sehr gering gehalten werden kann und die fraktionierten Zellen auch aufgrund ihrer hohen Viabilität weiter kultiviert werden können. Die Etablierung der innerhalb dieser Arbeit eingesetzten Methode erfolgte für tierische Suspensionszellen im Vorfeld durch Oscar Platas Barradas [230]. Eine detaillierte Beschreibung kann dem Kapitel 3.12 und den entsprechenden Referenzen [229, 230] entnommen werden. Der Grad der Synchronität der erhaltenen Zellfraktionen oder einer Zellpopulation im Verlauf einer Kultivierung kann heutzutage sehr präzise mittels durchflusszytometrischer Analysen des DNA-Gehaltes bestimmt werden [231, 232].

Eine Analyse des Metabolismus derart synchronisierter und anschließend kultivierter Zellen kann einen Aufschluss über die Abläufe innerhalb einzelner Phasen des Zellzyklus geben und damit einen weiteren Beitrag zur Optimierung von Zelllinien leisten [17]. Darüber hinaus ist eine differenzierte Betrachtung der metabolischen Zellzyklusabhängigkeit natürlich auch für die Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus von großer Bedeutung um aus den separaten Metabolitenanalysen gezielte Zusammenhänge zu physiologischen Parametern ableiten zu können.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Erlenmeyerkolben Polycarbonat 125 mL, 250 mL mit Filterschraubverschluss	Corning Inc., Kennebunk, USA
Einmalhandschuhe, Latex	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalhandschuhe, Nitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kryoröhrchen 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Luer-Lock Spritzen 2 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzen Omnifix 3 mL, 10 mL	B. Braun Melsungen AG
Spritzenvorsatzfilter Minisart 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
Sterilfilter „Millex-FG50“	Millipore, USA
Serologische Pipetten 2 mL, 5mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
T-Flaschen, 25 mL, 75 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten 6-, 12-, 24- und 96-Lochplatten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Kultivierungsröhrchen mit Filterschraubverschluss 15 mL, 50 mL	TPP AG, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (Falcon Tubes) 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Einmalküvetten, Polystyrol	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Gene Pulser Cuvettes 0,4 cm (Küvetten für Elektroporation tierischer Zellen)	Bio-Rad
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schläuche „PharMed“ Polytetrafluorethylen Innendurchmesser 1,6 mm	Saint-Gobain, Frankreich
Silikonschläuche Innendurchmesser 1 mm Außendurchmesser 7 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmans-Reagenz)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
α -Ketoglutarat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acetyl Coenzym A Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ammoniumacetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Calcein-AM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Citratsynthase (isoliert aus Schweineherz)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Comassie-Brilliantblau G-250	Merck KgaA, Darmstadt
Desinfektionsmittel „Sterilium“	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Digitonin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dithiolthreitol (DTT)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 96 % vergällt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 99,8 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ferrocyclochrom c	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fluorwasserstoffsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
[U- ¹³ C ₆] Glukose	Euriso-top GmbH, Saarbrücken
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Monokaliumphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
n-Amylacetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
n-Dodecyl- β -D-Maltosid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs
Oxalessigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	VWR International GmbH, Darmstadt
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
pH-Kalibrierlösung pH 4,01 und 7,01	Hanna Instruments, USA
Phosphorsäure 85 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Poly-L-Lysin 0,1 % (w/v)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteaseinhibitor Cocktail P8340,	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyruvat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Saccharose (Sucrose)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure 37 % (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris Base	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau 0,5 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Tom20 (FL-145): sc-11415	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-Rabbit IgG (H&L) Secondary Antibody (DyLight™ 488)	Antibodies-Online GmbH
<i>Für In-Cell ELISA:</i>	
PDH E1a pSer232 Primary Antibody	MitoSciences, USA
PDH E1a pSer293 Primary Antibody	MitoSciences, USA
PDH E1a pSer300 Primary Antibody	MitoSciences, USA
PDH Total E1a Primary Antibody	MitoSciences, USA
HRP-labeled Secondary Antibody	MitoSciences, USA
AP-labeled Secondary Antibody	MitoSciences, USA
Anti-OGDH Antibody (ab110306)	MitoSciences / Abcam, USA
Goat anti-Mouse IgG1 (HRP) Secondary Antibody (ab98693)	MitoSciences / Abcam, USA
<i>Für STED-Mikroskopie:</i>	
Anti-Tom20 (FL-145): sc-11415	Santa Cruz Biotechnology
PDH Total E1a Primary Antibody	MitoSciences, USA
Anti-OGDH Antibody (ab110306)	MitoSciences / Abcam, USA
Goat anti-rabbit ATTO647N (AttoTec)	Jackson ImmunoResearch Laboratories

3.4 Kits

In-Cell ELISA Support Pack – Suspension Cell MS922	MitoSciences, USA
PhosphoPDH In-Cell ELISA Kit Colorimetric MSP48	MitoSciences, USA
Citrate Synthase Assay Kit	Sigma Aldrich
Cytochrome c Oxidase Assay Kit	Sigma Aldrich

3.5 Geräte

Laborgerät	Hersteller
Analysenwaage „Analytik AC 210S“	Sartorius AG, Göttingen
Analysenwaage „Precisa 4200“	Precisa Gravimetrics AG, Schweiz
Autoklav	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim
Brutschrank CO ₂ „HeraCell“	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Cleanbench MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific, USA
Digitalkamera Olympus Camedia C-4040	Olympus Corporation, Puchheim
Einfrierbox „Mr. Frosty“	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Elektroporationsapparatur	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Japan
FPLC BioLogic Duo-Flow System	Bio-Rad, München
Glasflaschen 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L, 5 L	Schott AG, Mainz
Inkubator Hera Cell 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inkubatorthermometer	VWR International GmbH, Darmstadt
Kryobehälter MVE	MVE Cryogenics
Konfokalmikroskop, Confocal Microscope C1	Nikon, Japan
Kritische-Punkt-Trocknungsanlage	Balzers CPD 030, Liechtenstein
Magnetrührer „Ikamag Reo“	IKA GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Axioplan, Durchlicht	Zeiss, Deutschland
Partikelzähler „Coulter-Counter“ Z2	Beckman Coulter, Krefeld
pH-Meter „CG822“	Schott AG Mainz
Pipetten Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Research Mehrkanal	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe „Automatic Sarpette“	Sarstedt AG, Nürnbrecht
Pistill-Homogenisator nach „Dounce“ (Handhomogenisator Glas-Teflon)	Sartorius AG, Göttingen

Photometer „SmartSpec Plus“	Bio-Rad, München
Polaron High Resolution Sputter Coater	Polaron Equipment Ltd., England
Rasterelektronenmikroskop, Leo Gemini 1530	Carl Zeiss, Jena
Schüttelkolben 100 mL, ohne Schikane	Schott AG, Mainz
Schüttler „GFL 3005“	Omnilab
Spinnerflaschen 100 mL, 250 mL	Techne AG, Jahnsdorf
Spritzenpumpe AL1000	World Precision Instruments Germany GmbH
Spektralphotometer Multiscan Spectrum	Thermo Fisher Scientific, USA
Ultraschallhomogenisator „Branson Sonifier [®] Cell Disruptor“	Branson
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad „SW22“	Julabo UC, Seelbach
YSI 7100 MBS Analyzer (Multiparameter Bioanalysestystem)	YSI Incorporated Life Sciences, USA
Vortexer „Vortex Genie 2“	Bender & Hobein, Deutschland
Zählkammer (Neubauer)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifuge „Biofuge fresco“	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge „Minifuge RF“	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Zubehör Reaktorkultivierung**Hersteller**

Bioreaktor „Vario 1000“	Medorex e. K., Nörten-Hardenberg
Engineering Software „PC Worx 5.20.17“	Phoenix Contact, Blomberg
Gelöstsauerstoff-Sonde (pO ₂)	Mettler Toledo, USA
Peristaltikpumpe „101 U“	Watson Marlow, England
Peristaltikpumpe „TL 10“	Meredos GmbH, Nörten-Hardenberg
pH-Sonde „405-DPAS-SC-K8S“	Mettler Toledo, USA
Regeleinheit für pO ₂ und pH	Bioengineering, Schweiz
Wasserbad „Ecoline RE 104“	LAUDA GmbH, Lauda-Königshofen

Zubehör at-line Mikroskop**Hersteller***At-line* Mikroskop

Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, AK Scheper

Kamera „XCD-SX 910“

Sony, Japan (Leihgabe des Instituts für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover)

LED

Osram AG, München

Netzteil Labor „DIGI 35“

Conrad, Hirschau

Peristaltikpumpe „505 U“

Watson Marlow, England

Software at-line Mikroskop
„Insitu Control“

Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, AK Scheper

Wärmeschrank „WB 120“

Mytron GmbH, Heilbad Heiligenstadt

Durchflusszytometer**Hersteller**

LSR II

BD Biosciences, Heidelberg

Software „FACS Diva 6.13“

BD Biosciences, Heidelberg

Argon Laser (488 nm)

Coherent, USA

Komponenten und Spezifikationen:

Laser

488 nm (blue octagon)

Spektreinstellung PE

Bandpassfilter 575/26 nm,
(550 nm dichroitischer Langpassspiegel)

Spektreinstellung SSC

Bandpassfilter 488/10 nm,
(kein dichroitischer Spiegel)**Elutriator****Hersteller**

Zentrifuge „Avanti“

Beckman Coulter, Krefeld

Rotor „JE 5.0“

Beckman Coulter, Krefeld

Einstellungen und Spezifikationen:

Umdrehungszahl der Zentrifuge

1800 rpm

Temperatur der Zentrifuge

23 °C

Pumpraten

Einstellung erfolgte je nach Zellzyklusphase im Bereich von 20 bis 50 mL/min

3.6 Zelllinien

Stammbezeichnung	Quelle/Organismus	Wachstumsart	Herkunft/Quelle
CHO-K1	<i>Cricetulus griseus</i> (Chinese Hamster Ovary)	Suspension (adaptiert)	Universität Bielefeld AK Zellkulturtechnik ATCC® Number: CCL-61™
CHO ^{SFS} GFP	<i>Cricetulus griseus</i> (Chinese Hamster Ovary)	Suspension (adaptiert)	Institut für Technische Chemie Hannover, AK Scheper

Für alle Kultivierungen und Analysen wurde die Zelllinie CHO-K1 verwendet, welche ursprünglich aus den Ovarien des chinesischen Hamsters gewonnen wurde und durch die Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld (Prof. Thomas Noll) an das Wachstum in Suspension sowie in serum- und proteinfreiem Medium adaptiert wurde. Für eine Reihe fluoreszenzmikroskopischer Experimente mit CHO Zellen wurde die Zelllinie CHO^{SFS}GFP verwendet, welche das grün fluoreszierende Protein GFP im Zytosol exprimiert.

3.7 Zellkulturmedien

Medium	Zelllinie	Hersteller
TC-42 (ohne L-Glutamin, ohne Proteine)	CHO-K1	TeutoCell AG, Bielefeld
CHO MACS (entspricht TC-42)	CHO-K1	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
TC-42* (ohne Glukose, ohne L-Glutamin, ohne Proteine)	CHO-K1	TeutoCell AG, Bielefeld (Sonderanfertigung für Substratpulsexperimente)
BioWhittaker® ProCHO 4 (without Proteins)	CHO ^{SFS} GFP	Lonza Group AG, Schweiz

Das serumfreie TC-42 Medium wurde speziell für die CHO-K1 Suspensionszelllinie in Zusammenarbeit mit der Universität Bielefeld von der TeutoCell AG entwickelt. Alle Medien wurden vor Verwendung mit jeweils 4 mM L-Glutamin supplementiert. Die Standardkultivierung wurde ohne den Zusatz von Antibiotika durchgeführt. Zur vorsorglichen Vermeidung von Kontaminationen wurden bei Kultivierungen in Bioreaktoren die Medien zusätzlich mit 1 % Penicillin/Streptomycin (100 Units/mL) supplementiert.

Supplementierte Medien wurden nicht länger als zwei Woche verwendet (Aufbewahrung bei 4°C). Alle Zusätze für die Medien wurden als Lösung vorbereitet und als Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Vor Gebrauch für die Kultivierung wurden die Medien im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

3.8 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurden die entsprechenden Komponenten in Reinstwasser gelöst, anschließend der pH-Wert eingestellt und vor Verwendung sterilfiltriert.

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert	
PBS (Phosphate Buffered Saline)	NaCl	140 mM	7,4
	KCl	27 mM	
	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	7,2 mM	
	KH ₂ PO ₄	14,7 mM	
Mitochondrien-Isolations- Puffer (MIP)	EDTA	0,2 mM	7,4
	Saccharose (Sucrose)	0,25 mM	
	Tris-HCl	10 mM	
Bradford-Reagenz	Coomassie Brilliant Blue G-250	25 mg	-
	Ethanol (96 %)	12,5 mL	
	H ₃ PO ₄	25 mL	
	ddH ₂ O	ad 250 mL	

Citratsynthase-Assay zur Bestimmung der Citratsynthase Aktivität			
DTNB-Lösung (Ellmann Reagenz)	5,5 Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) Tris-HCl	1 mM 1M	8,5
Oxalacetat-Lösung	Oxalacetat Tris-HCl	10 mM 100 mM	8,5
Acetyl-CoA-Lösung	Acetyl-Coenzym A	5 mM	-
Detergens	Triton X-100	5 %	-
Cytochrome c-Assay zur Bestimmung der Cytochrome c Aktivität			
Enzypuffer ohne Detergens	Saccharose (Sucrose) Tris-HCl	250 mM 10 mM	7,0
Enzypuffer mit Detergens	Saccharose (Sucrose) Tris-HCl n-dodecyl- β -D-maltosid	250 mM 10 mM 1 mM	7,0
Ferrocycyochrome c Substratlösung	Cytochrome c Dithiothreitol (DTT)	0,22 mM 0,5 mM	-
Assay Puffer	KCl Tris-HCl	120 mM 10 mM	7,0
Glutamatdehydrogenase Assay			
NADH-Lösung	Nicotinamidadenindinukleotid	0,15 mM	-
EDTA-Lösung	Ethylendiamintetraessigsäure	1 mM	-
NH ₄ -Acetat-Lösung	Ammoniumacetat	250 mM	-
ADP-Lösung	Adenosindiphosphat	1 mM	-
α -Ketoglutarat-Lösung	α -Ketoglutarat	0,4 mM	-
Laktatdehydrogenase Assay			
NADH-Lösung	Nicotinamidadenindinukleotid	0,375 mM	-
Pyruvat-Lösung	Pyruvat	2,5 mM	-

3.9 Steriles Arbeiten

In der Zellkulturtechnik ist das sterile Arbeiten von besonderer Bedeutung. Dadurch wird gewährleistet, dass ausschließlich die gewünschten Zellen kultiviert werden und eine Kontamination mit fremden Mikroorganismen vermieden wird. Daher wurden alle Arbeiten mit lebenden und noch weiter zu kultivierenden Zellen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Oberflächen der unter die Cleanbench einzubringenden Materialien wurden zuvor mittels 70 %igem Ethanol desinfiziert. Die Sterilität der Innenseiten aller Materialien wurde ebenfalls gesichert. So lag das Verbrauchsmaterial, wie beispielsweise die serologischen Pipetten oder die für die Erhaltungskultur genutzten Erlenmeyerkolben aus Polycarbonat, schon vom Hersteller steril verpackt vor. Andere Materialien, wie Glasflaschen oder Schläuche, die in Kontakt mit den Zellen kommen könnten, wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Beim Autoklavieren wurde unter erhöhtem Druck für 20 min eine dampfgesättigte Atmosphäre gehalten, um sämtliche Mikroorganismen abzutöten. Flüssigkeiten wurden ebenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert. Zum Sterilfiltrieren wurden PTFE-Filter mit einer Porenweite von 0,22 µm verwendet.

3.10 Zellkulturtechniken

3.10.1 Optimierung der CHO-K1 Batch-Kultivierung

Zur Ermittlung einfach handhabbarer und optimaler Wachstumsbedingungen wurden zu Beginn dieser Arbeit verschiedene Kultivierungsgefäße für die Kultivierungen der CHO-K1 Zellen getestet: Kulturflaschen (T-Flaschen), Erlenmeyerkolben (Glas und Polycarbonat; mit und ohne Schikanen), Spinnerflaschen und Filterröhrchen.

Testweise wurde das Kulturmedium ebenfalls mit einer Endkonzentration von 6 bzw. 8 mM L-Glutamin supplementiert. Durch regelmäßige Probenahmen, Bestimmung der Zelldichten und spezifischen Wachstumsraten sowie der Glukose-, Laktat-, L-Glutamin- und Glutamatkonzentrationen wurden die optimalen Wachstumsbedingungen für die CHO-K1 Zellen bestimmt. Ausgehend von diesen Vorversuchen wurden für die Standardkultivierung die Bedingungen gewählt, die im Folgenden für die CHO-K1 Erhaltungskultur angegeben sind.

3.10.2 CHO-K1 Erhaltungskultur

Um jederzeit Zellen zur Verfügung zu haben, wurden die CHO-K1 Zellen neben allen Versuchen durchgehend in einer Erhaltungskultur kultiviert. Dazu wurde das chemisch definierte Medium TC-42 (Fa. TeutoCell) bzw. CHOMACS CD (Fa. Miltenyi Biotec) verwendet, welches direkt vor Gebrauch mit L-Glutamin in einer Konzentration von standardmäßig 4 mM pro Liter supplementiert wurde. Die Lagerung aller Kulturmedien erfolgte bei 4°C. Vor der Verwendung wurden die benötigten Medienvolumina im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Je nach Bedarf an Zellen wurden 50 mL bzw. 100 mL des supplementierten Mediums in 125 mL respektive 250 mL schikanierte Polycarbonat Erlenmeyerkolben mit Filterschraubverschluss gegeben. Als Anfangszelldichte wurden jeweils Zelldichten zwischen 0,2 bis $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte auf einem Orbitalschüttler bei 225 rpm und einer Schüttlerauslenkung von 10 mm in einem CO₂-Inkubator bei $36,8 \pm 0,2^\circ\text{C}$, gesättigter Wasserdampf Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5 % (siehe Abb. 9). Als zusätzliche Kontrollmessung der Temperatur wurde ein spezielles Inkubatorthermometer auf der Schüttleroberfläche angebracht. Der pH-Wert der Erhaltungskulturen wurde durch manuelle Probenahme mittels pH-Meter bestimmt.

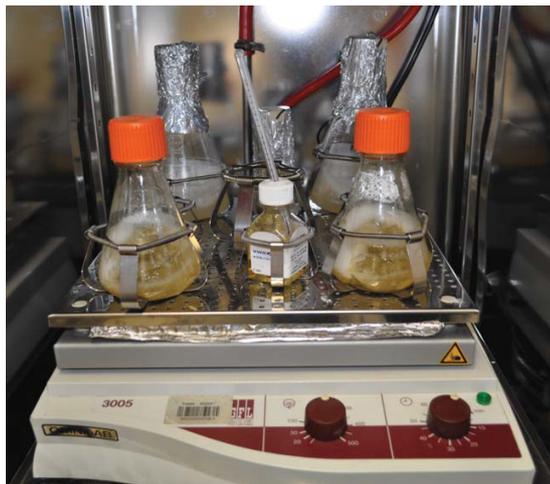


Abb. 9: CHO-K1 Erhaltungskultur auf dem Orbitalschüttler im CO₂-Inkubator.

250 mL Polycarbonat Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen 100 mL) mit Filterschraubverschluss.

Subkultivierung

Zellen benötigen für ihr Wachstum und zur Vitalitätserhaltung einen regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfallen (z.B. L-Glutamin). Die Zellen der Erhaltungskultur wurden daher alle 3 bis 4 Tage in frisches Medium passagiert. Anderenfalls wäre es aufgrund einer zu hohen Zelldichte oder einer Substratlimitierung zum Verlassen der exponentiellen Phase und einem Rückgang der Viabilität gekommen. Zum Passagieren wurde die Zelldichte in der Ausgangskultur bestimmt und daraus berechnet, wie viel Zellsuspension benötigt wird, um ein neues Kultivierungsgefäß mit gewünschter Anfangszelldichte (zwischen $0,2 \cdot 10^6$ und $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL) animpfen zu können. Das entsprechende Volumen an Zellsuspension wurde der Erhaltungskultur entnommen, 5 min bei 200 x g abzentrifugiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in neue Erlenmeyerkolben überführt. Die verbleibende Zellsuspension der alten Erhaltungskultur wurde entweder für weitere Versuche eingesetzt, zum Anlegen einer Arbeitszellbank verwendet (Kryokonservierung 3.10.4) oder bei Nichtgebrauch verworfen.

3.10.3 CHO^{SFS}GFP Kultivierung

Für eine Reihe fluoreszenzmikroskopischer Versuche mittels CHO Zellen wurde die Zelllinie CHO^{SFS}GFP verwendet, welche das grün fluoreszierende Protein (GFP) im Zytoplasma exprimiert. Die CHO^{SFS}GFP-Zelllinie wurde in synthetischem Medium ProCHO4 und unter Zugabe folgender Supplemente kultiviert: (Angaben bezogen auf 500 mL):

- 5 mL Glycin (100 mg/40 mL PBS),
- 10 mL Glutamin (100 x Lösung = 4 mM),
- 300 µL Hypoxanthine (27,22 mg in 1,2 mL 1 M NaOH),
- 200 µL Thymidin (9,69 mg in 1,6 mL 1 M NaOH),
- (ggf. 5 mL Streptomycin/Penicillin)

Als Kultivierungsgefäße wurden T-Flaschen für Suspensionskulturen (nach der Revitalisierung) und Spinnerflaschen (80 rpm) eingesetzt. Die Kultivierung wurde in einem Heraeus-Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre durchgeführt. Entsprechend des Zellwachstums erfolgten die Passagen alle 3 bis 5 Tage, um ein dauerhaftes Wachstum ohne Substratlimitierung aufrecht zu halten. Die Zellen wurden dafür in frisches Medium mit einer Dichte von $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL überführt.

3.10.4 Kryokonservierung

Zur Generierung von Arbeitszellbanken und zur Stammerhaltung wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase, deren Viabilität über 98 % und deren Passagenanzahl zwischen vier und zehn lag, kryokonserviert. Hierfür wurden $7 \cdot 10^6$ bis $10 \cdot 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen in jeweils 1,8 mL 4°C kaltem Kulturmedium mit 7,5 % (w/v) DMSO resuspendiert und direkt auf Kryoröhrchen (2 mL Volumen) verteilt. Die gefüllten Kryoröhrchen wurden in einer vorgekühlten Einfrierbox für etwa 24 h bei -80°C eingefroren. Im Anschluss wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff in Kryotanks gelagert.

3.10.5 Revitalisierung von Zellen

Zur Revitalisierung wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen unter permanentem Schwenken im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Bei diesem Vorgang ist stets darauf zu achten, dass die Zellsuspension kalt bleibt, damit das enthaltene DMSO die Zellen nicht schädigt. Dies wurde gewährleistet, indem die gefrorene Zellsuspension nur soweit aufgetaut wurde, dass gerade noch ein gefrorener Kern zu erkennen war. Im Anschluss wurden die Zellen mit 8 mL 4°C kaltem Kulturmedium gewaschen und zentrifugiert (200 x g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 10 mL frischem, auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in 50 mL Filterröhrchen (gilt für CHO-K1) bzw. 25 mL T-Flaschen (gilt für CHO^{SFS}-GFP) überführt. Die Zellen wurden nach dem Auftauen zweimal passagiert (siehe Subkultivierung unter 3.10.2), bevor sie für weitere Experimente kultiviert und expandiert wurden.

3.10.6 Kultivierung im Bioreaktor Vario 1000

Für die systembiologischen Untersuchungen der CHO-K1 Zellen sollten diese in einem geregelten Bioreaktor kultiviert werden. Mehrere Batch-Kultivierungen, die Kultivierungen mit synchronisierten CHO-K1 Zellen, sowie eine als Referenz dienende kontinuierliche Kultivierung wurden hierbei im Bioreaktor Vario 1000 (Medorex eK) durchgeführt. Der Vario 1000 besteht aus einem trennbaren Doppelgefäß aus Duranglas mit einem Deckel aus PEEK (Polyetheretherketon) besteht, wie in Abbildung 10 gezeigt ist. Der konische Innenteil mit einem Volumen von 500 mL stellt den eigentlichen Kultivierungsraum dar. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden 200 bis maximal 250 mL

als Kulturvolumen genutzt. Der äußere zylindrische Teil dient der Temperierung mittels Wasserbad. Der Deckel bietet 12 Anschlussstellen für Zu- und Abläufe und Sonden (Abb. 11), sowie zusätzlich einen mittig gelegenen Anschluss für die Rührerwelle. Der PEEK-Deckel ist bis 260°C hitzestabil, wodurch der Bioreaktor im Ganzen autoklavierbar ist. Die Sterilität während der Kultivierung wurde über Dichtungsringe an allen Anschlüssen und am Übergang des Deckels zum Kultivierungsgefäß gewährleistet.

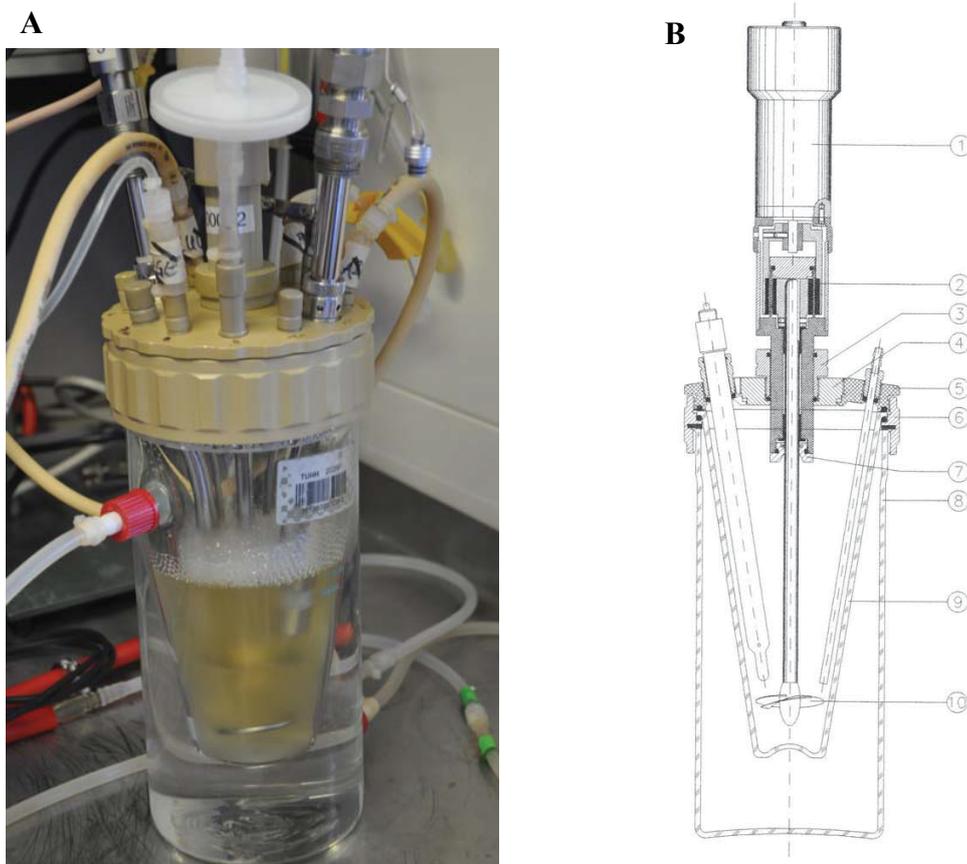


Abb. 10: Aufbau des Vario 1000 Bioreaktors.

(A) Aufnahme des Vario 1000 in Betrieb. (B) Schematische Abbildung des Vario 1000. 1) Antriebsmotor, 2) Magnetkupplung, 3) Klemmhülse für Höhenverstellung, 4) Adapter, 5) Deckel, 6) Schraubring, 7) Wellendichtung, 8) Außengefäß, 9) konisches Innengefäß, 10) Rührer

Arbeitsvolumen: 200 – 250 mL

Reaktordurchmesser: 6,5 cm (der Durchmesser wurde wegen der konischen Form auf der Höhe des Rührer bestimmt)

Reaktorboden: Kegelstumpfboden

Reaktorrührer: 3-MP (3-blade marine Propeller) Anzahl: 1

Gaseinlass: ringförmiges Einlassrohr

Vorkulturen von CHO-K1 Zellen wurden in 125 bzw. 250 mL Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 50 bzw. 100 mL bereitgestellt. Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden abzentrifugiert (500 x g, 5 min) und die Reaktorkultur mit einer Zelldichte von $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL angeimpft.

3.10.7 Reaktorkultivierung: Mess- und Regelgrößen

Während der Kultivierung im Bioreaktor wurden permanent folgende Parameter gemessen und geregelt:

- pH-Wert (Messung, Speicherung, Regelung) 7,2
- pO₂-Wert (Messung, Speicherung, Regelung) 25-40 % O₂-Sättigung
- Rührerdrehzahl (Steuerung) 300 rpm
- Temperatur (Steuerung) 37°C

Die Regelung und Speicherung der Parameter pH-Wert und pO₂-Wert erfolgte rechnergestützt, die Drehzahl und die Temperatur wurden manuell über eine Steuereinheit konstant gehalten und nicht geregelt. Der pH-Wert wurde über eine zuvor kalibrierte, autoklavierbare pH-Sonde (Mettler Toledo AG, 225 mm) gemessen und per Software gespeichert. Die Regelung auf den Sollwert wurde ins Saure durch vermehrte Begasung mit CO₂, ins Basische durch das Zupumpen einer 0,5 molaren Natriumcarbonatlösung erzielt. Die Kalibrierung der Sonde wurde mit zwei Pufferlösungen der pH-Werte 4,01 und 7,01 durchgeführt. Die daraus resultierende Steilheit der Sonde sollte im Bereich von 55-60 mV/pH liegen. Der pO₂-Wert wurde über eine ebenso zuvor kalibrierte, autoklavierbare Sonde mittels einer Membran elektrochemisch bestimmt und per Software gespeichert. Die Regelung erfolgte über die Begasung mit Luft, reinem Sauerstoff sowie CO₂ (wegen des pH-Wertes) durch einen unter dem Rührer befindlichen Begasungsring. Die Kalibrierung der pO₂-Sonde wurde in zwei Schritten im mit vollentsalztem Wasser gefüllten Bioreaktor bei der Kultivierungstemperatur von 37°C durchgeführt. Der Rührer wurde dabei auf 800 rpm eingestellt. Im ersten Schritt erfolgte die Kalibrierung des Nullwertes durch die Begasung mit reinem Stickstoff. Nachdem sämtlicher Sauerstoff aus dem Wasser getrieben und keine weitere Veränderung des Nullwertes angezeigt wurde, wurde die Stickstoffzufuhr beendet und Luft eingeleitet, bis das Maximum an Sauerstofflöslichkeit

erreicht wurde. Nach dem Autoklavieren erfolgte ein erneutes Überprüfen des Nullpunktes durch Begasen mit Stickstoff. Die Rührerdrehzahl wurde während der Kultivierung konstant gehalten. Die Drehzahl wurde dabei über ein an die Rührerwelle angeschlossenes Steuerelement bestimmt. Es bildete sich ein vertikales Strömungsprofil aus, über das der Reaktorinhalt homogenisiert wurde. Die Temperatur des Kultivierungsmediums im inneren Teil des Bioreaktors wurde über ein externes Wasserbad mit Temperaturregelung gesteuert. Das Wasser wurde in dem Wasserbad erhitzt und anschließend im Kreislauf durch den zylindrischen Außenteil des Bioreaktors und zurück durch das Wasserbad gepumpt.

3.10.8 Batch-Kultivierung

Eine Batch-Kultivierung zeichnet sich dadurch aus, dass ein definiertes Volumen an Medium vorgelegt wird, mit einer geringen Zelldichte angeimpft wird und der Verlauf der Kultivierung ohne weitere Zufuhr oder den Austausch von Medium erfolgt (geschlossenes System). Die Zellen beginnen zu wachsen, Substrate zu verbrauchen und auf der anderen Seite Produkte zu bilden. Unter der Annahme, dass die sonstigen Prozessparameter, wie die Gelöstsauerstoffkonzentration oder die Temperatur, geregelt sind, setzt sich dieser Prozess fort, bis ein limitierendes Substrat komplett aufgebraucht ist oder es zu einer zu hohen Ansammlung toxischer Metaboliten kommt.

Batch-Kultivierungen im Vario 1000 Bioreaktor

Insgesamt wurden fünf Batch-Kultivierungen im Vario 1000 Bioreaktor durchgeführt. Als Vergleichskultivierung wurden stets CHO-K1 Zellen des gleichen Batches in Schüttelkolben kultiviert. Die Batch-Kultivierungen im 250 mL Schüttelkolben wurden mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL analog zu den Bedingungen der Erhaltungskultur durchgeführt (siehe Kapitel 3.10.2). Das Kulturvolumen der im Vario 1000 durchgeführten Kultivierungen wurde auf 200 mL festgelegt. Die Animpfzelldichte betrug jeweils $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die im Vario 1000 durchgeführten Batch-Kultivierungen wurden alle mit nahezu identischem Grundaufbau durchgeführt. Der allgemeine Aufbau des Vario 1000 Bioreaktors ist in Abbildung 10 gezeigt. Die Deckelanschlüsse des Bioreaktors wurden während der Kultivierung wie folgt genutzt:

1. pO₂-Sonde
2. Zuluft über eine Flasche mit Sterilfilter; Befeuchtung der Prozessluft erfolgt über eine Fritte in der mit Wasser gefüllten Flasche
3. pH-Sonde
4. Abluft über eine Flasche mit Sterilfilter; zum Auffangen von möglicher Schaumbildung mit Rückführung in die Flasche
5. Lauge Zufuhr
6. Zwei Flaschen, verbunden über ein Y-Stück; (1. Flasche zur Entnahme des zum Autoklavieren in den Bioreaktor gefüllten Wassers; 2. Flasche für das Überführen des Inokulums in den Bioreaktor)
7. Probenahmeschlauch
8. Abluftfilter (Absicherung der Abluftflasche)
9. *At-line* Mikroskop Eingang
10. Blindstopfen
11. *At-line* Mikroskop Ausgang
12. Blindstopfen

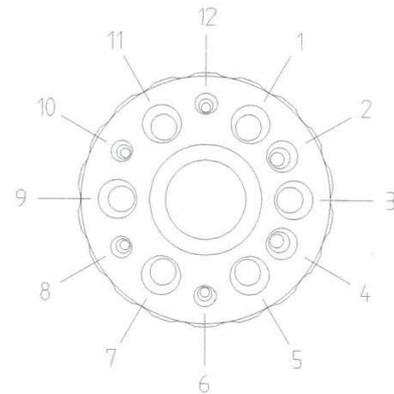


Abb. 11: Skizze der Deckelanschlüsse des Vario 1000 Bioreaktors

Die Sollwerte der Regelparameter wurden auf folgende Werte während der Kultivierung festgelegt:

Parameter	Einstellung
pO ₂ -Wert	30 %
pH-Wert	7,20
Temperatur	37°C
Drehzahl	300 rpm

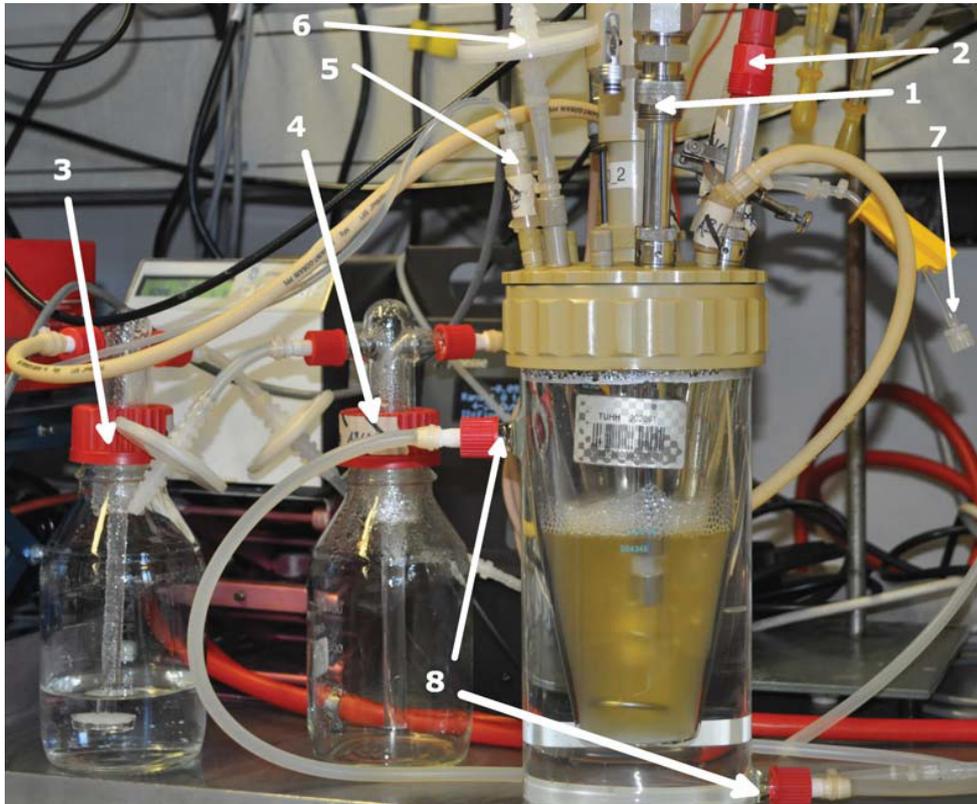


Abb. 12: Versuchsaufbau des Vario 1000 Bioreaktors während der Batch-Kultivierungen.

1) pO₂-Sonde, 2) pH-Sonde, 3) Zuluft-Flasche, 4) Abluft-Flasche, 5) Lauge-Anschluss (Flasche nicht im Bild), 6) Abluftfilter, 7) Probenahme, 8) Wasserbad Ein- und Ausgang.

3.10.9 Kontinuierliche Kultivierung

Im Gegensatz zu einer Batch-Kultivierung ist eine kontinuierliche Kultivierung ohne Zellrückhaltung (Chemostat) kein für Stoffströme geschlossenes System. Hier wird nach einer anfänglichen Batch-Phase kontinuierlich frisches Medium zugegeben und auf der anderen Seite verbrauchtes Medium inklusive Biomasse abgegeben. Die Batch-Phase zu Beginn dient dabei dem Erreichen einer gewünschten Zelldichte und der exponentiellen Wachstumsphase. Bei einer angenommenen idealen Durchmischung sind während der folgenden kontinuierlichen Phase die Konzentrationen im Ablauf gleich denen im Reaktor. Die Konzentrationen im Reaktor, wie auch die Zelldichte, nehmen bei gleichbleibenden Pumpraten für Zu- und Ablauf nach einer bestimmten Anpassungszeit im Durchschnitt konstante Werte an. Die Anpassungszeit hängt von dem Reaktorvolumen und den Pumpraten ab. Erfahrungswerten nach ist diese nach einem mindestens dreimaligen Austauschen des Reaktorvolumens abgeschlossen. Ab dann wird von einem stationären Zustand gesprochen.

Kontinuierliche Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine kontinuierliche Kultivierung mit einem Kulturvolumen von 250 mL im Vario 1000 Reaktor durchgeführt. Die Animpfzelldichte betrug $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die Zelldichte sollte nach der anfänglichen Batch-Phase bei $5 \cdot 10^6$ bis $6 \cdot 10^6$ Zellen/mL gehalten werden. Der grundsätzliche Aufbau des Versuchs ist identisch zu denen der Batch-Versuche (siehe Kapitel 3.10.8). Für die Zufuhr von frischem Medium und den Ablauf von Zellsuspension wurden zwei Flaschen hinzugefügt, die über Peristaltikpumpen angeschlossen wurden (siehe Abb. 12). Die benötigten Pumpraten für die kontinuierliche Phase wurden anhand der maximalen Wachstumsrate (μ_{max}) der Batch-Phase bestimmt. Die Flasche für den Zulauf wurde vor Beginn der Kultivierung mit 3 L frischem Medium befüllt und während des Versuchs unter Lichtausschluss auf Eis gelagert, um den Abbau von licht- und temperaturempfindlichen Bestandteilen des Mediums zu verhindern. Die in der Ablaufflasche gesammelten Zellen wurden verworfen. Die Sollwerte der Regelparameter wurden identisch zu denen der Batch-Kultivierungen eingestellt.

3.10.10 Inbetriebnahme und Animpfen des Vario 1000 Bioreaktors

Vor jeder Inbetriebnahme des Bioreaktors wurden alle Dichtungsringe, Stopfen und Anschlüsse geprüft und gegebenenfalls gewartet. Die benötigten Flaschen für die Zu- und Abluft, für das Inokulum und das Laugerereservoir wurden mit Schläuchen und Anschlüssen sowie Sterilfiltern versehen und steril autoklaviert. Anschließend erfolgte die Kalibrierung und der Einbau der pH- und der pO_2 -Sonde. Zum Autoklavieren wurde der Bioreaktor mit einem dem Arbeitsvolumen entsprechenden Volumen vollentsalztem Wassers gefüllt und an die Zu- und Abluftflaschen angeschlossen. Für das Inokulum wurde aus der CHO-K1 Erhaltungskultur die benötigte Menge an Zellsuspension abzentrifugiert (500 x g, 5 min) und das erhaltene Zellpellet in frischem Medium (37°C) resuspendiert. Die Verbindung der benötigten Flaschen sowie die Inokulation des Reaktors wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Das für das Kalibrieren und Autoklavieren eingebrachte Wasser wurde mithilfe einer Spritze über einen Sterilfilter aus dem Bioreaktor gezogen. Analog wurde anschließend das Inokulum durch Erzeugen von Überdruck in den Bioreaktor überführt. Die pH- und die pO_2 -Sonde wurden wieder mit dem Regler verbunden, die

Zuluftflasche mit der Zuluftleitung und die Leitung der Laugeflasche mit der Peristaltikpumpe.

Für die permanente Überwachung der Zellsuspension wurde im letzten Schritt zusätzlich ein Prototyp eines *at-line* Mikroskops an den Bioreaktor angeschlossen und die Regelungssoftware, sowie die Software zur Steuerung des *at-line* Mikroskops gestartet (siehe Kapitel 3.11).

3.11 *At-line* Mikroskopie

Während der Kultivierungen im Vario 1000 Bioreaktor wurde ein *at-line* Mikroskop (Prototyp und Leihgabe des Instituts für Technische Chemie (TCI), Leibniz Universität Hannover, AK Scheper) eingesetzt, welches über einen Bypass direkt mit dem Reaktor verbunden wurde. Hierbei wurde kontinuierlich ein Volumenstrom der Zellsuspension aus dem Reaktorinneren über ein spezielles Durchflusssystem durch das Mikroskop und wieder zurück in den Reaktor gepumpt.

Durch den Einsatz eines *at-line* Mikroskops können Informationen über die Zelldichte, Zellgröße und die Zellmorphologie während eines Kultivierungsprozesses gewonnen werden. Ein Vorteil dieser Anwendung besteht in der direkten Integration des Mikroskops an den Bioreaktor, wodurch eine direkte und permanente Überwachung der Zellkultur erfolgen kann. Hierdurch kann einerseits die manuelle Probenahme und *off-line* Analytik reduziert und das Kontaminationsrisiko minimiert werden und andererseits können mikrobielle Kontaminationen frühzeitig erkannt werden.

Das *at-line* Mikroskop setzt sich aus zwei Hauptkomponenten zusammen. Es besteht aus einem äußeren Stahltubus, der nach unten durch eine Glaslinse abgeschlossen wird und über zwei Öffnungen für den Zu- und Ablauf der Zellsuspension vom Reaktor verfügt. In den äußeren Tubus wird ein innerer Stahltubus eingeführt, der im unteren Segment über Dichtungsringe und ein Glasfenster verfügt. Durch das Einführen in den äußeren Tubus wird ein abgedichteter Hohlraum zwischen den beiden Tuben erzeugt, durch den die Zellsuspension gepumpt werden kann [233]. Durch diesen Hohlraum wurde die Zellsuspension über einen Silikonschlauch (Durchmesser: 0,5 mm) mithilfe einer Peristaltikpumpe im Kreislauf geleitet (10 mL/min). In den inneren Tubus wurde eine Digitalkamera eingeführt und das Mikroskop in eine höhenverstellbare Aufhängung gesetzt. Dadurch konnte einerseits die Höhe des Hohlraums zwischen innerem und

äußeren Tubus eingestellt und andererseits die Bilder der Kamera scharf gestellt werden. Die Kamera wurde an einen Computer mit der Software "Insitu Control" angeschlossen. Hierüber wurde während der Kultivierung ein Bild pro Minute (die Einstellung der Aufnahmeintervalle ist variierbar) mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen und gespeichert. Die Beleuchtung der Bilder erfolgte über eine Hochleistungs-LED, die an der Unterseite des äußeren Tubus angebracht war. Um einen Rückgang der Viabilität der Zellen während der Passage aus dem Bioreaktor durch das Mikroskop zu vermeiden, wurde das Mikroskop in einem auf 37°C temperierten Wärmeschrank aufgebaut. Die beiden Stahltuben wurden vor jeder Kultivierung gereinigt und zusammengesetzt autoklaviert.

Durch die Verwendung des *at-line* Mikroskops lässt sich die Gesamtzelldichte von Suspensionskulturen direkt anhand der Anzahl durchschnittlich pro Mikroskop-Aufnahme detektierten Zellen berechnen, wenn die Aufsichtsfläche des Mikroskops bekannt ist. Dafür wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Anzahl der durchsch. pro Bild detektierten Zellen}}{\text{Aufsichtsfläche des Mikroskops} \times \text{Messzontentiefe}}$$

Die Bestimmung der Lebendzelldichte ist hingegen mit dem Mikroskop nicht möglich [234]. Die von der Kamera aufgenommene Fläche wurde im Vorfeld mithilfe einer Neubauerkammer bestimmt. Diese wurde über der LED montiert und mit der Kamera Aufnahmen der Quadrate der Neubauerkammer gemacht. Anschließend erfolgte die Umrechnung der Größe eines Quadrates auf die Größe der gesamten Aufnahme. Die so ermittelte Gesamtfläche einer Aufnahme lag bei 0,438 mm². Die Messzontentiefe des Bildausschnittes wurde analog zur Neubauerkammer mit 100 µm bestimmt. Die Auswertung der aufgenommenen Bilder sollte in Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie in Hannover (AK Scheper) mittels speziell entwickelter Software erfolgen. Da diese Software allerdings bei Zelldichten ab 4·10⁶ Zellen/mL keine verlässlichen Ergebnisse mehr liefern konnte, wurden die Bildaufnahmen innerhalb dieser Arbeit manuell ausgezählt. Dazu wurde aus jeweils drei aufeinanderfolgenden Bildern (entsprechend drei Minuten) pro gewähltem Zeitpunkt der Mittelwert gebildet. In Abbildung 13 sind der schematische Aufbau sowie der Versuchsaufbau des *at-line* Mikroskops während einer Kultivierung dargestellt.

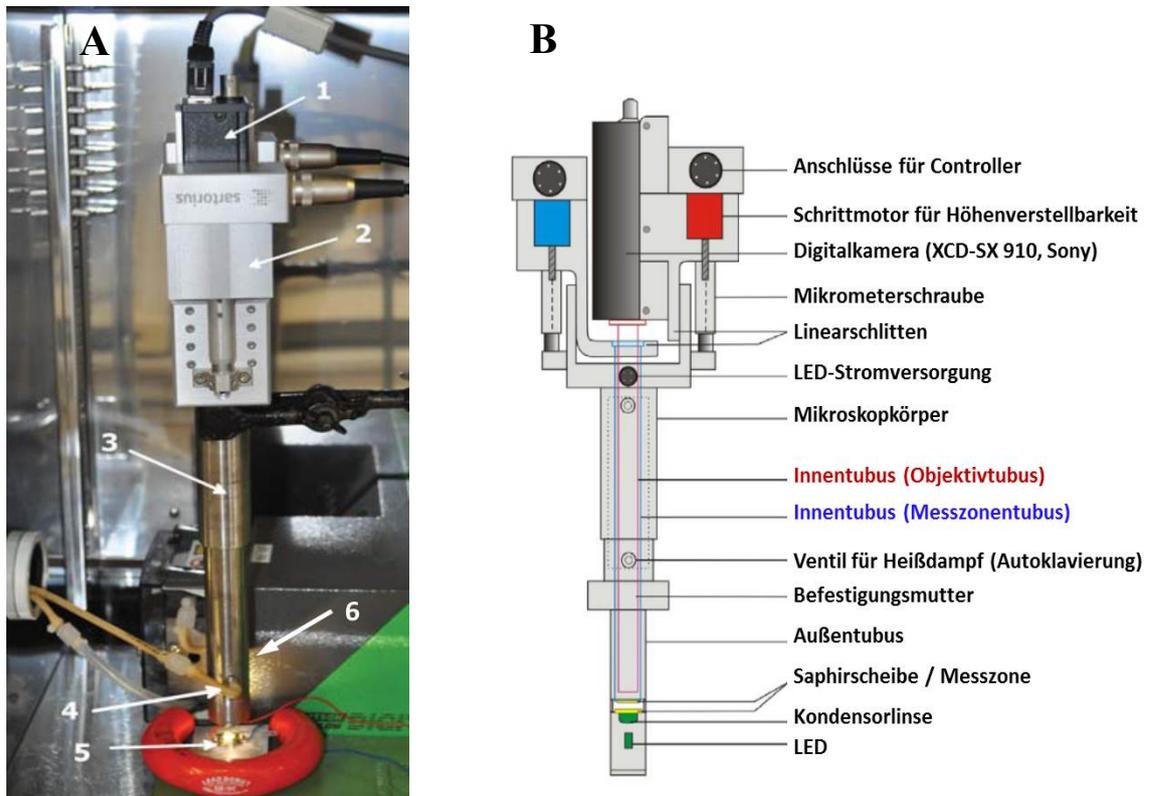


Abb. 13: Aufbau eines *at-line* Mikroskops.

(A) Versuchsaufbau des integrierten *at-line* Mikroskops im Wärmeschrank: 1) Digitalkamera, 2) höhenverstellbare Aufhängung, 3) Mikroskopkörper, 4) Zu-/Ablauf der Zellsuspension, 5) LED, 6) Außentubus; (B) Schematischer Aufbau eines *at-line* Mikroskops (adaptiert von [235]).

3.12 Zellsynchronisierung mittels Elutriation

Zur Untersuchung des Metabolismus in Abhängigkeit des Zellzyklus sollten im Zuge dieser Arbeit Versuche mit synchron wachsenden CHO-K1 Zellen durchgeführt werden. Für die Synchronisierung der Zellen wurden diese in den entsprechenden Zellzyklusphasen angereichert. Hierfür wurde die Methode der Elutriation mittels Gegenstromzentrifugation verwendet. Bei dieser Methode wird die Tatsache ausgenutzt, dass Zellgröße und Zellzyklusphase in direktem Zusammenhang miteinander stehen [229]. Durch die Fraktionierung der Zellen ihrer Größe entsprechend, erfolgt somit eine Trennung der verschiedenen Zellzyklusphasen. Das Prinzip der Gegenstromzentrifugation beruht auf zwei gegeneinander wirkenden Kräften: Zum einen der nach außen gerichteten Zentrifugalkraft, die durch die Rotationsgeschwindigkeit des Elutriatorrotors bestimmt wird und zum anderen der Zentripetalkraft, die durch die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums in Richtung der Rotationsachse mithilfe einer entsprechend eingestellten Pumpe

bestimmt wird [229]. Befinden sich beide Kräfte im Gleichgewicht, können Partikel bestimmter Größe und Dichte in der Elutriationskammer konzentriert werden, während die übrigen ausgewaschen werden. Der Einsatz des Elutriators erfolgte an der Medizinischen Klinik und Poliklinik am UKE (AK Lohse). Der Aufbau der Elutriationsapparatur ist in Abbildung 14 skizziert.

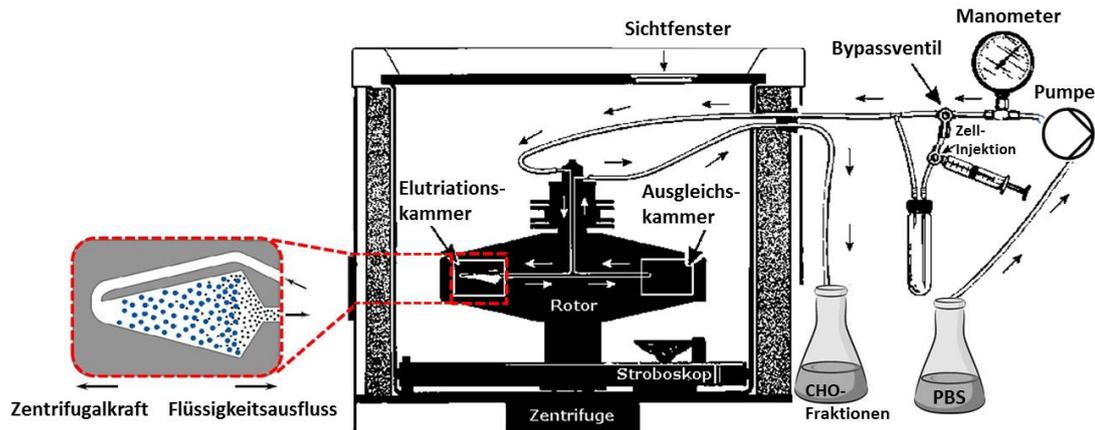


Abb. 14: Gesamtaufbau der zentrifugalen Elutriationsapparatur.

Der Vergrößerungsausschnitt zeigt die Elutriationskammer mit Wirkrichtung der Zentrifugalkraft und des Flüssigkeitsausflusses, wodurch die Auftrennung der Zellsuspension stattfindet. (Modifiziert nach [229].)

Vor der Benutzung wurden der Elutriator und alle angeschlossenen Schläuche durch das Durchpumpen von Ethanol (70 %) sterilisiert und anschließend mit sterilfiltriertem PBS gespült. Alle Pumpvorgänge während der eigentlichen Synchronisierung wurden ebenfalls mit sterilfiltriertem PBS durchgeführt. Im Vorfeld jeder Synchronisierung wurden CHO-K1 Zellen des gleichen Batches in insgesamt vier 250 mL Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 100 mL kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von etwa $6 \cdot 10^6$ bis $8 \cdot 10^6$ Zellen/mL innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellsuspensionen in eine sterile 2 L Zellkulturflasche („Roller Bottle“) überführt und mit 400 mL frischem Kulturmedium verdünnt, so dass für die Elutriation ein Gesamtvolumen von 800 mL mit einer Zelldichte von etwa $4 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL zur Verfügung stand. Von diesem Ansatz wurden für jeden Elutriationsdurchgang 100 mL verwendet, wodurch sich die Synchronisierung auf acht Durchgänge verteilte. Pro Durchgang wurden jeweils 100 mL der Zellsuspension abzentrifugiert ($200 \times g$, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 mL PBS resuspendiert. Die in Puffer resuspendierten Zellen wurden mit einer sterilen Spritze aufgenommen und bei abgeklemmtem Schlauchsystem und

ausgeschalteter Pumpe in den Pumpkreislauf des Elutriators gespritzt. Die Schlauchklemme wurde nach dem erfolgten Einspritzen gelöst und die Pumpe wieder eingeschaltet, sodass die Zellen durch langsames Erhöhen der Pumprate (auf 14 mL/min) bei konstant bleibender Umdrehungszahl (1800 rpm) der Zentrifuge in die Elutriationskammer gelangten, wo sie den entgegengesetzten Kräften der Zentrifuge und des Gegenstroms ausgesetzt waren. Das dabei entstehende Kräftegleichgewicht hält durch die geringe anfängliche Pumprate die meisten Zellen noch innerhalb der Elutriationskammer. Nur wenige sehr kleine Zellen und Zelldebris werden bereits bei einer Pumprate von 14 mL/min ausgetragen.

Die Probenvorbereitung sowie das Auffangen und die Fraktionierung der Zellen erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Im Vorfeld der Synchronisierung wurden die den Zellzyklusphasen entsprechenden Pumpraten durch eine Kalibrierungselutriation mit einer sich direkt anschließenden Zellzyklusanalyse bestimmt (siehe Kapitel 3.13.7). Für die Zellfraktionierung der synchronisierten Zellen wurde je nach angestrebter Zellzyklusphase (und damit Zellgröße) ein entsprechender Pumpratenbereich ausgewählt, innerhalb dessen die gewünschten Zellen ausgetragen werden. Die Pumprate wurde dabei sehr langsam auf den Beginn des Bereichs hochgefahren. Die während des Hochfahrens der Pumprate gesammelten Zellen wurden solange verworfen, bis die gewonnene Suspension vollkommen klar erschien (zellfrei war). Im Anschluss wurde mit dem Auffangen der gewünschten Zellfraktion begonnen, während die Pumprate langsam auf den Höchstwert des zuvor gewählten Bereichs gesteigert wurde. Die Elutriation wurde solange wiederholt, bis eine ausreichende Zelldichte an synchronisierten Zellen zum Animpfen des Bioreaktors vorhanden war. Die gewonnenen Zellfraktionen wurden abzentrifugiert (200 x g, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen in jeweils 10 mL frischem Kulturmedium (37°C) resuspendiert. Neben einer direkten Bestimmung der Zelldichte wurden von jeder Fraktion auch Proben für die Zellzyklusanalyse genommen. Nach jedem Elutriationsdurchlauf wurden die in der Kammer verbliebenen Zellen durch eine starke Erhöhung der Pumprate aus dem Elutriationssystem entfernt und das System zur Reinigung mit PBS durchpumpt. Die Kultivierungen der synchronisierten Zellen wurden unmittelbar nach der Elutriation als Batch-Ansatz im Vario 1000 Bioreaktor gestartet (siehe Kapitel 3.10.8). Hierfür wurde der Bioreaktor mit Zellen einer entsprechenden Zellzyklusphase bei einer Zelldichte von $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL und einem Arbeitsvolumen von 250 mL angeimpft.

3.13 Analytik

3.13.1 Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mikroskopisch durch die Zellzählung mittels einer Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH & Co. KG). Lebende und tote Zellen wurden hierbei durch den Trypanblau-Exklusionstest unterschieden. Dieser Test basiert auf einer veränderten Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen. Trypanblau ist ein Farbstoff, der in das Zellinnere von toten Zellen gelangt und diese durch Bindung an Proteine blau anfärbt. Vitale Zellen kann der Farbstoff nicht durchdringen [236]. Die zu analysierende Zellsuspension wurde im gleichen Verhältnis mit einer 0,5 %-igen Trypanblaulösung verdünnt. Bei höheren Zelldichten wurde der Verdünnungsfaktor durch Zugabe von PBS nach Bedarf erhöht. Anschließend wurden die Zellen in vier großen Quadraten der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zelldichte X in Zellen/mL berechnet sich im Folgenden aus der Anzahl der gezählten Zellen z , der Zahl der dazu genutzten großen Quadrate q und dem Verdünnungsfaktor f :

$$X = \frac{z \cdot 10^4}{q} f$$

mit:
 $z =$ Anzahl gezählter Zellen
 $q =$ Anzahl genutzter Großquadrate
 $f =$ Verdünnungsfaktor

Die prozentuale Viabilität der kultivierten Zellen wird aus der Lebendzellzahl und der Gesamtzellzahl berechnet:

$$Viabilität = \frac{X}{X_{ges}} \cdot 100$$

mit:
 $X =$ lebende Zellen [Zellen·mL⁻¹]
 $X_{ges} =$ lebende und tote Zellen [Zellen·mL⁻¹]

3.13.2 Wachstumskinetik: Batch-Kultivierung

Die Prozesse der Proliferation, des Substratverbrauchs und der Produktbildung während einer Batch-Kultivierung lassen sich durch Bilanzgleichungen beschreiben. Die Folgenden wurden für die Auswertung der Kultivierungsversuche innerhalb dieser Arbeit verwendet [237]. Das Wachstum der Zellen lässt sich als autokatalytische Reaktion erster Ordnung ansehen, woraus sich folgende Formel ergibt:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Diese beschreibt die Änderung der Zelldichte X in Abhängigkeit der Zeit t als spezifische Wachstumsrate μ multipliziert mit der Zelldichte. Durch Trennung der Variablen und Auflösen nach der Wachstumsrate ergibt sich folgender Ausdruck für die Berechnung der Wachstumsrate zwischen den beiden Zeitpunkten t_1 und t_2 :

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_{t_1}}{X_{t_0}}\right)}{t_1 - t_0}$$

Der Verbrauch an Substrat (hier: Glukose und L-Glutamin) wird als Veränderung der Substratkonzentration S mit der Zeit t beschrieben. Dies lässt sich aus einem Term zur Bildung von Biomasse (Quotient aus der Wachstumsrate und dem Substrat-ausbeutekoeffizienten Y_{XS} (Biomasse pro Substrat)) und einem Erhaltungsterm (m_S) multipliziert mit der Biomasse zusammenstellen:

$$\frac{dS}{dt} = \left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_S\right)X$$

Daraus ergibt sich als Größe für den Substratverbrauch pro Zeit und Biomasse durch Einführen der spezifischen Substratverbrauchsrate q_S als $\left(\frac{\mu}{Y_{XS}}\right) + m_S$

$$q_S = \frac{S_{t_1} - S_{t_2}}{(t_2 - t_1) \frac{X_{t_1} + X_{t_2}}{2}}$$

Für die Bildung von Produkten, für diese Arbeit Laktat, gilt eine analoge Herleitung mit der Produktkonzentration P , dem Produktausbeutekoeffizienten Y_{PX} (Produkt pro Biomasse) und dem Erhaltungsterm m_P :

$$\frac{dP}{dt} = (\mu Y_{PX} + m_P)X$$

Daraus ergibt sich in diesem Fall eine Größe für die Beschreibung der Produktbildung pro Zeit und Biomasse mit der spezifische Produktbildungsrate q_P als $(\mu Y_{PX} + m_P)$:

$$q_P = \frac{P_{t_2} - P_{t_1}}{(t_2 - t_1) \frac{X_{t_1} + X_{t_2}}{2}}$$

3.13.3 Wachstumskinetik: Kontinuierliche Kultivierung

Auch der kontinuierliche Kultivierungsbetrieb lässt sich durch Bilanzen beschreiben. Die für diese Arbeit genutzten Bilanzen werden im Folgenden kurz erläutert [237]. Die Verdünnungsrate D beschreibt das Verhältnis zwischen der Pumprate F für Zu- beziehungsweise Ablauf und dem Kulturvolumen V :

$$D = \frac{F}{V}$$

Die Änderung der Zelldichte lässt sich als Produkt der Gleichgewichtszelldichte und der Differenz zwischen der Wachstums- und der Verdünnungsrate darstellen:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X$$

Da im stationären Zustand die Änderung der Zelldichte dX über die Zeit dt als null angesehen wird, ergibt sich idealerweise:

$$\mu_{\text{theoretisch}} = D$$

Die Wachstumsrate lässt sich demnach bei bekanntem Kulturvolumen über die Pumprate bestimmen. Die reale während der Kultivierung vorliegende Wachstumsrate wurde berechnet als Summe aus der Verdünnungsrate und der Batch-Wachstumsrate, da es durch Schwankungen des Zellwachstums immer zu Abweichungen von der theoretischen Wachstumsrate kommen kann:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_{t_2}}{X_{t_1}}\right)}{t_2 - t_1} + D$$

Für die Substratkonzentration gilt folgende Bilanzgleichung, wobei S_0 die Substratkonzentration im Zulauf und S die Gleichgewichtssubstratkonzentration ist:

$$\frac{dS}{dt} = (S_0 - S)D - q_S X$$

Da auch die Änderung der Substratkonzentration dS/dt im stationären Zustand als null angesehen wird, ergibt sich:

$$q_S = \frac{S_0 - S}{X} D$$

Für die Produktkonzentration ergibt sich wiederum durch das Aufstellen einer Bilanz mit P_0 als der Produktkonzentration im Zulauf und P als der Gleichgewichtskonzentration:

$$\frac{dP}{dt} = (P - P_0)D + (\mu Y_{PX} + m_P)X$$

Da im kontinuierlichen Betrieb $d_P = 0$ angenommen wird, folgt:

$$q_P = \frac{(P - P_0)D}{X}$$

3.13.4 Bestimmung der Zellgrößenverteilung

Die Zellgrößenverteilung wurde durch einen elektronischen Partikelzähler bestimmt. In dieser durchflusszytometrischen Apparatur passieren die Partikel bzw. Zellen zwei Elektroden des Partikelzählers, was bei jedem Durchfluss einen größenspezifischen Anstieg des elektrischen Widerstands zur Folge hat. Die Anzahl der gemessenen Impulse korreliert dabei mit der Partikelanzahl, während die Intensität des elektrischen Signals von dem Partikelvolumen abhängt. Dadurch kann sowohl die Zellgrößenverteilung bestimmt werden, als auch ein zweiter Wert für die Gesamtzellzahl. Für die Messung der Zellgrößenverteilung wurden 100 µL der Zellsuspension mit 9,9 mL PBS (sterilfiltriert) in einer Küvette verdünnt. Durch eine Kapillare des Zellzählers wurden anschließend 0,5 mL der verdünnten Zellsuspension eingezogen. Für die Zellgrößenverteilung wurden bei der Programmeinstellung Grenzwerte zwischen 9 µm und 19 µm festgelegt, um kleinere Partikel, Zelldebris sowie große Zellagglomerate aus der Messung auszuschließen. Für jede Probe wurde eine automatisierte Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Messung der Zellgrößenverteilung wurde nach jedem Elutriationsdurchlauf und während der synchronisierten Kultivierungen durchgeführt, da über die Zellgrößenverteilung ein Rückschluss auf den Grad der Synchronität erwartet werden konnte. Um einen Referenzwert für eine unsynchrone Mischpopulation zu erhalten, wurde die Zellgrößenverteilung ebenfalls für die kontinuierliche Kultivierung und während einiger Batch-Kultivierungen durchgeführt. Die Bestimmung der Zellgrößenverteilung der CHO-K1 Zellen lieferte ebenfalls entscheidenden Informationen, die für das Design von mikrofluidischen Systemen genutzt werden konnten.

3.13.5 Enzymatische Bestimmung extrazellulärer Metaboliten

Die Konzentrationen der extrazellulär vorliegenden Metaboliten Glukose, Laktat sowie Glutamin und Glutamat wurden routinemäßig direkt im Überstand der Zellsuspension mithilfe eines Multiparameter Bioanalyseystems (YSI 7100 MBS) bestimmt. Hierfür wurden jeweils 500 bis 1000 µL des Probevolumens bei 1000 x g für 3 min zentrifugiert, um das Medium von den Zellen zu trennen. Der Überstand wurde anschließend in Reagiergefäßen in das Analysegerät überführt und dort enzymatisch die Metabolitenkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen der Proben durchgeführt. Die Lagerung des Probenüberstands erfolgte bei -20°C.

3.13.6 Bestimmung extrazellulärer Metaboliten mittels HPLC

Um einen Überblick über das Metabolitenprofil weiterer relevanter extrazellulärer Metaboliten zu erhalten, wurden die Probenüberstände zusätzlich zu den enzymatischen Bestimmungen mittels HPLC analysiert. Diese Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe der Technischen Biochemie an der Universität des Saarlandes (AK Heinzle) durchgeführt. Für die Probenvorbereitung der Metabolitenbestimmung wurden stets 100 μL des Kulturüberstands mit 400 μL Methanol (HPLC-Reinheit) versetzt. Die Proben wurden bis zur Messung bei -80°C aufbewahrt. Die Metabolitkonzentrationen wurden mittels RP-HPLC (C18 Säule, 5 μm , 3,9 x 150 mm) nach Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) ermittelt. Eine Übersicht über die verwendete HPLC-Analytik ist im Folgenden zusammengefasst.

HPLC-Protokolle

Für Zucker und organische Säuren:

Kationenaustauschersäule Aminex HPX 87H (300 mm x 7,8 mm, Biorad, Hercules, CA, USA)

Es erfolgt eine isokratische Elution mit 7 mM H_2SO_4 .

Ofentemperatur: 60 $^\circ\text{C}$

Flussrate: 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Einspritzvolumen: 20 μL

Die Detektion von Laktat und Pyruvat erfolgt mittels UV-Detektor (HPLC 535, Biotek, Neufahrn, Deutschland) durch Bestimmung der Absorption bei 210 nm.

Die Detektion von Glukose erfolgt mittels Refraktionssindex-Detektor (ERC-7515A, ERC Inc, Altegolfsheim bei Regensburg, Deutschland)

Für proteinogene Aminosäuren:

C18 RP-Säule (Gemini® 5u C18 110A, 150 mm x 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit Vorsäule (MAX-RP, 4 mm x 3 mm)

Fluss: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Säulentemperatur: 40 $^\circ\text{C}$

Die Gradiententrennung wird mit zwei Eluenten durchgeführt: Eluent A (40 mM Na_2HPO_4 , pH 7,8) und Eluent B (Methanol, Acetonitril, Wasser im Verhältnis 45:45:10). Die Vorsäulenderivatisierung erfolgt mit OPA.

Für primäre Aminosäuren:

Fluoreszenzdetektor (Anregung 330 nm, Emission 450 nm)

Sekundäre Amine reagieren nicht mit OPA weshalb zum Nachweis von Prolin die Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethyl-Chloroformat (Fmoc-Cl) nötig ist. Die Detektion erfolgt anschließend mittels Fluoreszenzdetektor (Anregung 266 nm, Emission 305 nm).

Vor der Derivatisierung mit OPA werden die Disulfidbrücken durch 2-Mercaptopropionat (0,5 % in 0,4 M Borat-Puffer) reduziert.

Anschließend erfolgt eine Capping-Reaktion mit Iodacetat (50 mg/mL in 0,4 M Boratpuffer).

Als interner Standard wird α -Aminobuttersäure verwendet.

3.13.7 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik zur gleichzeitigen Messung der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellen. Dabei ermöglicht die Durchflusszytometrie die Analyse einer Vielzahl von Zellen (bis zu 50.000 Zellen·s⁻¹ [238]) in kürzester Zeit. Durch die Messung der Streulichteigenschaften lassen sich Rückschlüsse über morphologische Größen wie die Zellgranularität oder die Zellgröße gewinnen. Darüber hinaus lassen sich durch spezifische Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern oder durch Färbung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen Eigenschaften wie beispielsweise der DNA-Gehalt einzelner Zellen vermessen [239]. Die erhaltenen Messsignale können im Anschluss bei der Datenanalyse bestimmten Zelleigenschaften zugeordnet werden. Diese Technik ermöglicht gezielte Einzelzellanalysen großer Zellpopulationen und erlaubt somit quantitative und statistische Auswertungen der Messsignale.

Da der DNA-Gehalt einer Zelle direkt abhängig von der Zellzyklusphase ist, lassen sich nach einer Synchronisation mit Hilfe der Durchflusszytometrie direkte Rückschlüsse auf den Synchronisationsgrad einer Zellpopulation ziehen. Die DNA der Zellen wird dabei durch den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt, welcher stöchiometrisch an doppelsträngige DNA bindet. Aufgrund dieser stöchiometrischen Bindung von PI ist es möglich, die Zellen den detektierten Fluoreszenzsignalen entsprechend den unterschiedlichen Zellzyklusphasen zuzuordnen.

Probenvorbereitung

Für die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse wurden pro Probe $2 \cdot 10^6$ Zellen benötigt. Ein entsprechendes Probenvolumen wurde abzentrifugiert (1500 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 1 mL einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gewaschen, anschließend zentrifugiert (1500 x g, 5 min) und der Überstand erneut verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 270 μ L 0,9 % NaCl und 730 μ L -20°C kaltem Ethanol (99,8 %) resuspendiert. Die behandelten Proben wurden in Reagiergefäßen bei -20°C gelagert.

Die anschließenden durchflusszytometrischen Analysen wurden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik am Universitätsklinikum Eppendorf (UKE, AK Lohse) durchgeführt. Hierfür mussten die vorbehandelten Proben zunächst aufgetaut und die DNA der Zellen angefärbt werden. Für die Färbung wurden die Proben abzentrifugiert (200 x g, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen mit 1,5 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 480 μ L PBS und 10 μ L RNase (2 mg/mL) resuspendiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die RNase wurde zuvor in heißem Wasser auf 80°C erhitzt, um mögliche Reste von DNase zu inaktivieren. Die RNase katalysiert die Zersetzung von Ribonukleinsäuren, wodurch eine ausschließliche Bindung des Propidiumiodids mit der DNA der Zelle gewährleistet wird. Die Färbung der DNA erfolgte durch Zugabe von 10 μ L Propidiumiodid (2 mg/mL). Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Analysen am Durchflusszytometer gestartet.

Die Zellzyklusanalyse wurde für alle Zellfraktionen nach der Elutriation durchgeführt. Außerdem wurde die Zellzyklusanalyse bei Proben der synchronisierten Kultivierungen sowie bei Proben der kontinuierlichen Kultivierung als unsynchrone Referenz durchgeführt.

Datenanalyse

Um eine aussagekräftige Analyse zu erlauben, ist es in der Durchflusszytometrie nötig, die generierten Messdaten nach ihrer Relevanz zu sortieren. Das Ziel ist die Auswahl von Zellen, die für die Analyse von Interesse sind. Die Begrenzung der Analyse auf einen bestimmten Datenbereich wird hierbei als „Gating“ bezeichnet. Signale, die außerhalb des relevanten Signalbereichs liegen, entsprechen Zelldebris oder Zellagglomeraten (Zellen, die den Laserstrahl gleichzeitig durchströmen) und würden die Analyseergebnisse

beeinträchtigen. Durch das Gating werden diese Signale ausgeschlossen. Für die Anwendung dieser Methode wurden Regionen in das Streulichtdiagramm eingezeichnet, welche nur die durch PI gefärbten, fluoreszierenden Zellen enthalten. Die restlichen Zellen wurden in der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die Ergebnisdarstellung im Histogramm (Zellzahl gegen Fluoreszenzintensität), wie beispielhaft in Abbildung 15 gezeigt, gibt Aufschluss über den Synchronisationsgrad. Je höher die Intensität der Fluoreszenz, desto mehr DNA ist in den Zellen enthalten. In Zellen der G1-Phase ist generell am wenigsten DNA enthalten, während Zellen in der G2/M-Phase kurz vor der Teilung stehen und deswegen die maximale Menge an DNA vorweisen. Dementsprechend weist das Histogramm zwei Peaks auf, die sich der G1- und der G2/M-Phase zuweisen lassen. Alle Zellen, die zwischen diesen beiden Peaks liegen, befinden sich in der S-Phase, in der die DNA-Synthese stattfindet, also der DNA-Gehalt der Zelle irgendwo zwischen einem einfachen und einem doppeltem Satz liegt [231, 232].

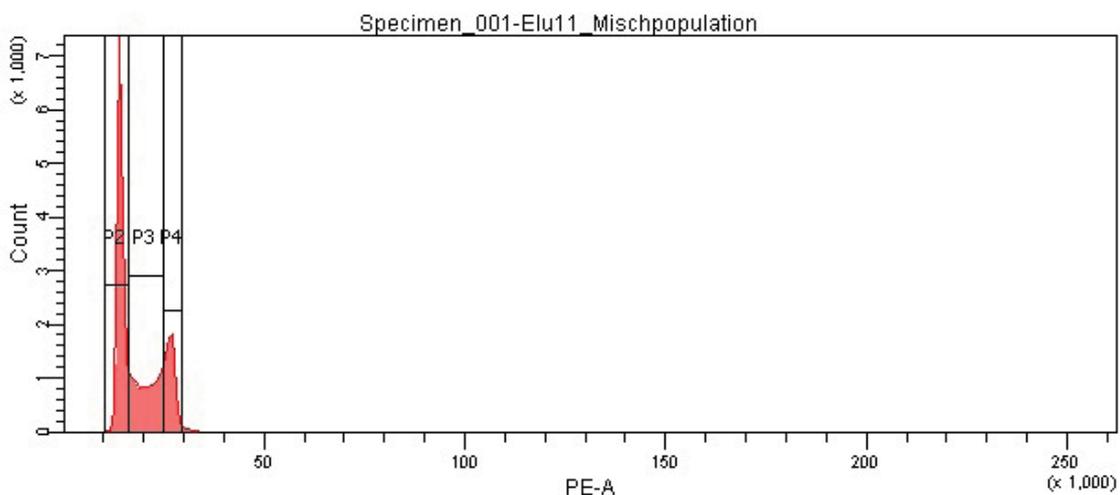


Abb. 15: Ergebnis der Zellzyklusanalyse einer CHO-K1 Mischpopulation im Histogramm.

Dargestellt ist die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität. Der mit P2 markierte Bereich entspricht der G1-Phase, der mit P3 markierte Bereich der S-Phase und der mit P4 markierte Bereich der G2/M-Phase.

3.14 Mitochondrienpräparation

3.14.1 Zellaufschlussmethoden für die Mitochondrienisolation

In dieser Arbeit wurden verschiedene Zellaufschlussmethoden für die Isolation von Mitochondrien getestet und bezüglich ihrer Effizienz und den Einfluss auf die Integrität der freigesetzten Mitochondrien hin bewertet. Die verwendeten CHO-K1 Zellen wurden entsprechend der Erhaltungskulturen in 125 mL Erlenmeyerkolben kultiviert (siehe Kapitel 3.10.2).

3.14.1.1 Vorbereitung der Zellen

Alle für diese Versuchsreihe verwendeten Zellen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von $\sim 5 \cdot 10^6$ Zellen/mL und einer Viabilität von $\geq 98\%$ geerntet. Die geernteten Zellen wurden in sterile 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei $500 \times g$ für 5 min (4°C) zentrifugiert. Für jeden Versuch wurden zwischen $1 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^8$ CHO-K1 Zellen in jeweils 5 mL Mitochondrienisolationspuffer (MIP, 4°C , siehe Kapitel 3.8) resuspendiert und in frische Zentrifugenröhrchen überführt. Um einem Proteinabbau entgegen zu wirken, wurde jeder Probe eine Mischung verschiedener Proteaseinhibitoren frisch zugegeben. Alle Proben, Puffer und Geräte wurden während der Versuche stets gekühlt (4°C oder auf Eis). Die niedrigen Temperaturen wurden gewählt um einen Proteinabbau durch Proteasen zusätzlich zu minimieren und um metabolische Reaktionen zu verlangsamen.

3.14.1.2 Zellaufschlussmethoden

Anhand von Ausschlusskriterien, wie beispielsweise der Zellaufschlusseffizienz und der Konstitution der Mitochondrien, wurde nach ersten Vorversuchen der Fokus in dieser Arbeit auf den Zellaufschluss mittels Dounce-Hand-Homogenisator, Ultraschallstab, Elektroporation sowie das chemische Detergens Digitonin gelegt. Diese Methoden wurden hinsichtlich ihrer Anwendungszeit, der Anzahl an Wiederholungen oder der eingesetzten Detergenkonzentration variiert.

A) Konventioneller Zellaufschluss nach Dounce [192]:

Für diese Methode wurde ein Dounce-Hand-Homogenisator mit Teflonpistill und Glaskolben (Sartorius Mechatronics, Göttingen) mit einem Kolbenvolumen von 10 mL verwendet. Der Zellaufschluss wurde mit 10, 25, 50, 100, 150 bzw. 200 Pistillstößen durchgeführt, während die Zellsuspension auf Eis gekühlt wurde. Diese Standardmethode wurde für diese Arbeit als Referenz verwendet.

B) Zellaufschluss mittels Ultraschall:

Für den Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde ein Ultraschallstab (Sonifier Cell Disruptor Bar 450 (Ø 3 mm), Branson, Fürth) verwendet, wobei die Anwendungszeit von 15, 30, 45, 60 bis 90 s variiert wurde (jeweils 15 s Ultraschallbehandlung mit 5 s Ruheintervallen dazwischen). Die Zellsuspension wurde während der Versuche auf Eis gekühlt. Durch entsprechende Vorversuche wurde die niedrigste Geräteeinstellung als Standardkonfiguration gewählt:

20 kHz

10 % Duty cycle (Anwendungszyklus ($\cong 1 \text{ Puls} \cdot \text{s}^{-1}$))

Output control 1 (\cong minimale Amplitude (116 μm) der Ultraschallvibrationen)

C) Zellpermeabilisierung mittels Digitonin:

Für den Einsatz des chemischen Detergens Digitonin wurde eine 2 %ige Stocklösung (w/v) in PBS angesetzt und bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden Endkonzentration von 0,01 bis 1,0 % (w/v) Digitonin verwendet. Die Inkubation des Detergens mit der Zellsuspension erfolgte für 10 s auf einem gekühlten Schüttler (4°C , 300 rpm). Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 min bei $500 \times g$ zentrifugiert um das verbleibende Digitonin abzutrennen. Die Zellen wurden danach wieder in 5 mL MIP resuspendiert.

D) Zellaufschluss mittels Elektroporation:

Bei dieser Methode wurden die Zellen mit Elektroporation (Gene Pulser II, Bio-Rad) behandelt. Hierfür wurde die Zellsuspension in eisgekühlte Elektroporationsküvetten (Gene Pulser Cuvettes 0,4 cm, Bio-Rad) überführt. Wegen der Volumenkapazität der Küvetten wurden die 5 mL Proben in 1 mL Fraktionen aufgeteilt und nach der Elektroporation wieder vereinigt. Die Zellen wurden 1, 2, 3, 4 oder 5 Schocks ausgesetzt, wobei durch entsprechende Vorversuche eine feste Geräteeinstellung von 800 Ohm, 0,7 kV und 50 μF gewählt wurde.

Alle Aufschlussmethoden und ihre jeweiligen Variationen wurden als biologische Dreifachmessungen ausgeführt. Nach erfolgtem Zellaufschluss bzw. der Zellpermeabilisierung wurden die Zellhomogenate abzentrifugiert (5 min, 2000 x g, 4°C) um verbleibende Zellen, Zelldebris und die nukleare Fraktion abzutrennen. Der erhaltene Überstand wurde für die anschließende Mitochondrienisolation sowie für enzymatische Messungen der Zellaufschlusseffizienz und der mitochondrialen Integrität verwendet. Alle weiteren Versuche wurden bei 0 bis 4°C durchgeführt um metabolische Reaktionen und Proteaseaktivitäten zu minimieren.

3.14.1.3 Quantifizierung des Zellaufschlusses

Um den Einfluss der Zellaufschlussmethoden auf die CHO-K1 Zellen zu bewerten, wurden die Zelldichte und Viabilität nach jedem Zellaufschlussschritt mikroskopisch mittels Trypanblaufärbung und Zellzählung bestimmt. Der prozentuale Zellaufschluss wurde durch das Verhältnis zwischen der Anzahl lebender Zellen vor und nach der Behandlung berechnet. Um die mikroskopischen Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Zellaufschlusseffizienz zusätzlich durch die Anwendung von Laktatdehydrogenase (LDH) Assays quantifiziert. Das Enzym LDH, welches ausschließlich im Zytosol präsent ist, tritt bei Beschädigung der Plasmamembran aus der Zelle aus. Demzufolge lässt sich mit Hilfe des LDH Assays die Integrität der Zellmembran als eine Funktion der Menge an freigesetztem LDH im extrazellulären Medium bestimmen [240]. Die Enzymaktivität von LDH wurde nach jedem Aufschlussschritt in den Probenüberständen (siehe Kapitel 3.14.1.2) gemessen. Die LDH Assays wurden nach dem Protokoll von Niklas et al. [203] in 96-well Mikrotiterplatten bei 340 nm in einem Spektralphotometer durchgeführt. Die Zellaufschlusseffizienz ergibt sich aus der relativen LDH-Aktivität, welche auf diejenige Aktivität normiert wurde, die nach dem Aufschluss der CHO Zellen mittels Triton X-100 (0,2 % (w/v), 5 min Inkubation) gemessen wurde. Die Kulturüberstände unbehandelter Zellen wurden als Referenz verwendet.

3.14.2 Mitochondrienseparation

Nach entsprechenden Vorversuchen (Vergleich von differentieller Zentrifugation, Dichtegradientenzentrifugation sowie Isolation mittels „Magnetic Beads“) wurde innerhalb dieser Arbeit für die Isolation von Mitochondrien aus CHO-K1 Zellhomogenaten (siehe Kapitel 3.14.1.2) die differentielle Zentrifugation als Standardverfahren verwendet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Auftrennung einzelner Probenbestandteile abhängig von ihrer Dichte und somit der Sedimentationsgeschwindigkeit. Die Mitochondrien werden dabei in mehreren Zentrifugationsschritten von den restlichen Zellbestandteilen getrennt.

Hierfür wurde der Probenüberstand in drei Schritten zentrifugiert, wobei die hierbei erhaltenen Überstände jeweils in frische Zentrifugenröhrchen überführt wurden: bei 4000 x g für 5 min, bei 7500 x g für 5 min und abschließend bei 9500 x g für 10 min, um die mitochondriale Fraktion zu pelletieren. Das erhaltene Pellet wurde zweimal gewaschen und anschließend in 200 µL MIP (supplementiert mit Proteaseinhibitor) resuspendiert. Die Proben wurden direkt für enzymatische und morphologische Untersuchungen der mitochondrialen Integrität verwendet. Für weitere Analysen und zur Untersuchung der Lagerungsstabilität wurden die isolierten Mitochondrien bei 4°C gelagert.

3.14.3 Bestimmung der Mitochondrienausbeute

Die Konzentration des isolierten mitochondrialen Rohproteins wurde durch die Proteinanalytik nach Bradford [241] bestimmt. Der bei dem Bradford-Assay eingesetzte Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bindet an basischen Aminosäuren, wodurch das Absorptionsspektrum einer Proteinprobe in den Wellenlängenbereich von 595 nm verschoben wird. Für den Bradford-Assay im Mikrotiterplattenmaßstab wurden 20 µL Proteinlösung (ggf. nach entsprechender Verdünnung) und 300 µL Bradford-Reagenz eingesetzt. Als Referenzprotein wurde BSA (bovines Serumalbumin) im Konzentrationsbereich von 0 bis 500 µg/mL verwendet. Die Proben wurden vor Beginn der Messung für 30 s geschüttelt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte im automatisierten Modus am Spektralphotometer. Entsprechend der gemessenen Proteinkonzentrationen wurde die Ausbeute an mitochondrialem Rohprotein in Milligramm bezogen auf die Anzahl eingesetzter CHO-K1 Zellen berechnet.

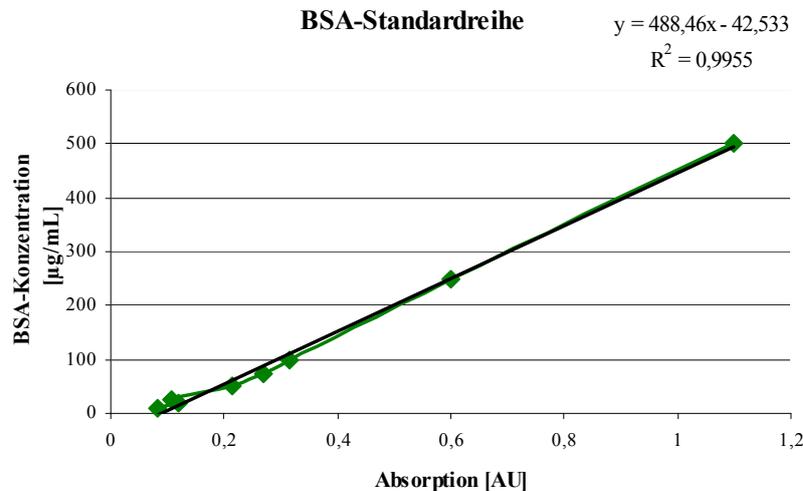


Abb. 16: BSA-Standardreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay.

Zusätzlich wurden Proben der Mitochondrienisolate für konfokalmikroskopische Untersuchungen präpariert, um die Quantität der isolierten Mitochondrien visuell zu bestimmen (Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien ist in Kapitel 3.14.5 beschrieben).

3.14.4 Mitochondrienintegrität

Der Einfluss jeder Zellaufschlussmethode auf die Integrität der Mitochondrienmembranen wurde mit Hilfe spezifischer Enzymaktivitäts-Assays ermittelt. Die strukturelle Mitochondrienintegrität der inneren Membran wurde durch den Citratsynthase-Assay bestimmt, während der Cytochrom C-Assay für die Messung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran verwendet wurde. Die Citratsynthaseaktivität wurde durch die von Srere et al. [242] beschriebene Methode gemessen. Die Cytochrom c-Aktivität wurde mittels Cytochrome c Oxidase Assay Kit (Sigma Aldrich) bestimmt. Beide Assays wurden in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei die Enzymaktivitäten durch kinetische Messungen in einem Spektralphotometer bei 37°C bestimmt wurden. Für jede Probe wurde die freie Enzymaktivität (als Resultat beschädigter Mitochondrienmembranen) und die totale Enzymaktivität (die komplette Freisetzung der Enzyme bedingt durch die chemische Membranlyse mittels 0,5 % (w/v) Triton X-100) gemessen. Die Differenz aus totaler und freier Enzymaktivität wird hierbei als latente Aktivität bezeichnet. Der Quotient aus latenter und totaler Enzymaktivität bildet das Maß der Integrität der Mitochondrienmembranen [240]. Beide Enzym-Assays wurden im Anschluss an den Zellaufschluss unmittelbar nach dem ersten Zentrifugationsschritt (2000 x g) durchgeführt.

3.14.5 Visualisierung isolierter Mitochondrien

Die morphologische Integrität isolierter Mitochondrien wurde mittels spezifischer, indirekter Antikörperfärbung und anschließender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Hierfür wurden Proben isolierter Mitochondrien für 30 min mit dem primären rabbit anti-mouse-anti-TOM20 Antikörper inkubiert (1:100 in MIP), welcher spezifisch an das mitochondriale Rezeptorprotein Tom20 bindet. Tom20 ist eine 20 kDa Untereinheit des TOM-Komplexes (Translocase of the outer membrane), welcher in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Nach der Inkubation wurden die Proben abzentrifugiert (9500 x g, 5 min) und zweimal mit MIP gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit dem sekundären Antikörper (Goat-Anti-Rabbit-IgG) inkubiert (1:200 in MIP, 30 min, unter Lichtausschluss). Dieser Antikörper ist mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff AlexaFluor 488 konjugiert, wodurch eine fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der Mitochondrien ermöglicht wird.

3.14.6 Intrazelluläre Mitochondrienanalytik

Für die Analytik der Mitochondrienstruktur und -Verteilung innerhalb der CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen, der Wachstumsphasen oder der Zellzyklusphasen wurden pro Probe $2 \cdot 10^6$ bis $3 \cdot 10^6$ Zellen benötigt. Ein entsprechendes Probevolumen wurde bei 500 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zur Fixierung der Zellen in 1 mL 8 %-iger Paraformaldehydlösung (PFA) resuspendiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Um bei der Fixierung einer Fragmentierung der Mitochondrien entgegen zu wirken, wurde die PFA-Lösung zuvor auf 37°C erwärmt. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 mL PBS resuspendiert und bei 4°C gelagert. In Kooperation mit dem Max Planck Institut in Göttingen (AK Jakobs) wurde ein Teil der fixierten CHO-K1 Proben mittels hochauflösender STED-Mikroskopie untersucht (siehe Kapitel 3.15.3).

Der andere Teil der fixierten Proben wurde für die intrazelluläre Antikörperfärbung der Mitochondrien und die Untersuchung am Konfokalmikroskop verwendet. Hierfür wurden die fixierten Zellen mittels Digitonin (0,05 % (w/v)) permeabilisiert, um den Eintritt von Antikörpern in das Zellinnere zu ermöglichen. Das Digitonin permeabilisiert die Zellmembran der CHO Zellen durch Solubilisierung von Cholesterin, ohne dabei die Mitochondrienmembranen zu zerstören. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die

Proben zweimal mit 500 μ L PBS gewaschen (2000 x g, 5 min). Entsprechend der Antikörperfärbung isolierter Mitochondrien wurden die Zellen nach Zugabe des primären Antikörpers anti-Tom20 (1:100 in PBS) für 30 min inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen (2000 x g, 5 min). Im nächsten Schritt wurden die Proben mit dem sekundären Antikörper inkubiert (1:200 in PBS, 30 min, unter Lichtausschluss). Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal mit 500 μ L PBS gewaschen (2000 x g, 5 min) und in 200 μ L PBS resuspendiert. Die markierten Mitochondrien der CHO-K1 Zellen wurden bei 100-facher Vergrößerung fluoreszenzmikroskopisch visualisiert.

Die intrazelluläre Analytik der Mitochondrien wurde für mehrere Batch-Kultivierungen im Bioreaktor sowie für die synchronisierten Batch-Kultivierungen und für die Proben einer kontinuierlichen Kultivierung durchgeführt.

3.15 Mikroskopische Methoden

3.15.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) bietet die Möglichkeit Objektoberflächen bis zu 100.000-fach zu vergrößern und somit Details zu betrachten, die unter dem Lichtmikroskop nicht aufgelöst werden können. Zusätzlicher Vorteil ist die hohe Tiefenschärfe und der 3D-Eindruck der Bilder im Vergleich zur Lichtmikroskopie. Für die Untersuchung der Oberflächenstrukturen wurden CHO-K1 Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (Viabilität > 98 %) für die hochauflösende REM vorbereitet. Hierfür wurden 10 mL Zellsuspension ($1 \cdot 10^6$ Zellen/mL) mit PBS gewaschen und für 12 h in 5 % Glutaraldehydlösung (15 mL, in sterilen Zentrifugenröhrchen) fixiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (jeweils 5 min, 200 x g) und anschließend in aufsteigender Ethanolreihe (20 %, 40 %, 60 %, 80 %) entwässert:

20 %: 2,1 mL Ethanol (96 %) + 7,9 mL PBS

40 %: 4,2 mL Ethanol (96 %) + 5,8 mL PBS

60 %: 6,3 mL Ethanol (96 %) + 3,7 mL PBS

80 %: 8,4 mL Ethanol (96 %) + 1,6 mL PBS

Nach dem letzten Entwässerungsschritt wurden die Zellen für 12 h in 10 mL 96 % Ethanol (unvergällt) inkubiert. Zur Vorbereitung auf die Kritische-Punkt-Trocknung wurde das Ethanol in zwei Schritten durch n-Amylacetat ausgetauscht:

50 % Ethanol (96 %) + 50 % n-Amylacetat (für 2 h)

100 % n-Amylacetat (für 12 bis 24 h)

Das entwässerte Präparat wurde auf Polylysin-beschichteten Glasdeckgläschen fixiert und vorsichtig auf die Oberfläche eines selbstklebenden Probenhalters aufgebracht. Zur Trocknung der Präparate wurden diese mit einer ausreichenden Menge n-Amylacetat in die Druckkammer einer Kritischen-Punkt-Trocknungsanlage überführt. Der Kritische Punkt von flüssigem CO₂ liegt bei 31°C und 73,8 bar. Um das n-Amylacetat schrittweise gegen flüssiges CO₂ auszutauschen, wurden Temperatur und Druck innerhalb der Kammer auf Werte oberhalb des kritischen Punktes für CO₂ gebracht (hier: 40°C, 80 – 85 bar).

Für die leitfähige Kontrastierung der REM-Proben wurden diese in einem Polaron High Resolution Sputter Coater mit einer feinen Goldschicht (20 nm) überzogen. Hierfür wurden die Probenhalter in die Druckkammer der Sputteranlage eingebracht, in der ein Inertgasvakuum mittels Argon erzeugt wurde. Die Visualisierung der goldbeschichteten Proben erfolgte anschließend unter Hochvakuum in einem Rasterelektronenmikroskop.

3.15.2 Fluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie können biologische Proben mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe visualisiert werden. Die Fluorophore, die durch die spezifische Antikörpermarkierung an den sekundären Antikörpern konjugiert sind, absorbieren Licht bei einer bestimmten Wellenlänge und emittieren Licht von größerer Wellenlänge im sichtbaren Bereich. Konfokale Mikroskope sammeln das Fluoreszenzsignal selektiv aus der Fokusebene, während Signale aus anderen Präparatebenen ausgeblendet werden. Dies führt zu schärferen und kontrastreichen Abbildungen verglichen mit gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopen. Die Bilder entstehen durch das zeilenweise Abtasten der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl. Allerdings ist die optische Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der Beugungsgrenze auf ~200 nm beschränkt, so dass beispielsweise Proteinkomplexe hierdurch nicht aufgelöst werden können [169].

Die morphologische Untersuchung isolierter Mitochondrien (3.14.5) sowie die Analytik der Mitochondrienverteilung innerhalb der CHO-K1 Zellen (3.14.6) erfolgten mit Hilfe

fluoreszenz- und konfokalmikroskopischer Betrachtungen. Für die Immunfärbung isolierter oder intrazellulärer Mitochondrien wurde der primäre Antikörper gegen Tom20 verwendet, welcher durch den sekundären, grünfluoreszierenden Antikörper Goat-Anti-Rabbit-IgG detektiert wurde (siehe 3.3). Sowohl einfache Fluoreszenzmikroskopie als auch konfokalmikroskopische Untersuchungen wurden an dem gleichen Mikroskop (Eclipse C1, Nikon Corp.) durchgeführt. Für den konfokalen Betrieb wurden zusätzlich die entsprechenden Laser (violett, blau, oder grün; ermöglicht eine simultane 3-Kanal-Fluoreszenzdetektion) aktiviert. Über eine an der Mikroskopapparatur angebrachte Tischsteuerung (Pro Scan) konnte dabei die jeweilige Probe beliebig in Richtung der x-, y- und z-Achsen angesteuert und automatisiert in bidirektional gescannt werden (in 50 nm Schritten). Das Umschalten zwischen Fluoreszenz und Durchlicht wurde über einen Schutter direkt gesteuert. Fluoreszenzaufnahmen markierter Mitochondrien wurden bei 100-facher Vergrößerung (Immersionöl) mit Hilfe einer CCD-Kamera (DS-U1, Nikon Corp.) erfasst, die direkt an das konfokale Fluoreszenzmikroskop angebracht wurde. Die Feinjustierung, Bildspeicherung und Bildverarbeitung wurde über die Software „EZ-C1“ (Nikon Corp.) geregelt. Für die Evaluierung mikrofluidischer Systeme mit fluoreszierenden Partikeln oder fluoreszenzgefärbten Zellen wurden diese bei 10- bis 20-facher Vergrößerung gescannt. Durch einen gewählten Aufnahmemodus konnte hierbei pro Sekunde ein Bild gespeichert werden.

3.15.3 STED-Mikroskopie

Zur detaillierten Analyse der Mitochondrienstruktur und der Verteilung mitochondrialer Proteine in CHO-K1 Zellen wurde die hochauflösende Stimulated Emission Depletion (STED) Mikroskopie am Max-Planck-Institut (MPI) für Biophysikalische Chemie (Göttingen, AK Jakobs; Dr. Stefan Stoldt) verwendet. Die STED-Mikroskopie ermöglicht bei der Visualisierung biologischer Proben eine optische Auflösung zwischen 50 und 25 nm und unterschreitet damit die beugungsbegrenzte Auflösung [243].

Der Aufbau des verwendeten STED-Mikroskops wurde speziell für die Analyse biologischer Proben angepasst und wird von Kukut et al. beschrieben [244]. Die Probenvorbereitung ist in Abschnitt 3.14.6 beschrieben. Für die Immunfärbung der Mitochondrien wurden primäre Antikörper gegen Tom20, PDH bzw. OGDH verwendet (siehe 3.3). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte durch Inkubation mit einem

sekundären Goat-anti-rabbit-Antikörper mit dem roten Fluorophor ATTO647N (AttoTec). Die fertig präparierten Proben wurden anschließend an das MPI in Göttingen geschickt (Trockeneistransport) und als Kooperationsprojekt durch Dr. S. Stoldt STED-mikroskopisch analysiert. Die STED-Mikroskopie wurde mit einem Titan-Saphir-Laser (MIRA900; Coherent) bei einer Anregung von 760 nm mit 76 MHz durchgeführt. Die Verzögerung zwischen Exzitation und STED-Puls wurde elektronisch aufgezeichnet. Die Exzitations- und die STED-Strahlen wurden durch eine 100-fache Ölimmersionslinse zusammengeleitet. Die schrittweise Scannung der Proben erfolgte durch einen zweiaxialen Strahlenscanner (Yanus IV; Till Photonics). Weitere Details dieser Methode können den Referenzen [161, 244, 245] und [246] entnommen werden.

Datenanalyse

Anhand der erhaltenen Bildaufnahmen der STED-Mikroskopie wurden Informationen über die Verteilung, die Größe und die Dichte der detektierten mitochondrialen Proteincluster generiert. Durch diese Informationen sollten Rückschlüsse auf die Dynamik der mitochondrialen Proteine in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen oder der Zellzyklusphasen gezogen werden. Die Analyse und Datenauswertung der gescannten Proben wurde hierbei gemäß Wurm et al. [161] durchgeführt und wird hier nur kurz zusammengefasst.

Im ersten Schritt der Datenanalyse wird der Durchmesser der detektierten Proteincluster (in Abb. 17 als kreisförmige Strukturen dargestellt) durch 2D-Autokorrelation bestimmt. Hierfür wurden durch Wurm et al. spezielle Algorithmen und Masken entwickelt, welche automatisch die individuellen Proteincluster in den aufgenommenen Fluoreszenzbildern erfassen und anschließend deren Größe bestimmen können (siehe [161], Supporting Information). Pro Bildaufnahme werden dabei bis zu 70 Clusterregionen analysiert und aus diesen die Medianwerte berechnet. Anschließend (Abb. 17, 2.) wird die Dichte der Cluster analysiert und auf die detektierte Fläche umgerechnet (Cluster/ μm^2). Hierfür wird ebenfalls ein Algorithmus angewandt, der das lokale Fluoreszenzmaximum im Zentrum der Mitochondrien (im Durchmesser von 150 nm) detektiert und den Abstand zu den umliegenden Clustern bestimmt. Im letzten Schritt erfolgt die Analyse der normierten Varianz der Fluoreszenzintensität der gesamten Cluster. Die Fluoreszenzintensität wird hierfür in den runden Clusterregionen über einen Durchmesser von 7 Pixeln (entsprechend

~140 nm) bestimmt. Die normierte Varianz stellt dabei den empfindlichsten Wert für die Untersuchung der Verteilungsunterschiede der markierten Proteine dar. Für die Berechnung der normierten Varianz wurde folgende Formel verwendet [161]:

$$\text{Normierte Varianz der Fluoreszenzintensität} = \frac{\sum(X - \bar{X})^2}{(n-1)\bar{X}^2}$$

Durchschnittliche Fluoreszenzintensität: \bar{X}

Fluoreszenzintensität eines Pixels: X

Der Ablauf der Datenanalyse ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

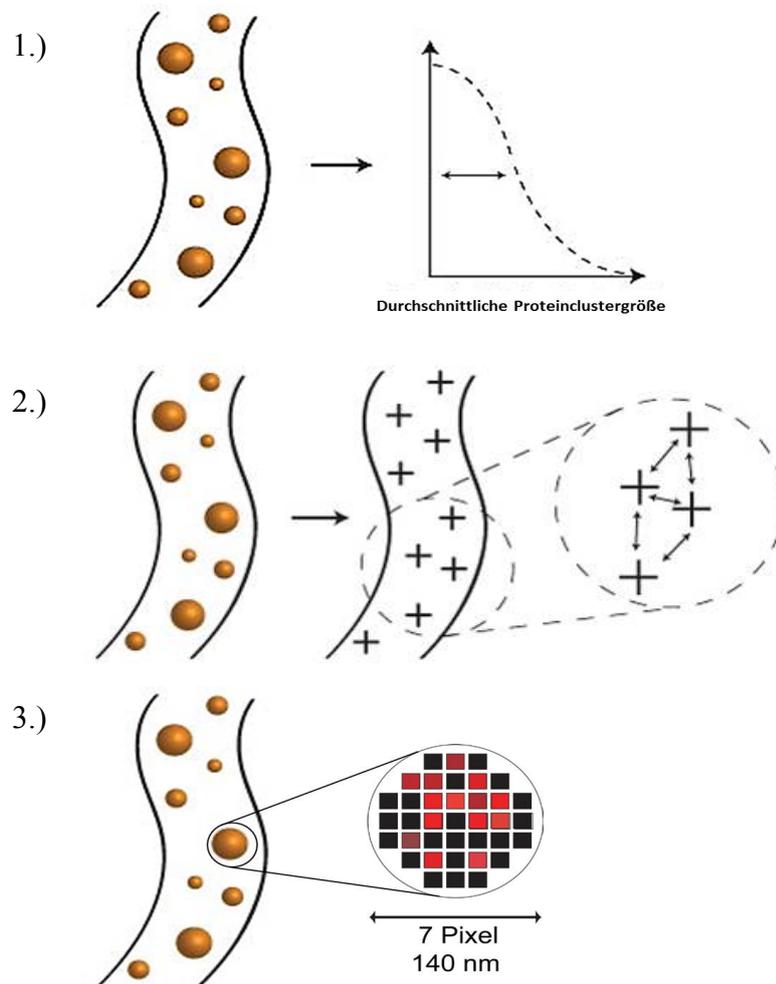


Abb. 17: Schema zur Datenanalyse der mitochondrialen Proteincluster, die mittels STED-Mikroskopie visualisiert wurden.

1.) Bestimmung der Clustergröße; 2.) Analyse der Clusterdichte; 3.) Bestimmung der normierten Varianz der Fluoreszenzintensität. (Die Abbildungen wurden freundlicher Weise von Dr. Stefan Stoldt zur Verfügung gestellt und hier modifiziert.)

3.16 In-Cell ELISA

Für die Bestimmung der Regulation der mitochondrialen Schlüsselenzyme Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (OGDH) in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen bzw. der Zellzyklusphasen wurde die Methode des In-Cell ELISAs verwendet. Bei dieser immunocytochemischen Methode werden die Zielproteine durch spezifische primäre Antikörper gebunden und diese wiederum durch sekundäre, enzymgebundene HRP- (Horseradish Peroxidase) oder AP- (Alkalische Phosphatase) Antikörper detektiert und quantifiziert. Der In-Cell ELISA ermöglicht eine spezifische und quantitative Bestimmung des relativen Proteingehalts oder posttranslationaler Modifikationen in kultivierten Zellen. Die Proteine (z.B. Enzyme) werden hierbei *in vitro* direkt innerhalb der fixierten Zellen und ihrem zellulären Kontext detektiert, ohne dass eine separate Extraktion der Proteine erforderlich ist. Hierdurch können häufig auftretende Artefakte und Veränderungen in Zellysaten vermieden werden. Im Gegensatz zur Proteindetektion mittels Western Blots, lassen sich mithilfe des In-Cell ELISAs aufwendige und fehleranfällige Schritte wie Zellyse, Gelelektrophorese und Transfer des Zielproteins vermeiden.

Das verwendete In-Cell ELISA Kit (MitoSciences, USA) ermöglicht die parallele Analyse mehrerer Zellproben in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Die Experimente wurden mit CHO-K1 Zellen als Triplikate gemäß der Herstellervorgaben (PhosphoPDH In-Cell ELISA Kit (Colorimetric)) für die Enzyme PDH und OGDH mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Da das verwendete Kit jedoch für adhärent wachsende Zellen ausgelegt ist, wurden die in dem Herstellerprotokoll angegebenen Versuchsbedingungen zuvor an Suspensionszellen angepasst. Hierfür wurden die Mikrotiterplatten vor Gebrauch mit Polylysin inkubiert (15 μ L pro Well, 10 min) und danach zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Test $2 \cdot 10^5$ CHO-K1 Zellen in die beschichteten Wells pipettiert und die Mikrotiterplatten zentrifugiert (500 x g, 8 min), um die Zellen zu sedimentieren. Eine Übersicht des Protokolls ist in Abbildung 18 dargestellt.

3.16.1 In-Cell ELISA Protokoll

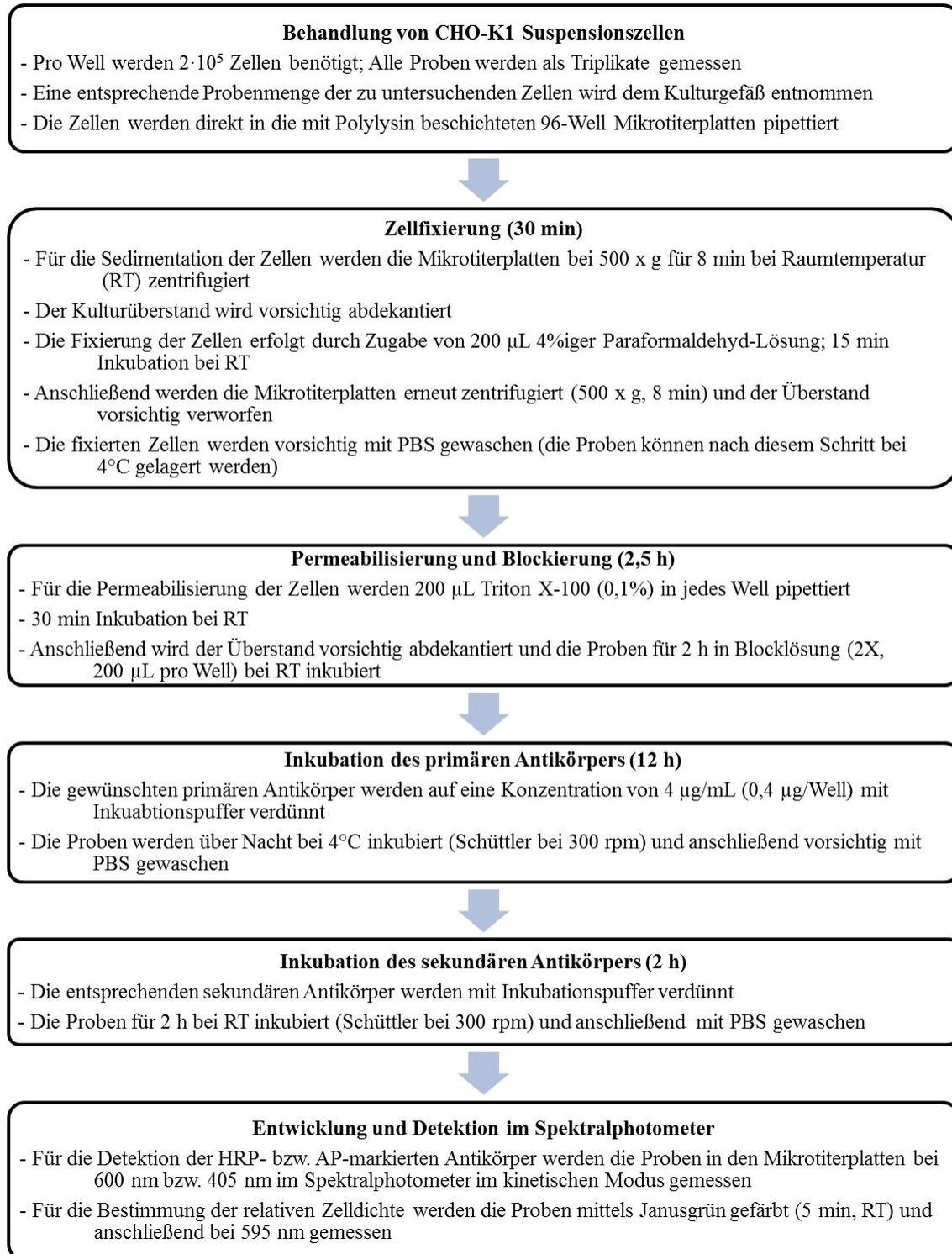


Abb. 18: Übersicht des Protokolls zur In-Cell ELISA Messung.

3.16.2 Detektion von PDH und OGDH

Mit dem In-Cell ELISA Assay wurde durch spezifische primäre Antikörper der relative Proteingehalt der mitochondrialen Enzyme PDH und OGDH bestimmt. Die verwendeten monoklonalen Antikörper sind unter Kapitel 3.3 aufgelistet.

Für die Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase, einem Enzym des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PDHC), wurde einerseits die gesamte Untereinheit E1 α detektiert und andererseits die Phosphorylierung der drei regulatorischen E1 α Serinreste: Ser232, Ser293 und Ser300. Die Proben der E1 α Serinreste wurden in separaten Wells mit den entsprechenden Antikörpern in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inkubiert. Jede dieser Proben wurde gleichzeitig auch mit dem E1 α (total) Antikörper inkubiert (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Phosphorylierung der E1 α Serinreste wurde parallel gemessen, indem ein HRP-markierter sekundärer Antikörper verwendet wurde. Die gesamte E1 α Untereinheit wurde gleichzeitig in jedem Well mittels AP-markiertem sekundären Antikörper gemessen.

Das Enzym OGDH, das eines der drei Komponenten des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OGDC) bildet, wurde durch die Bindung des entsprechenden monoklonalen OGDH-Antikörpers (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) detektiert. Der relative OGDH-Gehalt wurde ebenfalls kolorimetrisch durch die Verwendung eines HRP-markierten sekundären Antikörpers gemessen.

Die markierten Antikörper-Protein-Komplexe wurden kolorimetrisch mittels Mikroplatten-Spektralphotometer detektiert. Die gemessene Absorptionsintensität, die durch die Farbentwicklung der markierten sekundären Antikörper entsteht, korreliert dabei mit dem Proteingehalt in dem jeweiligen Well. Das Signal der spezifischen Antikörper-Protein-Komplexe lässt sich durch eine anschließende Janusgrün-Färbung der Zellen auf die Zellmenge pro Well normieren. Hierdurch werden die Abweichungen der tatsächlichen Zelldichte in den jeweiligen Wells berücksichtigt.

3.16.3 AP-Entwicklung für die Detektion der PDH Untereinheit E1 α (total)

Im Anschluss an die Inkubation des sekundären Antikörpers und der darauf folgenden Waschschrte wird die AP-Entwicklung durch die Zugabe des im Kit enthaltenen AP-Entwicklungsreagens gestartet. Dabei entwickelt sich in Abhängigkeit von der Konzentration der AP-gebundenen Antikörper eine gelbe Färbung der Proben, die bei folgenden Einstellungen am Spektralphotometer gemessen wird:

Betriebsweise:	Kinetisch
Wellenlänge:	405 nm
Zeit:	20 min
Messintervall:	20 s
Schüttler:	schütteln zwischen den Messungen

3.16.4 HRP-Entwicklung

Die HRP-Entwicklung wurde für die Detektion der Phosphorylierung der E1 α Serinreste (Ser232, Ser293 und Ser300) sowie für die Detektion von OGDH durchgeführt. Die HRP-Entwicklung erfolgt durch Zugabe des im Kit enthaltenen HRP-Entwicklungsreagens (immer erst nach der AP-Entwicklung). In Abhängigkeit von der Konzentration der HRP-gebundenen Antikörper entwickelt sich hierbei eine blaue Färbung der Proben, die mittels Spektralphotometer gemessen wird:

Betriebsweise:	Kinetisch
Wellenlänge:	600 nm
Zeit:	15 min
Messintervall:	20 s
Schüttler:	schütteln zwischen den Messungen

3.16.5 Komplette Zellfärbung mittels Janusgrün

Für die Normierung der erhaltenen Messsignale auf die Zellzahl pro Well wurden die Proben im Anschluss an die Entwicklung der markierten Antikörper mittels Janusgrün-Färbereagens inkubiert (50 μ L pro Well, 5 min bei RT). Nach fünffachem Waschschrift mit Reinstwasser erfolgt in Abhängigkeit der Zellkonzentration die Farbentwicklung von Janusgrün durch die Zugabe von 0,5 M HCl (100 μ L pro Well, 10 min Inkubation bei RT). Die Intensität der Janusgrün-Färbung der Proben wird im Spektralphotometer bei 595 nm gemessen.

3.16.6 In-Cell ELISA Datenanalyse

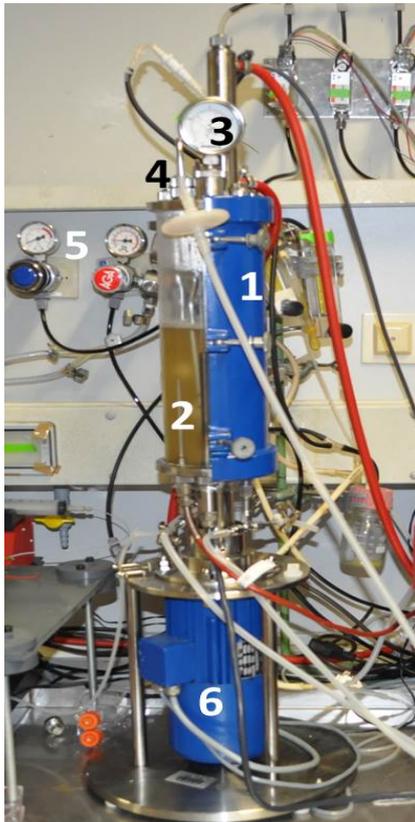
Die gemessenen Signale wurden von der Software „SkanIt 2.4.2“ (Thermo Scientific) des Spektralphotometers automatisch gespeichert. Die Auswertung der Daten wurde mittels Microsoft Excel durchgeführt. Hierbei wurde zunächst das Hintergrundsignal aller In-Cell ELISA (ICE) Messungen korrigiert, indem der erhaltene Mittelwert des Messsignals in Abwesenheit des primären Antikörpers (Referenz) von den anderen Messungen subtrahiert wurde. Anschließend wurden die ICE Messsignale auf die Zellzahl pro Well normiert. Hierfür wurden die bereits korrigierten ICE Signale durch das Janus-Grün-Signal dividiert.

3.17 Mikrofluidische Experimente

Für die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Experimente zum Test der am Institut für Mikrosystemtechnik (TUHH, AK Müller, Negar Rajabi) entwickelten mikrofluidischen Chips wurden sowohl grün-fluoreszierende CHO-sfs-GFP Zellen als auch CHO-K1 Zellen verwendet. Diese wurden entsprechend der Erhaltungskultur (siehe Kapitel 3.10.2 und 3.10.2) kultiviert. Für die Hauptexperimente nach erfolgter Systemintegration wurden ausschließlich CHO-K1 Kultivierungen im VSF2000 Bioreaktor durchgeführt.

3.17.1 Kultivierung im VSF2000 Bioreaktor mit Überdruck

Für die Kultivierung der CHO-K1 Zellen mit Überdruck wurde in dieser Arbeit der Bioreaktor VSF2000 (Bioengineering, Schweiz) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Folienreaktor, der durch einen speziellen Stahlschutzmantel Drücken von bis zu 2,5 bar standhält.



Technische Daten:

Arbeitsvolumen:	500 bis 1500 mL
Durchmesser:	10,4 cm
Reaktorboden:	flacher Boden
Reaktorrührer:	6-RT (6-Blatt radial-discharging, Rushton)
Rührerdrehzahl:	300 rpm
Begasung:	ringförmiges Einlassrohr

Abb. 19: Aufbau des VSF2000 Bioreaktors (in Betrieb).

1) Stahlmantel (zur Veranschaulichung hier nur halbseitig montiert), 2) Folienreaktor befüllt mit Kulturmedium, 3) Manometer, 4) Begasungseinlass zum Aufbau von Überdruck, 5) Druckluftzufuhr, 6) Antriebsmotor.

Das anfängliche Kulturvolumen betrug bei jedem Versuch 1,5 L. Die Vorkulturen wurden entsprechend der Erhaltungskultur kultiviert (siehe Kapitel 3.10.2) und während der exponentiellen Phase bei einer Viabilität von $\geq 98\%$ für das Inokulum geerntet. Der VSF2000 Bioreaktor wurde nach dem Autoklavieren mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL angeimpft. Die Kultivierungstemperatur wurde über innenliegende Heizstäbe auf 37°C geregelt und der Rührer auf eine Geschwindigkeit von 300 rpm gesetzt. Während der Kultivierung wurde ein pH-Wert von 7,2 durch die Begasung mit CO_2 und die Verwendung einer 0,5 M Natriumcarbonatlösung (Na_2CO_3) konstant gehalten. Die Begasung wurde über den Deckel des Bioreaktors angeschlossen und während der Versuche reguliert, um einen Überdruck von 0,5 bis 2,5 bar zu erzeugen.

3.17.2 Mikrofluidische Systeme

Das Design und die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten mikrofluidischen Systeme erfolgten am Institut für Mikrosystemtechnik (TUHH, AK Müller, Negar Rajabi). Biologische Experimente zur Evaluierung der Systeme und einzelner mikrofluidischer Module wurde innerhalb dieser Arbeit in Kooperation mit Negar Rajabi im Bereich der Zellkultur des Instituts für Bioprozess- und Biosystemtechnik (TUHH, AK Zeng) durchgeführt. Experimente mit einzelnen Mikrochipmodulen, die für die Probenverarbeitung von CHO Zellen entwickelt wurden, konnten hierbei erfolgreich getestet werden [247–249]. Die Details zum Design, zur Herstellung und Evaluierung der einzelnen Mikrochipmodule können den entsprechenden Publikationen entnommen werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Design für einen integrierten „Lab-on-a-Chip“ (LoaC) entwickelt, welcher die einzelnen Module miteinander kombiniert.

3.17.3 Design des integrierten Lab-on-a-Chip

Das Design des LoaC besteht aus fünf verbundenen mikrofluidischen Modulen, die auf einem einzigen Chip integriert sind. Der schematische Aufbau des LoaC ist in Abbildung 20 dargestellt.

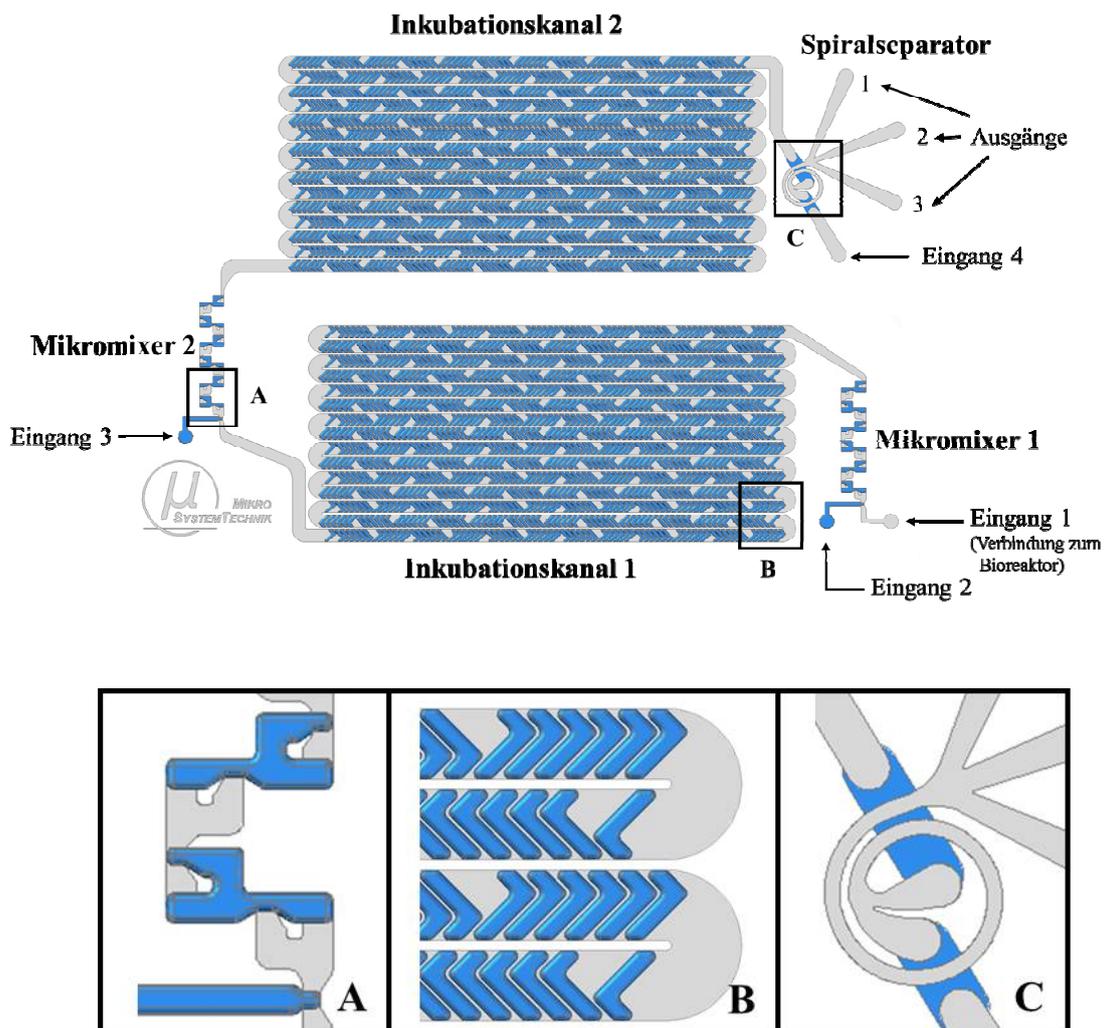


Abb. 20: Design des integrierten LoaC.

Fünf verbundene Chipmodule für die Mischung der Zellsuspension mit einem gewünschten Medium, die definierte Inkubation und die Separation der Zellen vom Medium. Die detaillierte Ansicht der einzelnen Chipmodule ist in der unteren Grafik dargestellt: Mikromischer (A), Inkubationskanal (B), Spiralseparator (C). Strukturen, die in Silizium geätzt werden, sind in grau dargestellt; Strukturen, die in Glas geätzt werden, sind in blau gezeichnet [250].

Das erste Modul des Mikrochips ist ein „Split-and-Recombine“ (SAR) Mikromixer (Mikromixer 1), der ein schnelles Mischen der Zellsuspension [249] mit Kulturmedium (oder anderen gewünschten Lösungen) ermöglicht. Dieses Modul verfügt über zwei Eingänge. Der erste Eingang kann direkt mit dem Bioreaktor verbunden werden, um so eine kontinuierliche Probenahme zu ermöglichen. Der zweite Eingang ist an eine Spritzenpumpe angeschlossen. Dieser Eingang kann dafür genutzt werden um

beispielsweise einen definierten Substratpuls (oder nach Belieben eine andere Lösung) innerhalb von Millisekunden mit der Zellprobe zu vermischen. Durch die dreidimensionale Kanalgeometrie werden Flüssigkeiten hier in einer Mischeinheit aufgeteilt und in der darauffolgenden Mischeinheit wieder vereint. Dieser Mechanismus verdoppelt die Anzahl der Flüssigkeitsschichten nach jeder Mischeinheit, wodurch quasi ein Stapel aus dünnen Flüssigkeitsschichten mit niedrigen Diffusionsstrecken gebildet wird [249]. Darüber hinaus wird die Durchmischung in dem System durch die chaotische Advektion in den 90°-Wendungen der Kanalstrecke erhöht. Diese haben eine positive Auswirkung auf die Bildung der Flüssigkeitsschichten in den Wiedervereinigungsregionen des Mischers.

Die zweite Einheit des LoaC bildet der Inkubationskanal 1, der aus einem mehrfach gewundenen Kanal besteht. Das Kanaldesign basiert auf sogenannten „Staggered Herringbone Micromixer“ (SHM) Strukturen (gestaffeltes Fischgrätenmuster). Die Durchmischung des Flüssigkeitsflusses wird durch die wirbelnden Bewegungen erzielt, die durch die SHM-Rillen erzeugt werden [251]. Hierdurch wird die gesamte Verweilzeitverteilung der Zellen deutlich gesenkt.

An diese Inkubationseinheit ist ein zweiter Mikromischer angeschlossen, dessen Design identisch zu dem des ersten Mikromischers ist. Dieser Mischer hat einen zusätzlichen Eingang (Eingang 3, der innerhalb dieser Arbeit an eine Spritzenpumpe angeschlossen wurde), der für die Zufuhr einer weiteren Lösung (z.B. Substratpuls, Puffer, Quenchingreagenz) verwendet werden kann [248]. Das zweite Mischmodul ist wiederum an einen zweiten Inkubationskanal angeschlossen, der das gleiche Design wie der erste Inkubationskanal besitzt.

Bevor die Zellen das Chipsystem verlassen, bildet ein Spiralseparator die letzte Einheit des LoaC. Der Spiralseparator verfügt über drei Ausgänge und einen Eingang (Eingang 4, der innerhalb dieser Arbeit an eine Spritzenpumpe angeschlossen wurde), der in den durchgeführten Experimenten für die Zugabe eines Waschmediums (z.B. physiologische Kochsalzlösung oder PBS) verwendet wurde. Der Spiralseparator ermöglicht bei einer definierten Flussrate die Trennung der Zellen von ihrem extrazellulären Medium. Gleichzeitig wird in einem kontinuierlichen Fluss das ursprüngliche Zellkulturmedium schnell durch das Waschmedium ausgetauscht [252]. Der zugrundeliegende Mechanismus des Spiralseparators beruht auf dem Phänomen der trägen Fokussierung („Inertial Focusing“) [253, 254]. Die Zellen, die von dem vorangehenden mikrofluidischen Modul

ankommen, werden an dessen innerer Wand in den Spiralseparator geleitet. Gleichzeitig wird das Waschmedium an der äußeren Wand des gebogenen Kanals in den Spiralseparator gepumpt. Wenn die Zellen durch den gebogenen Kanal fließen, bewegen sie sich von ihrer Ausgangsposition weg und erreichen ein Gleichgewicht an der äußeren Wand des gebogenen Kanals. Dort befinden sich die Dean-Kräfte im Gleichgewicht mit der Auftriebskraft, was die träge Migration der Zellen bewirkt [253, 254]. Der Großteil des Zellkulturmediums verbleibt hingegen während des Durchlaufs dicht an der inneren Wand des Spiralseparators. Durch diesen Effekt werden die Zellen von ihrem Ausgangsmedium in das neue Medium überführt.

3.17.4 Herstellung des integrierten Lab-on-a-Chip

Für die Herstellung des integrierten LoaC wurden Glas-Silizium-Glas Substrate verwendet, die durch konventionelle Mikrofabrikationstechniken bearbeitet wurden. Nach der Erstellung der entsprechenden Masken mittels Photolithographie wurden die Kanäle in dem Siliziumsubstrat durch den DRIE-Prozess (Deep Reactive Ion Etching) strukturiert. Für die Herstellung der Kanäle in den Glassubstraten wurde Flußsäure (HF, 49 %ig) in einem nasschemischen Ätzprozess verwendet. Anschließend wurden die Substrate anodisch gebondet um eine lückenlose und permanente Substratbindung zu gewährleisten (Sandwichttechnologie). Dieses Verfahren erlaubt eine hohe Flexibilität im Entwurf von dreidimensionalen Kanalgeometrien. Der fertige Mikrochip wurde wahlweise auf Heizfolien aufgebracht. Diese Heizfolien ermöglichen eine homogene Erwärmung des Chips auf 37°C, wodurch die physiologische Temperatur der CHO-K1 Zellen während der Experimente erhalten werden kann.

3.17.5 Integration des Lab-on-a-Chip in den Bioreaktor

Das in Kapitel 3.17.3 beschriebene mikrofluidische System wurde über dünne Glaskapillaren direkt an den VSF2000 Bioreaktor angeschlossen. Während der mikrofluidischen Experimente wurde der Bioreaktor mit einem Stahlmantel umschlossen, der Drücken von bis zu 2,5 bar standhält. In die Spritzenpumpen wurden Luerlock-Spritzen eingespannt, die mit sterilfiltrierten Medien, Puffern oder entsprechend benötigten Lösungen aufgefüllt wurden. Die Spritzen wurden über Kapillarröhrchen direkt mit dem Mikrochip verbunden (Eingänge 2, 3 und 4; siehe Abb. 20).

Die Pumpraten der Spritzenpumpen wurden in vorherigen Experimenten ohne Bioreaktor bestimmt [248] und innerhalb der hier gezeigten Versuchsreihe auf feste Werte eingestellt:

Eingang 2: 250 $\mu\text{L}/\text{min}$

Eingang 3: 250 $\mu\text{L}/\text{min}$

Eingang 4: 1450 $\mu\text{L}/\text{min}$

Eingang 1 wurde direkt mit dem Bioreaktor verbunden und die Flussrate über den angelegten Überdruck auf den Reaktor geregelt.

3.17.6 Medien austausch und Separation von CHO-K1 Zellen

Um optimale experimentelle Bedingungen zu gewährleisten, wurden die gesamte Flussrate des Mikrosystems sowie die Separationseffizienz von Zellen und Medium in entsprechenden Vorversuchen durch das Anlegen verschiedener Drücke ermittelt. Hierfür wurden die Spritzenpumpen, die an den Eingängen 2, 3 und 4 des Loac angeschlossen waren, mit sterilfiltrierter NaCl-Lösung (0,9 %) bei konstant bleibenden Einstellungen betrieben (siehe Kapitel 3.17.5). Der Überdruck auf den Bioreaktor wurde langsam durch einen erhöhten Gasdurchfluss gesteigert und über ein angeschlossenes Manometer kontrolliert. Experimente wurden bei Drücken im Bereich von 0,5 bis 2,5 bar durchgeführt. In Anlehnung an die aus diesen Vorversuchen erhaltenen Ergebnisse (siehe Kapitel 4.2.1) wurden alle weiteren mikrofluidischen Experimente mit dem integrierten Bioreaktor bei 2 bar Überdruck (was einer Flussrate von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ entspricht) durchgeführt. Die gesamte Flussrate in dem Mikrochip betrug somit 2,25 mL/min.

3.17.7 Biologische Experimente im Lab-on-a-Chip

Der Aufbau des hier verwendeten Loac bietet die Möglichkeit die vom Reaktor kommende Zellsuspension für zwei verschiedene, definierte Zeiträume zu inkubieren. Durch das Design der integrierten Inkubationskanäle und die gewählten Pumpraten bzw. Fließgeschwindigkeiten im System, wurde für diese Kanäle jeweils eine Inkubationszeit von 9 s bestimmt. Da die Zellprobe sowohl den ersten, als auch den zweiten Inkubationskanal passieren muss, lässt sich die Suspension nach dem hier gewählten Versuchsaufbau für 9 s inkubieren, wenn ein Substrat- oder Reagenzpuß am zweiten Inkubationskanal (Eingang 3) hinzu gegeben wird. Eine Inkubationszeit von 18 s lässt sich

hingegen durch eine entsprechende Zugabe erzielen, die bereits im ersten Inkubationskanal (Eingang 2) erfolgt, so dass die Inkubation der Zellsuspension in beiden Kanäle stattfindet. Diese Eigenschaft des Mikrosystems ermöglicht somit die Durchführung von Pulsexperimenten unter dynamischen Bedingungen sowie eine definierte Inkubation der Zellen mit gewünschten Reagenzien.

Die Funktionalität des integrierten Mikrochip-Bioreaktor-Systems wurde einerseits durch die Zugabe von Digitonin für die selektive Permeabilisierung der Zellmembranen und andererseits durch Substrat-Pulsexperimente mit L-Glutamin-haltigen Medien getestet.

Zellpermeabilisierung im LoaC mittels Digitonin

Basierend auf den Ergebnissen entsprechender Vorversuche [252, 255, 256] wurde die Permeabilisierung der CHO-K1 Zellen im integrierten LoaC mit Digitonin in einer Endkonzentration von 0,01 % (w/v) durchgeführt. Hierfür wurde eine Digitonin-Stammlösung (0,025 % (w/v)) über die Spritzenpumpe am Eingang 3 in den LoaC gepumpt (250 $\mu\text{L}/\text{min}$). Um die Stoffwechselreaktionen der CHO-K1 Zellen im Vorfeld der Permeabilisierung weitestgehend zu reduzieren, wurde gleichzeitig über die Spritzenpumpe am Eingang 2 eine auf Eis gekühlte 0,9 % NaCl-Lösung („Quenching-Lösung“) in das Mikrosystem gepumpt (250 $\mu\text{L}/\text{min}$). Für die Überführung der permeabilisierten Zellen in ein neues Medium wurde über die Spritzenpumpe am Eingang 4 ebenfalls 0,9 % NaCl-Lösung als Waschlösung in den Spiralseparator gepumpt (1250 $\mu\text{L}/\text{min}$).

L-Glutamin-Pulsexperimente

Für die Durchführung metabolischer Pulsexperimente mit dem integrierten LoaC wurden die CHO-K1 Zellen unter substratlimitierten Bedingungen kultiviert. Um exemplarisch den Einfluss von L-Glutamin-Pulsen auf die Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst ohne L-Glutamin kultiviert. Hierfür wurde der VSF2000 Bioreaktor wie unter 3.17.1 beschrieben mit CHO-K1 Zellen angeimpft, wobei jedoch das Kulturmedium (TC-42) ohne supplementiertes L-Glutamin verwendet wurde. Auf diese Weise wurden die Zellen vor dem Start der Pulsexperimente für insgesamt 6 h unter glutaminfreien Bedingungen kultiviert. Die entsprechenden Pulsexperimente im LoaC wurden mit L-Glutamin-supplementiertem (4 mM) TC-42 Medium durchgeführt. Das glutaminhaltige Medium

wurde vor der Verwendung auf 37°C vorgewärmt, in sterile Spritzen gefüllt und mithilfe der Spritzenpumpen, die an den Eingängen 2 und 3 angeschlossen wurden, bei einer Pumprate von 250 µL/min in des Mikrosystem gepumpt. Für einen Substratpuls von 9 s wurde die an Eingang 3 angeschlossene Spritzenpumpe betrieben, während die Pumpe, die an Eingang 2 angeschlossen war, abgeschaltet wurde. Andersherum wurde für einen Puls von 18 s die Spritzenpumpe an Eingang 2 betrieben, während die Pumpe an Eingang 3 abgeschaltet wurde. Über eine Spritzenpumpe am Eingang 4 wurde mit einer Pumprate von 1450 µL/min kontinuierlich Waschmedium (0,9 % NaCl) in den Spiralseparator injiziert, um die Zellen am Ende des Mikrochipsystems von ihrem Kulturmedium zu trennen. Als Referenzproben wurden CHO-K1 Zellen aus dem Bioreaktor ohne die Zugabe eines Glutaminpulses durch das LoaC geleitet (0 s Inkubation).

Jedes Experiment wurde über eine Zeitdauer von 45 min kontinuierlich durchgeführt. Die Proben wurden jeweils an den drei Ausgängen des Spiralseparators in sterilen Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Um die Stoffwechselaktivität der Zellen zu reduzieren wurden die Proben, die für metabolische Untersuchungen verwendet werden sollten, direkt auf Trockeneis in separaten Zentrifugenröhrchen gesammelt.

Nach jedem Experiment wurden der integrierte LoaC sowie sämtliche Anschlüsse mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gespült, um Zellrückstände aus dem System zu entfernen.

Jeweils vor und nach den mikrofluidischen Experimenten wurden die Zelldichte und Viabilität der CHO-K1 Zellen durch klassische Trypanblaufärbung bestimmt (siehe Kapitel 3.13.1). Die Glukose- und Laktatkonzentrationen der gesammelten Probenfraktionen wurden enzymatisch mittels YSI 7100 MBS gemessen (siehe Kapitel 3.13.5). Die Separationseffizienz bzw. die Verteilung des Kulturmediums an den drei Ausgängen des Mikrochips wurde prozentual durch die verbleibende Glukosekonzentration in den jeweiligen Proben bestimmt.

3.17.8 Fluoreszenzfärbung von CHO-K1 Zellen

Für fluoreszenzmikroskopische Experimente mit mikrofluidischen Systemen, die innerhalb dieser Arbeit getestet wurden, wurden CHO-K1 Zellen mit Acetoxymethyl-Calcein (Calcein-AM) und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Der Farbstoff Calcein-AM kann die Zellmembran passieren und wird durch zellinterne Esterasen zum fluoreszierenden Calcein umgesetzt. In der Zellkulturtechnik wird Calcein-AM für Zytotoxizitätstests verwendet [257]. Grünfluoreszierende Zellen werden als lebendig gewertet, da ihre zellinternen Esterasen aktiv sind und sie eine intakte Zellmembran aufweisen. Zellen, die hingegen nach gleichzeitiger Inkubation mit PI rot fluoreszieren, werden als tot gewertet. Diese Doppelfärbung ermöglicht einerseits die Visualisierung des Verlaufs der Zellsuspension innerhalb der mikrofluidischen Systeme und andererseits gleichzeitig die Überwachung der Viabilität der eingesetzten Zellen. Hierfür wurden jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL im Vorfeld der Experimente mit $2 \mu\text{M}$ Calcein-AM inkubiert (37°C , 10 min, Inkubatorschüttler bei 300 rpm). Die gefärbten Zellen wurden anschließend zentrifugiert ($500 \times g$, 5 min), einmal mit PBS gewaschen und in frischem Kulturmedium (37°C) resuspendiert. Über eine Spritzenpumpe, die an dem Eingang des Mikrochips (hier: Eingang 1) angeschlossen wurde, wurden die fluoreszierenden CHO-K1 Zellen in den LoaC gepumpt ($300 \mu\text{L}/\text{min}$). Die Visualisierung der Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (siehe Kapitel 3.15.2).

4 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel gliedert sich in drei wesentliche Abschnitte, die den Kern der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit bilden. Zunächst werden die Ergebnisse der makroskopischen Separation von Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen dargestellt und diskutiert. Da die Trennung der mitochondrialen und zytosolischen Kompartimente der Zellen für die Analyse des kompartimentierten Metabolismus essentiell ist, sollten diese Ergebnisse eine grundlegende Basis für den weiteren Forschungsverlauf schaffen. Daran schließen die Ergebnisse und die Diskussion der Integration des mikrofluidischen Mikrochips in einen Bioreaktor an. Hierbei ist das Augenmerk auf die Funktionsfähigkeit des Gesamtsystems und die effiziente Probenahme und Verarbeitung in Hinblick auf metabolische Analysen gerichtet. Der letzte Abschnitt befasst sich mit systembiologischen Untersuchungen der CHO-K1 Zelllinie unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Einerseits werden hier die Ergebnisse von Batch- und kontinuierlichen Kultivierungen von CHO-K1 Mischpopulationen aufgeführt und andererseits erfolgt ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse mit denen Zellzyklus-synchronisierter Zellen.

4.1 Makroskopische Separation von Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen

Die Isolation von Zellorganellen ist ein wichtiger Schritt für die Analyse des kompartimentierten Stoffwechsels tierischer Zellen. Das Ziel dieser Versuchsreihe bestand darin eine möglichst effektive Methode des Aufschlusses von CHO-K1 Zellen zu etablieren, die eine hohe Mitochondrienausbeute erzielt und gleichzeitig so sensitiv ist, dass die Mitochondrien unbeschädigt und mit hoher Integrität isoliert werden können. Weiterhin sollten die makroskopischen Versuche entscheidende Daten und Hinweise für die Entwicklung von geeigneten Zellaufschlusssystemen sowie Separationsmodulen für Mitochondrien auf Mikrochipebene liefern [258]. Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen Zellaufschlussmethoden miteinander verglichen und hinsichtlich ihres Potentials für den Einsatz der Probenverarbeitung für metabolische Analysen diskutiert.

4.1.1 Zellaufschlusseffizienz und Mitochondrienausbeute

Im Zuge dieser Arbeit wurden vier verschiedene Methoden zum Aufschluss von CHO-K1 Zellen getestet. Für den direkten Vergleich wurden diese Methoden hinsichtlich ihrer Zellaufschlusseffizienz, der erzielten Mitochondrienausbeute, der erhaltenen mitochondrialen Integrität sowie des Zeitaufwands bewertet. Die bestmöglichen Werte für die jeweilige Methode wurden hierbei durch Änderung der Anzahl der Anwendungsintervalle bei der Dounce Homogenisation, der Anwendungsdauer der Ultraschallbehandlung, der Digitoninkonzentration und durch Änderung der Anzahl an Elektroporationsschocks ermittelt.

Die Zellaufschlusseffizienz wurde mittels Trypanblaufärbung beobachtet und durch die Messung der freigesetzten LDH-Menge im Zellüberstand quantifiziert. Die Menge isolierter Mitochondrien wurde in Proben nach differentieller Zentrifugation bestimmt. Der Einfluss der jeweiligen Methode auf den Zellaufschluss, die Mitochondrienausbeute und die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran sind in Abbildung 21 dargestellt. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf Versuchsreihen in denen eine Menge von $1 \cdot 10^8$ CHO-K1 Zellen pro Test verwendet wurde.

Wie in Abbildung 21 gezeigt, wurde ein Zellaufschluss durch jede der verwendeten Methoden erzielt. Jedoch konnten hierbei gravierende Unterschiede festgestellt werden. Durch den Einsatz des Dounce Homogenisators wurden 65 % der CHO-K1 Zellen nach 100 Stößen aufgeschlossen, während ein 70 %-iger Zellaufschluss nach insgesamt 200 Stößen beobachtet werden konnte (was in etwa einer Anwendungszeit von 1000 s entsprach). Bereits nach 45 s Ultraschallbehandlung waren 90 % der Zellen aufgeschlossen (Abb. 21B). Ein vollständiger Zellaufschluss konnte mittels Ultraschall nach einer Behandlung von insgesamt 105 s erzielt werden. Eine vermehrte Ausbeute an Mitochondrien stand hier sowohl bei der Ultraschallanwendung als auch beim Zellaufschluss mittels Dounce Homogenisator in Korrelation zur Zellaufschlusseffizienz, was aus der erhöhten Proteinkonzentration nach der Mitochondrienisolation ersichtlich wird (Abb. 21A+B). Eine Proteinmenge im Isolat von $14,9 \pm 0,8$ mg pro $1 \cdot 10^8$ CHO Zellen wurde nach Ultraschallbehandlungen von 45 s bis 60 s gemessen, während maximal $6,8 \pm 1,9$ mg Protein aus $1 \cdot 10^8$ CHO Zellen nach dem Zellaufschluss mittels Dounce Homogenisator isoliert werden konnten. Allerdings ist trotz erhöhtem Zellaufschluss auch eine Abnahme der isolierten Proteinmenge nach Ultraschallbehandlungen von 60 s bis

105 s zu verzeichnen. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass eine verlängerte Ultraschallanwendung zu einer erhöhten Zerstörung der Organellen in kleinere Fragmente führt. Diese Fragmente verbleiben wegen ihrer niedrigeren Dichte im Probenüberstand nach dem letzten Separationsschritt der differentiellen Zentrifugation und werden aus diesem Grund verworfen. Ein vollständiger Zellaufschluss (99-100 %) wurde nach drei Elektroporationsschocks (Abb. 21D) und nach einer Digitonin-Inkubation bereits ab einer Konzentration von 0,01 % (w/v) beobachtet (Abb. 21C). Allerdings konnten bei diesen beiden Methoden nur sehr geringe Mitochondrienausbeuten erzielt werden.

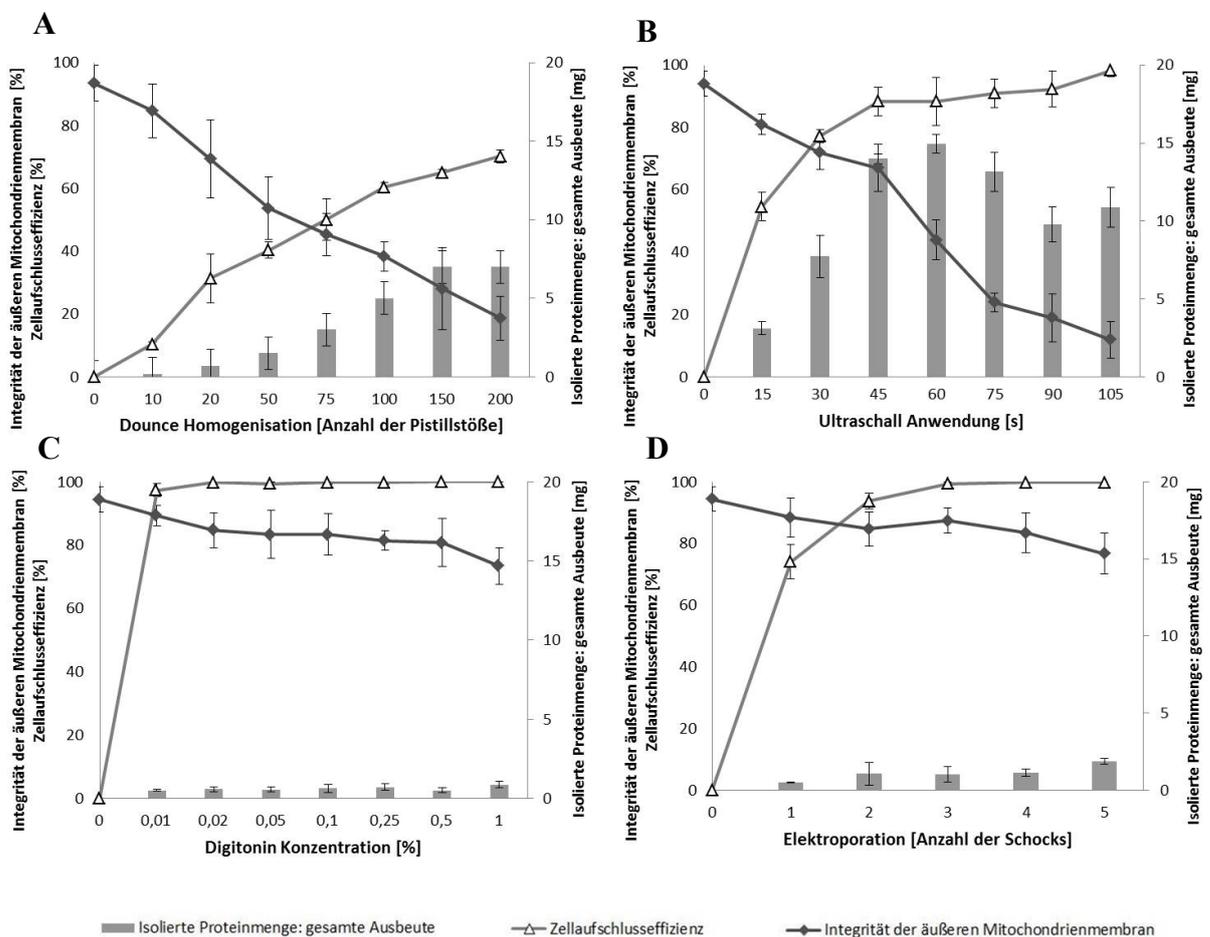


Abb. 21: Einfluss der Zellaufschlussmethoden in Hinblick auf die Zellaufschlusseffizienz, die Integrität der äußeren Mitochondrienmembranen und die Gesamtausbeute an isoliertem Protein bezogen auf $1 \cdot 10^8$ CHO-K1 Zellen.

Zellaufschluss (A) mittels Dounce Homogenisator, (B) mittels Ultraschallstab, (C) mittels Digitonin Permeabilisierung, (D) mittels Elektroporation; Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Messwerte bei Dreifachbestimmung (biologische Replikate).

Eine maximale Proteinmenge im Isolat von $0,8 \pm 0,2$ mg wurde nach Digitonin-Behandlungen gemessen und ein Maximum von $1,9 \pm 0,2$ mg je $1 \cdot 10^8$ CHO Zellen wurde nach der Elektroporation der Zellen detektiert. Diese Ausbeuten sind um 72-86 % geringer im Vergleich zur maximalen Proteinmenge, die in den Isolaten nach der Dounce-Homogenisation gemessen wurde, und sogar 87-95 % niedriger verglichen mit der Ultraschallmethode. Hierbei muss beachtet werden, dass das für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Isolaten verwendete Bradford-Reagenz unspezifisch mit allen in der Probe enthaltenen Proteinen reagiert, weshalb die Angabe der mitochondrialen Proteinkonzentration keine Absolutwerte darstellt. Mögliche Verunreinigungen der Proben durch andere Proteine oder Zellfragmente können bei dieser Messmethode zu Ungenauigkeiten führen. Darüber hinaus gibt diese Methode keinen Aufschluss über die Anzahl an isolierten Mitochondrien. Derzeit existiert noch keine etablierte Methode um die Menge der isolierten Mitochondrien spezifisch zu bestimmen. Aus diesem Grund wurden Proben isolierter Mitochondrien in einem weiteren Experiment mittels spezifischer Antikörper fluoreszenzmarkiert und durch ein Konfokalmikroskop visualisiert (siehe Abb. 24). Durch die Visualisierung der Mitochondrien sollten neben der morphologischen Betrachtung auch Rückschlüsse über die Anzahl der isolierten Mitochondrien durch Zählungen (ähnlich der bakteriellen Zellzählung) gewonnen werden (siehe Kapitel 4.1.2).

Mitochondrienausbeute bezogen auf die freigesetzte Gesamtproteinmenge

Um eine Relation der isolierten Proteinmenge zu der totalen Proteinmenge zu erhalten, die während eines vollständigen Zellaufschlusses freigesetzt wurde, wurde die Proteinkonzentration zusätzlich in den Überständen homogenisierter Zellen (200 s Ultraschallbehandlung) bestimmt. Nach Abtrennung der Zelltrümmer (2000 x g, 5 min) wurde eine Proteinkonzentration von $23,9 \pm 1,7$ mg/mL bestimmt. Bei einem eingesetzten Volumen von 5 mL ergibt sich eine Gesamtproteinmenge von etwa 119,5 mg, die aus 10^8 Zellen freigesetzt wurde. Bezogen auf diese Gesamtmenge ergeben sich für die daraus isolierten mitochondrialen Proteine im Durchschnitt folgende Ausbeuten:

Dounce:	4,1 – 7,3 %
Ultraschall:	11,8 – 13,1 %
Digitonin:	0,5 – 0,8 %
Elektroporation:	1,4 – 1,7 %

Trypanblaufärbung zur Visualisierung der Zellaufschlusseffizienz

Neben der Bestimmung der LDH-Aktivität, wurden die Integrität der Zellmembran sowie die Zelldichte vor und nach jedem Zellaufschlussschritt mittels Trypanblaufärbung unter einem Lichtmikroskop verfolgt. Repräsentative Bildaufnahmen von der Zellsuspension vor dem Zellaufschluss und den behandelten Proben sind in Abbildung 22 dargestellt.

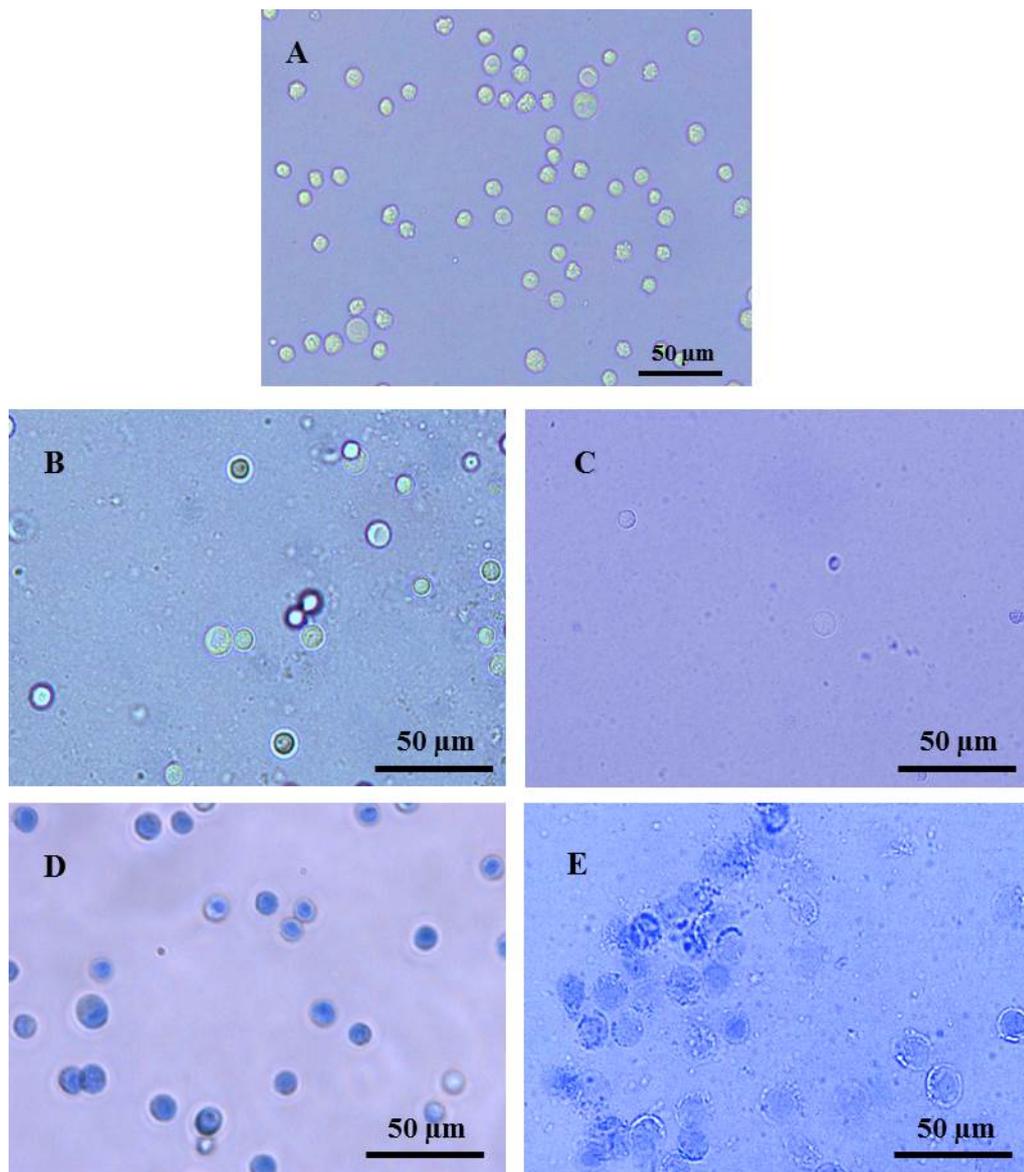


Abb. 22: Einfluss der Zellaufschlussmethode in Hinblick auf die Zellmorphologie.

Die Bilder zeigen CHO-K1 Zellen nach Trypanblaufärbung (A) vor einem Zellaufschluss als Referenz, (B) nach Zellaufschluss mittels Dounce Homogenisator (100 Pistillstöße), (C) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallstab (45 s), (D) nach Digitonin-Inkubation (0,01% (w/v)), (E) nach Elektroporation (3 Schocks).

In Proben, die mit Digitonin oder Elektroporation behandelt wurden, blieb die totale Zelldichte auch nach den Behandlungen konstant, wobei jedoch 99-100 % der Zellen durch Trypanblau angefärbt wurden (Abb. 22D+E). Diese Beobachtung zeigt, dass zwar alle Zellen durch die Behandlungen permeabilisiert wurden, jedoch von ihrer Zellmembran umschlossen bleiben. Allerdings unterscheiden sich die Zellen morphologisch und in der Intensität der Trypanblaufärbung voneinander. Nach der Digitonin-Permeabilisierung sind die CHO Zellen stark blau gefärbt und bilden durch ihre Zellmembran eine klare Grenze zum extrazellulären Medium (Abb. 22D). Nach der Elektroporation nehmen die CHO Zellen zwar ebenfalls den Trypanblaufarbstoff auf, erscheinen in ihrer Intensität jedoch deutlich blasser verglichen mit den durch Digitonin permeabilisierten Zellen. Die Zellen lassen sich noch von ihrem extrazellulären Medium unterscheiden, jedoch ist die Abgrenzung durch die Zellmembran deutlich schwächer als nach der Digitonin-Behandlung, was auf einen höheren Permeabilisierungsgrad der Zellen nach Elektroporation zurückzuführen ist (Abb. 22E). Im Vergleich zur Behandlung durch Digitonin und Elektroporation konnten in Proben, die durch Dounce Homogenisation aufgeschlossen wurden, nur vereinzelt erhaltene Zellen (zwischen 35-40 % der ursprünglichen Zelldichte nach 100 Pistillstöße) beobachtet werden (Abb. 22B), während nach 60 s Ultraschallbehandlung 95 % der Zellen komplett aufgeschlossen waren (Abb. 22C). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein vollständiger Zellaufschluss für eine effiziente Freisetzung der Mitochondrien nur durch Dounce Homogenisation oder Ultraschallbehandlung erzielt werden kann. Werden die Zellmembranen hingegen nur permeabilisiert, können die Mitochondrien nicht aus den Zellen austreten.

Um diese Aussage zu bestätigen, wurden die Mitochondrien innerhalb der homogenisierten Proben direkt nach jeder Aufschlussmethode durch spezifische Antikörpermarkierung visualisiert. Das Protokoll zur Antikörperfärbung ist in Kapitel 3.14.5 beschrieben. Durch die vergleichsweise niedrige Zentrifugationsgeschwindigkeit von 2000 x g wurden hierbei nur komplette Zellen oder größere Fragmente aus den behandelten Proben einbezogen, während kleiner Zellkomponenten (z.B. freigesetzte Mitochondrien) verworfen wurden. Die markierten Proben wurden durch ein Konfokalmikroskop visualisiert. Die resultierenden Aufnahmen sind in Abbildung 23 dargestellt.

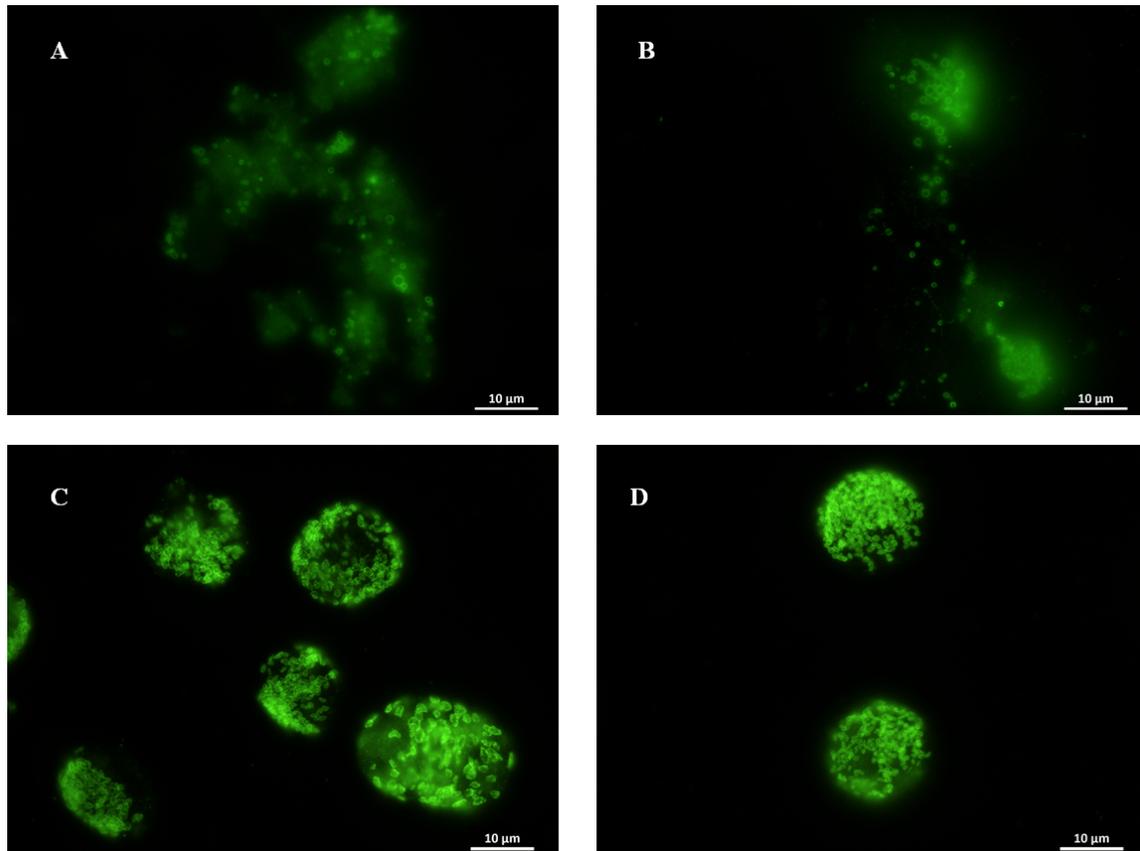


Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CHO-K1 Zellen bzw. dem Zellhomogenat nach erfolgreichem Zellaufschluss.

Die Mitochondrien wurden im Zellhomogenat durch spezifische Antikörperfärbung visualisiert (primär: anti-Tom20 und sekundär: AlexaFluor 488 Goat-anti-Rabbit-IgG); 100-fache Vergrößerung; **(A)** nach Dounce Homogenisation (100 Pistillstöße), **(B)** nach Ultraschallaufschluss (45 s), **(C)** nach Digitonin Permeabilisierung (0,01 %), **(D)** nach Elektroporation (3 Schocks).

Nach dem Zellaufschluss mittels Dounce Homogenisator oder Ultraschallstab konnten nur wenige Mitochondrien gefunden werden, die noch an das Zytoskelett gebunden oder innerhalb einer verbliebenen Zelle lokalisiert waren (Abb. 23A+B). Im Gegensatz dazu liefern die Aufnahmen in den Abbildungen 23C und 23D einen deutlichen Beweis für grün fluoreszierende Mitochondrien, die nach der Behandlung durch Digitonin bzw. Elektroporation im Inneren der Zellen verblieben sind. In beiden Fällen ist die Zellform aufgrund der Verteilung der fluoreszierenden Mitochondrien gut erkennbar.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Zellmembranen durch den Einsatz von Digitonin oder Elektroporation effektiv permeabilisiert wurden und so den Ein- oder Austritt von Enzymen (LDH), Farbstoffen (Trypanblau) oder Antikörpern (anti-Tom20) ermöglicht

wird. Die hierbei entstandenen Löcher in der Zellmembran sind allerdings nicht groß genug, um auch eine effiziente Freisetzung und Isolation von Mitochondrien und anderen großen Organellen zu erzielen. Während die löslichen, zytosolischen Komponenten die permeabilisierten Membranen passieren, bleiben zelluläre Strukturen wie das Zytoskelett durch die Behandlung mit Digitonin oder Elektroporation intakt. Die verbleibenden Zellstrukturen, die bei derartiger Permeabilisierung entstehen, werden als „Cell Ghosts“ bezeichnet [259, 260].

4.1.2 Integrität und Morphologie der Mitochondrien

Der Einfluss der jeweiligen Zellaufschlussmethode auf die Integrität der freigesetzten Mitochondrien wurde in dieser Arbeit durch Messungen der Citratsynthase- und der Cytochrom c Oxidase Aktivitäten untersucht. Hierbei wurde die Integrität der Mitochondrien direkt nach dem Zellaufschluss nach dem ersten Zentrifugationsschritt (2000 x g, 5 min) im Überstand des Zellhomogenats gemessen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Integritäten der äußeren Mitochondrienmembranen (Cytochrom c Oxidase Aktivität) in den Diagrammen in Abbildung 21 dargestellt. Gemäß dieser Diagramme kann eine Abnahme der Integrität der Mitochondrien in Abhängigkeit von einer Erhöhung der Anwendungszyklen oder der Konzentration für jede getestete Methode beobachtet werden. Hierbei sind jedoch deutliche Unterschiede beim Vergleich der Methoden zu erkennen. Während die Integrität nach der Zellpermeabilisierung durch Digitonin oder Elektroporation nur um durchschnittlich maximal 10 bis 15 % des anfänglich gemessenen Wertes abnimmt, kann ein Verlust der Integrität von durchschnittlich 70 bis 80 % nach dem Zellaufschluss durch Dounce oder Ultraschall Homogenisation bei erhöhten Anwendungsintervallen gemessen werden. Durch die Anwendung des Dounce Homogenisators sinkt die Integrität der freigesetzten Mitochondrien bereits nach 50 Stößen auf 60 % und liegt nach weiteren 50 Stößen nur noch bei 45 %. Nach 200 Stößen sind nur noch 22 % der äußeren Mitochondrienmembranen intakt. Bei dem Zellaufschluss mittels Ultraschall sinkt die Integrität nach einer gesamten Anwendungsdauer von 45 s auf 70 % ab, während nach 105 s nur noch 17 % der isolierten Mitochondrien eine intakte äußere Membran aufweisen. Eine Übersicht der Daten sowie die gemessenen Integritäten der äußeren und inneren Mitochondrienmembranen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Zusammenfassung der Messdaten zum Vergleich der verwendeten Zellaufschlussmethoden.Die Werte beziehen sich jeweils auf $1 \cdot 10^8$ CHO-K1 Zellen, resuspendiert in 5 mL MIP.

Zellaufschlussmethode	Variation der Aufschlussmethode	Zellaufschluss-effizienz [%]	Gesamte Proteinausbeute (isoliert) [mg] (erhalten aus $1 \cdot 10^8$ CHO-K1 Zellen)	Integrität der äußeren Mitochondrienmembran [%] (Cyt c Assay)	Integrität der inneren Mitochondrienmembran [%] (CS Assay)
Gemessen im Überstand nach 2000 x g					
Unbehandelte CHO-K1 Suspension	-	0	0	98.2 ± 0.5	98.5 ± 0.7
Dounce Homogenisator	10 Stöße	9.5 ± 0.7	0.2 ± 0.9	81.0 ± 5.7	96.2 ± 2.4
Teflon-Pistill/Glaskolben	20 Stöße	21.3 ± 7.7	0.7 ± 0.5	72.3 ± 8.5	89.6 ± 1.2
Sartorius Mechatronics	50 Stöße	38.1 ± 2.5	1.5 ± 0.4	67.3 ± 12.5	85.1 ± 3.7
Handbetrieben	75 Stöße	43.9 ± 6.5	3.4 ± 0.6	44.8 ± 6.8	78.9 ± 4.2
	100 Stöße	62.0 ± 1.5	5.2 ± 0.9	24.4 ± 4.7	74.1 ± 5.3
	150 Stöße	65.1 ± 1.0	7.0 ± 1.2	19.2 ± 13.1	65.3 ± 4.9
	200 Stöße	70.5 ± 2.1	7.1 ± 0.8	12.1 ± 7.0	59.3 ± 3.8
Ultraschall	15 s	54.7 ± 4.5	$3,1 \pm 4.4$	81.0 ± 3.2	97.3 ± 0.3
Ultraschallstab: Sonifier Cell	30 s	77.3 ± 2.1	$7,7 \pm 1.3$	72.3 ± 5.5	96.1 ± 1.8
Disruptor Bar (\varnothing 3 mm), Branson	45 s	88.3 ± 4.4	$14,0 \pm 0.3$	67.3 ± 7.5	94.0 ± 3.3
20 kHz Pulsfrequenz	60 s	88.6 ± 7.6	$14,9 \pm 0.8$	44.8 ± 6.4	89.5 ± 2.9
10 % Frequenzzyklus (\cong 1 Puls \cdot s ⁻¹)	75 s	91.0 ± 3.5	$13,2 \pm 1.2$	24.4 ± 3.0	71.0 ± 4.8
Output control 1 (\cong minimale Amplitude (116 μ m) der Ultraschall-Vibrationen)	90 s	92.3 ± 5.6	$9,8 \pm 1.1$	19.2 ± 7.5	58.8 ± 3.3
	105 s	98.3 ± 2.1	$10,9 \pm 1.2$	12.1 ± 5.8	61.3 ± 5.2
Digitonin Permeabilisierung	0.01% (w/v)	97.3 ± 1.9	0.51 ± 0.04	94.3 ± 4.1	96.9 ± 1.2
Sigma Aldrich	0.02% (w/v)	99.6 ± 0.6	0.56 ± 0.13	89.3 ± 3.2	96.1 ± 0.7
Stammllösung in PBS	0.05% (w/v)	99.3 ± 0.5	0.55 ± 0.14	84.6 ± 5.5	91.3 ± 3.7
Zellinkubation für 10 s	0.1% (w/v)	99.8 ± 0.2	0.62 ± 0.27	83.3 ± 7.5	90.0 ± 4.4
	0.25% (w/v)	99.6 ± 0.5	0.72 ± 0.21	83.2 ± 6.4	93.7 ± 4.9
	0.5% (w/v)	100	0.49 ± 0.15	81.4 ± 3.0	89.5 ± 5.1
	1.0% (w/v)	100	0.87 ± 0.19	73.3 ± 5.9	84.4 ± 5.9
Elektroporation	1 Schock	74.3 ± 5.5	0.51 ± 0.04	94.3 ± 4.0	91.1 ± 6.8
Gene Pulser II, Bio-Rad	2 Schocks	93.6 ± 2.5	1.07 ± 0.74	88.3 ± 6.4	94.3 ± 1.9
Electroporations-Küvetten: Gene Pulser Cuvettes (0.4 cm) Bio-Rad	3 Schocks	99.3 ± 0.6	1.05 ± 0.49	84.6 ± 5.5	95.2 ± 1.5
800 Ohm, 0.7 kV, 50 μ F.	4 Schocks	99.7 ± 0.5	1.15 ± 0.22	87.3 ± 4.1	89.6 ± 2.2
	5 Schocks	99.6 ± 0.4	1.90 ± 0.18	83.3 ± 6.4	88.3 ± 4.7

Im Vergleich der Integritäten von äußeren und inneren Mitochondrienmembranen zeigen sich für alle Methoden bei gleichen experimentellen Bedingungen durchgehend geringere Werte für die äußere Membran als für die innere. Nach dem Zellaufschluss mittels Dounce Homogenisator ist die Integrität der inneren Membranen um 15 bis 37 % höher als die der äußeren Membranen. Nach den Ultraschallbehandlungen unterscheiden sich die Integritäten um rund 10 bis 42 %. Die gemessenen Integritäten nach der Digitonin-Permeabilisierung oder Elektroporation weisen vergleichbare Werte auf. Für beide Methoden ist die innere Membranintegrität um 4 bis 12 % höher als die äußere. Diese Ergebnisse lassen sich darauf zurückführen, dass die äußere Mitochondrienmembran der inneren Membran Schutz bietet und diese erst dann beeinträchtigt wird, wenn die äußere Membran bereits beschädigt ist.

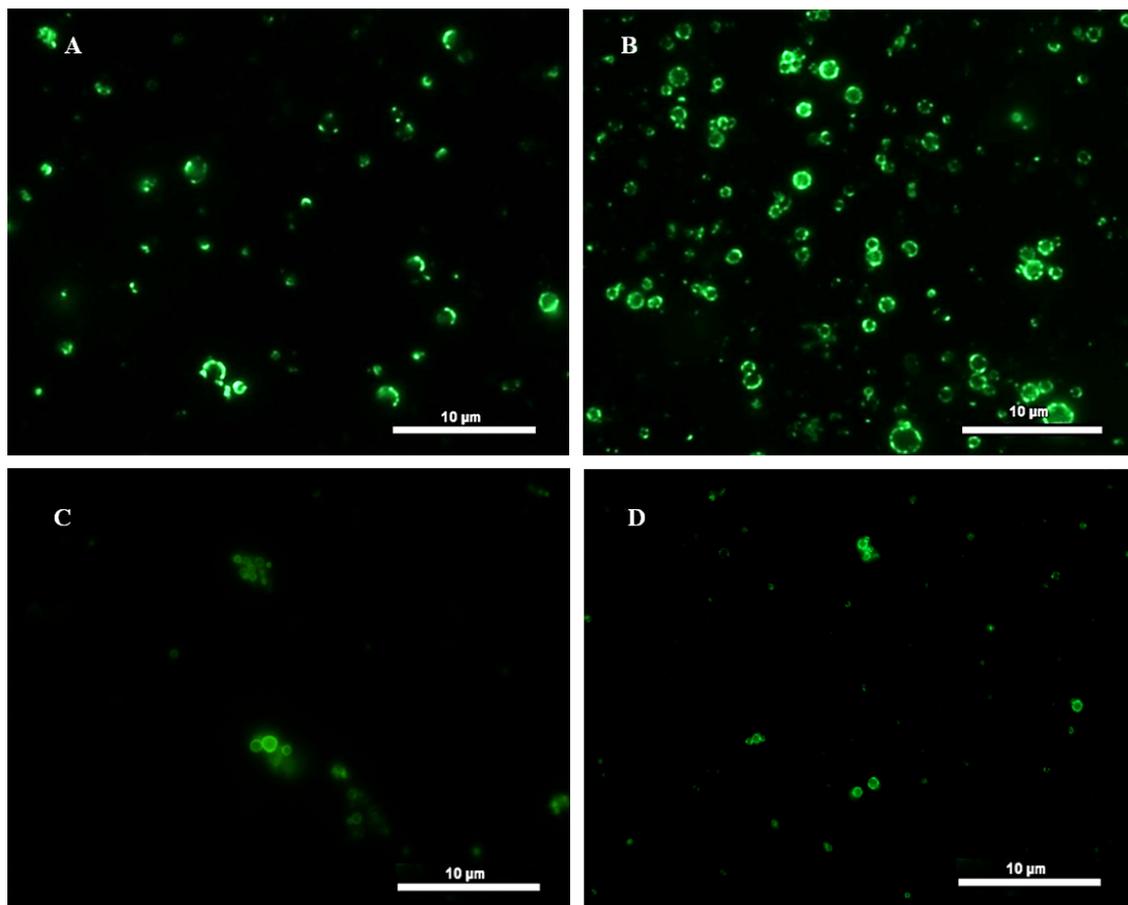


Abb. 24: Fluoreszenzaufnahmen isolierter Mitochondrien nach differentieller Zentrifugation.

Die Mitochondrien wurden im Zellhomogenat durch spezifische Antikörperfärbung visualisiert (primär: anti-Tom20 und sekundär: AlexaFluor 488 Goat-anti-Rabbit-IgG); 100-fache Vergrößerung; (A) nach Dounce Homogenisation (100 Pistillstöße), (B) nach Ultraschallaufschluss (45 s), (C) nach Digitonin Permeabilisierung (0,01 %), (D) nach Elektroporation (3 Schocks).

Neben den enzymatischen Methoden sollten ebenfalls durch Visualisierung der Mitochondrien mittels Konfokalmikroskopie Rückschlüsse auf die Konstitution und Ausbeute der isolierten Mitochondrien gewonnen werden. Hierfür wurden nach erfolgtem Zellaufschluss und anschließender differentieller Zentrifugation Proben isolierter Mitochondrien durch spezifische Antikörperfärbung (siehe Kapitel 3.14.5) fluoreszenzmarkiert und danach bei 100-facher Vergrößerung konfokalmikroskopisch visualisiert. Aufnahmen isolierter, fluoreszenzmarkierter Mitochondrien sind in Abbildung 24 dargestellt.

Unabhängig von der verwendeten Zellaufschlussmethode besitzen die isolierten Mitochondrien eine kreisrunde Form, wie beim Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 24 zu erkennen ist. Außerdem sind in jeder Mitochondrienprobe neben den runden Formen auch Fragmente von Mitochondrien enthalten. Allerdings lassen die Aufnahmen auch deutliche Unterschiede im Vergleich der Zellaufschlussmethoden erkennen. Wie bereits durch die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Isolaten gezeigt wurde, lässt sich auch hier die höchste Mitochondriendichte in den Isolaten beobachten, die nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall (45 s) gewonnen wurden (Abb. 24B). Eine sehr niedrige Mitochondriendichte wurde in den Proben detektiert, die nach Digitonin-Permeabilisierung oder Elektroporation isoliert wurden (Abb. 24C+D). Hierbei konnte in den Isolaten beider Zellaufschlussmethoden ein durchschnittlicher Durchmesser der Mitochondrien von 0,5 bis 0,8 μm gemessen werden. Im Vergleich dazu wurden in den Proben, die mittels Dounce Homogenisation oder Ultraschall aufgeschlossen wurden, Mitochondrien mit einem Durchmesser von 0,5 bis zu 2,5 μm detektiert.

Eine Abschätzung der Mitochondriendichte wurde durch die Verwendung einer Neubauerzählkammer (für Bakterien) durchgeführt. Hierfür wurde der Zählbereich (Kleinstquadrat, 50 x 50 μm) der Kammer bei 100-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch aufgenommen und mit dem entsprechenden Bereich der Fluoreszenzaufnahmen der isolierten Mitochondrien überlagert. Die Mitochondrienzählung konnte hierdurch entsprechend einer Bakterienzählung erfolgen. Dabei wurden nur kreis- bis halbrunde Strukturen als Mitochondrium gewertet, während kleinere Fragmente nicht mitgezählt wurden. Auf diese Weise wurden folgende Mitochondrienkonzentrationen in den vier verschiedenen Proben bestimmt:

Dounce:	$9,8 \cdot 10^8$ Mitochondrien/mL (entspricht $19,6 \cdot 10^7$ Mitochondrien aus 10^8 Zellen)
Ultraschall:	$19,2 \cdot 10^8$ Mitochondrien/mL (entspricht $38,4 \cdot 10^7$ Mitochondrien aus 10^8 Zellen)
Digitonin:	$0,86 \cdot 10^8$ Mitochondrien/mL (entspricht $1,73 \cdot 10^7$ Mitochondrien aus 10^8 Zellen)
Elektroporation:	$1,82 \cdot 10^8$ Mitochondrien/mL (entspricht $3,65 \cdot 10^7$ Mitochondrien aus 10^8 Zellen)

Nach dem Zellaufschluss durch Dounce oder Ultraschall Homogenisation konnten in den Homogenaten vorwiegend Zellfragmente und nur wenige verbliebene intakte Zellen beobachtet werden (abhängig von der Aufschlusseffizienz der jeweiligen Methode). Im Gegensatz dazu enthielten Proben, die mit Digitonin oder Elektroporation behandelt wurden, fast ausschließlich „Cell Ghosts“. Dabei handelt es sich um permeabilisierte Zellen, die noch von ihrer Zellmembran umgeben sind und die Zellorganellen umschließen. Durch diese Beobachtung lässt sich die geringe Mitochondrienausbeute erklären, die nach dem Zellaufschluss mittels Digitonin oder Elektroporation erzielt wurde. Bei beiden dieser Methoden sind die Mitochondrien noch an das Zytoskelett gebunden und dadurch nicht in der Lage die permeabilisierte Zellmembran zu passieren (vgl. Abb. 23).

4.1.3 Evaluierung der Zellaufschlussmethoden für die Mitochondrienisolation

Für metabolische oder proteomische Analysen wird eine hohe Gesamtmenge an intakten Mitochondrien benötigt, um einerseits separate Analysen der mitochondrialen und zytosolischen Kompartimente zu ermöglichen und um andererseits hierbei nicht an analytische Detektionsgrenzen zu stoßen. Aus diesen Gründen sollte die Methode, die für die Isolation der Mitochondrien verwendet wird, eine hohe Zellaufschlusseffizienz und gleichzeitig eine gute Ausbeute intakter Mitochondrien liefern. Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen wurden nach entsprechenden Vorversuchen und basierend auf den in Abbildung 21 präsentierten Daten die besten Parameter für die jeweilige verwendete Methode ermittelt. Das experimentelle Setup und die festgelegten Parameter sind für jede der hier verwendeten Methoden unter Kapitel 3.14.1 zusammengefasst.

Die besten Resultate konnten bei folgenden Anwendungen erzielt werden:

- Dounce Homogenisation mit 100 Pistillstößen
- Ultraschallaufschluss für 45 s
- Digitonin Permeabilisierung bei einer Konzentration von 0,01 % (w/v)
- Elektroporation durch 3 aufeinander folgende Schocks

Die unter den hier ermittelten Konditionen erhaltenen Ergebnisse sind im direkten Vergleich für jede Methode unter Abbildung 25 zusammengefasst. Diese Ergebnisse verdeutlichen den Vorteil des Zellaufschlusses mittels Ultraschall im Vergleich zur Dounce Homogenisation.

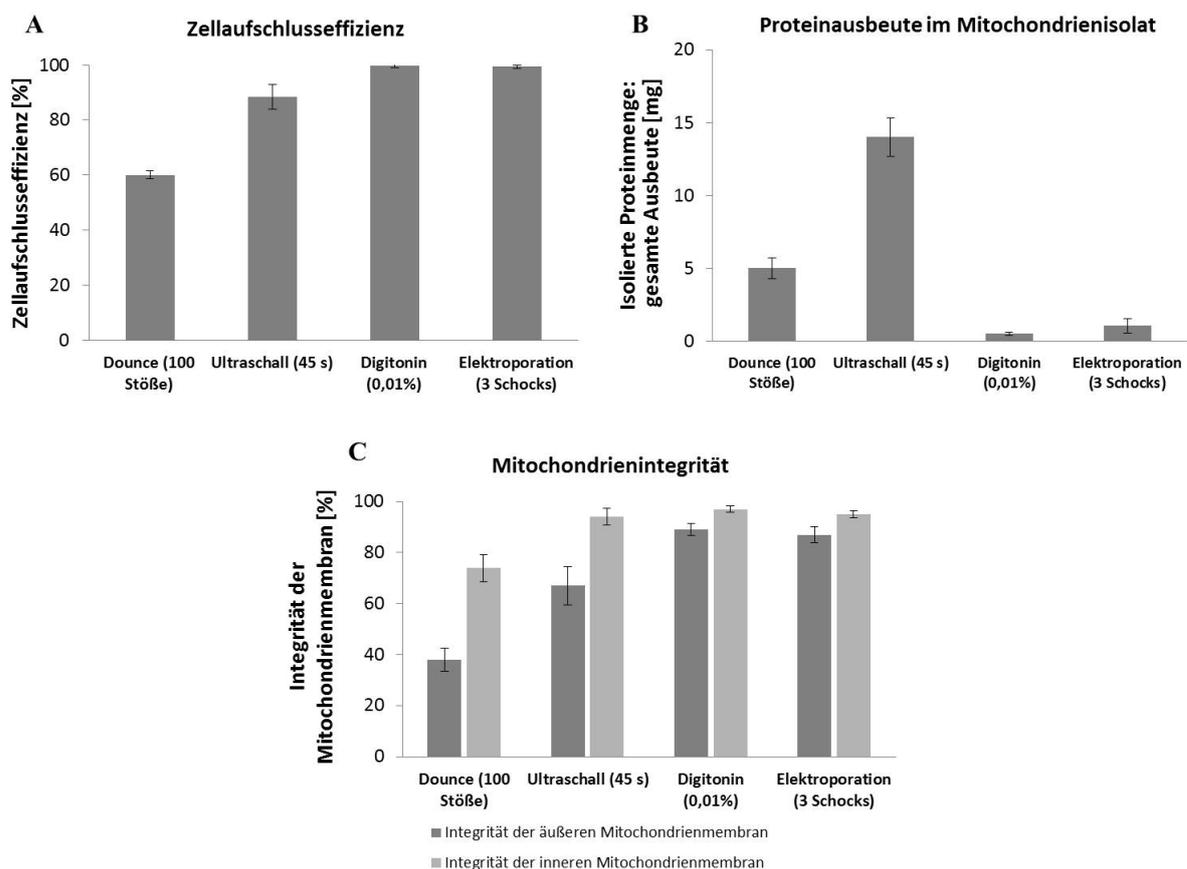


Abb. 25: Messergebnisse unter den besten Konditionen der verwendeten Zellaufschlussmethoden im direkten Vergleich.

Ergebnisse bezogen auf $1 \cdot 10^8$ CHO-K1 Zellen. (A) Zellaufschlusseffizienz in Abhängigkeit der Aufschlussmethode, (B) Proteinausbeute im Mitochondrienisolat nach Zellaufschluss, (C) Mitochondrienintegrität in Abhängigkeit der Aufschlussmethode. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Messwerte bei Dreifachbestimmung.

Die Ultraschallmethode ist dem Aufschluss mittels Dounce Homogenisator hinsichtlich der Zellaufschlusseffizienz, der Gesamtmenge an isoliertem mitochondrialen Protein sowie der erhaltenen Integrität der isolierten Mitochondrien überlegen. Im Gegensatz zum Zellaufschluss mittels Dounce Homogenisator oder Ultraschall besitzen die Mitochondrien, die durch Digitonin- oder Elektroporationsbehandlungen freigesetzt wurden, die höchsten Membranintegritäten. Betrachtet man jedoch die geringen Mengen an Mitochondrien, die durch die Permeabilisierung mittels Digitonin oder Elektroporation isoliert werden konnten (maximal $0,8 - 1,9 \pm 0,2$ mg aus insgesamt $1 \cdot 10^8$ verwendeten CHO-K1 Zellen), zeigt sich, dass diese beiden Methoden nicht für die Isolation dieser Organellen aus CHO-K1 Zellen in großem Umfang geeignet sind.

Die Dounce Homogenisation gilt als die Methode der Wahl für die Organellenisolation aus tierischen Zellen [187, 188]. Im direkten Vergleich der Zellaufschlusseffizienz, der erzielten Ausbeute an isolierten Mitochondrien sowie der erhaltenen Integrität der Mitochondrien erweist sich jedoch die hier verwendete Ultraschallmethode einer Dounce Homogenisation für die Isolation von Mitochondrien aus CHO Zellen als deutlich überlegen. Der Vorteil von Ultraschall gegenüber der Dounce Homogenisation hinsichtlich der Mitochondrienausbeute und Reinheit wurde ebenfalls von Chaiyarit et al. [197] beschrieben. Allerdings konnte diese Studie keinen Aufschluss über die Integrität der isolierten Mitochondrien geben. Die Integrität der Mitochondrienmembranen ist jedoch von signifikanter Bedeutung, da diese für den Verbleib von Proteinen oder Metaboliten innerhalb der mitochondrialen Matrix und damit für weitere kompartimentierte Analysen entscheidend ist. Darüber hinaus wurden in der von Chaiyarit et al. beschriebenen Methode für den Zellaufschluss deutlich höhere Pulsationsrate (50 Zyklen) eingesetzt und zusätzlich höhere Zentrifugationsgeschwindigkeiten ($20.000 \times g$) für die Separation der Organellen verwendet. Beide Aspekte könnten einen gravierenden Einfluss auf die Membranintegritäten und die Reinheit der isolierten Mitochondrienfraktionen haben. Ferner bezieht sich die Studie von Chaiyarit et al. auf Experimente mit einer adhären ten tierischen Zelllinie (MDCK), während sich die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit auf CHO Suspensionszellen beziehen. Der Einfluss einer jeden Zellaufschlussmethode ist vom Zelltyp abhängig und muss in dieser Hinsicht stets geprüft werden.

4.1.4 Zusammenfassende Diskussion

Das Ziel dieser Versuchsreihe war die Bestimmung und Weiterentwicklung einer schnellen und sensitiven Zellaufschlussmethode für eine etablierte industrielle Produktionszelllinie. Durch Einsatz dieser Methode sollte eine mitochondriale Fraktion isoliert werden, in welcher die Integrität dieser Organellen erhalten ist. Darüber hinaus sollte die jeweilige Methode hohe, quantifizierbare Ausbeuten für proteomische oder metabolomische Analysen liefern. Für diesen Zweck wurden vier verschiedene Zellaufschlussmethoden für die Isolation intakter Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen getestet und miteinander verglichen. Ein vollständiger Zellaufschluss, der eine Freisetzung der Mitochondrien bewirkt, wurde nur durch die Verwendung eines Dounce Homogenisators oder mittels Ultraschall erzielt. In vorherigen Publikationen wurde der Zellaufschluss mittels Dounce Homogenisatoren als die Methode der Wahl für die Isolation von Mitochondrien aus tierischen Zellen beschrieben [187, 188]. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch der Einsatz von Ultraschall in Hinblick auf die Zellaufschlusseffizienz, die Mitochondrienausbeute und die Integrität der erhaltenen Mitochondrien, dem Aufschluss mittels Dounce Homogenisator als deutlich überlegen. Die höchste Permeabilisierungseffizienz und Mitochondrienintegrität wurde hier für Behandlungen mit Digitonin oder Elektroporation erzielt, wobei jedoch verglichen mit der Verwendung von Ultraschall nur wenige und deutlich kleinere Mitochondrien mit diesen Aufschlussmethoden tatsächlich aus den CHO Zellen isoliert werden konnten. Die permeabilisierten Zellen und die enthaltenen Mitochondrien blieben von der Zellmembran weiterhin umschlossen und behielten ihre runde Form, während das Zytoplasma aus den Zellen austreten konnte. Mit dem Ziel eine schnelle Zellpermeabilisierung und eine anschließende Trennung des Zytosols von den „Cell Ghosts“ und den in diesen enthaltenen intakten Mitochondrien zu ermöglichen, könnte diese Eigenschaft für eine Anwendung im kleinen Maßstab (Lab-on-a-Chip) genutzt werden [189, 208, 252].

Durch den Einsatz von Ultraschall konnte eine große Menge morphologisch intakter Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen isoliert werden. Zudem ließ sich diese Methode vergleichsweise schnell ausführen. Aufgrund der rasch ablaufenden metabolischen Reaktionen innerhalb der Zellen muss jedoch im Weiteren überprüft werden, ob die Enzymaktivitäten während des Isolationsprozesses effektiv durch die kontinuierliche Kühlung (0 bis 4°C) verlangsamt werden können. Dennoch erzielt die Anwendung von

45 s Ultraschall einen effizienten Zellaufschluss (etwa 90 %) und liefert gleichzeitig eine hohe Ausbeute an isolierten Mitochondrien ($14,0 \pm 0,3$ mg bezogen auf $1 \cdot 10^8$ CHO Zellen). Zudem zeigen die im Zuge dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, dass die morphologische Integrität nach der Ultraschallbehandlung zu 67 % für die äußeren Mitochondrienmembranen und zu 94 % für die inneren Membranen erhalten bleibt. Diese Werte sind deutlich besser als diejenigen, die mit der Standardmethode durch Dounce Homogenisation erhalten wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von Ultraschall hier die Methode der Wahl für den Aufschluss von CHO Zellen ist, um Mitochondrien in großem Maßstab für anschließende Analysen zu isolieren.

Die erhaltenen Ergebnisse liefern allerdings auch einen Hinweis darauf, dass durch physikalische Methoden während des Zellaufschlusses stets auch die Konstitution der Mitochondrien, wenn auch zum Teil nur in geringem Maße, durch die wirkenden Kräfte beeinträchtigt werden kann. Für metabolische Analysen innerhalb der Zellkompartimente ist jedoch eine exakte Trennung dieser Kompartimente und besonders der in ihnen enthaltenen Metaboliten entscheidend. Eine Fragmentierung oder der Aufschluss der Mitochondrien während des Separationsprozesses würde zu einer Verfälschung der Metabolitenpools und somit der späteren Messergebnisse führen. Als eine sensitive Methode für den selektiven Aufschluss der CHO-K1 Zellen und den gleichzeitigen Erhalt der mitochondrialen Integrität erwies sich hier der Einsatz von Digitonin. Allerdings ermöglicht diese Methode nicht die Isolation der Mitochondrien, da diese nach der Permeabilisierung gebunden an das Zytoskelett innerhalb der entstandenen Cell Ghosts verbleiben. Das Zytosol der Zellen kann hingegen durch die permeabilisierte Zellmembran diffundieren, so dass auf diese Weise dennoch eine Trennung des zytosolischen vom mitochondrialen Kompartiment erzielt werden kann.

4.2 Mikrofluidische Systemintegration für metabolische Untersuchungen

Aufgrund der schnell ablaufenden metabolischen Reaktionen in tierischen Zellen, ist eine schnelle Probenahme und Probenverarbeitung eine Grundvoraussetzung für die Untersuchung des Stoffwechsels unter *in-vivo* Bedingungen. Herkömmliche Methoden im Labormaßstab können diesen Anforderungen kaum gerecht werden. Der Bereich der Mikrofluidik zeigt hingegen großes Potential dafür, innerhalb von Millisekunden bis Sekunden zellbiologische Experimente ermöglichen zu können.

Auf Grundlage der in 4.1 erhaltenen Ergebnisse wurde innerhalb des Forschungsprojekts SysCompart ein mikrofluidisches System entwickelt, das einerseits die Permeabilisierung der Zellen und das Abstoppen metabolischer Reaktionen bewirken und andererseits eine Trennung der permeabilisierten Zellen von ihrem Medium und dem zytosolischen Kompartiment ermöglichen soll. Gleichzeitig bestand der Anspruch, dass ein derartiges System für dynamische Untersuchungen (Pulseexperimente) des Metabolismus genutzt werden kann. Um all diese Bedingungen im Mikromaßstab simultan erfüllen zu können, müssen mehrere funktionale Einheiten miteinander kombiniert werden. Hierfür wurden zunächst einzelne mikrofluidische Module (beispielsweise für das Mischen von Zellen und Medium, für eine definierte Inkubation der Zellen oder für die Separation der Zellen von ihrem Medium) am Institut für Mikrosystemtechnik (TUHH, AK Müller) entwickelt und getestet (siehe [247–249, 252]). Die Integration der einzelnen funktionalen Module auf einem einzigen Mikrochip stellte den letzten Schritt der Systementwicklung dar. Das Design, der Aufbau und die Herstellung dieses Mikrosystems sind unter Kapitel 3.17 beschrieben.

Um Analysen der Zellen unter *in-vivo* Bedingungen zu gewährleisten, ist eine direkte, schnelle und kontinuierliche Probenahme entscheidend. Daher lag neben der Systementwicklung ein wesentlicher Schwerpunkt dieser Arbeit in der Systemintegration in einen Bioreaktor.

4.2.1 Medienaustausch und Separation von CHO-K1 Zellen

Um die schnelle Probenahme und kontinuierliche Experimente im Mikrochip zu ermöglichen, wurde dieser direkt an einen druckstabilen Bioreaktor angeschlossen, in dem die Zelllinie CHO-K1 kultiviert wurde. Der verwendete Mikrochip und der experimentelle Aufbau des integrierten Mikrochip-Bioreaktors sind in Abbildung 26 gezeigt.

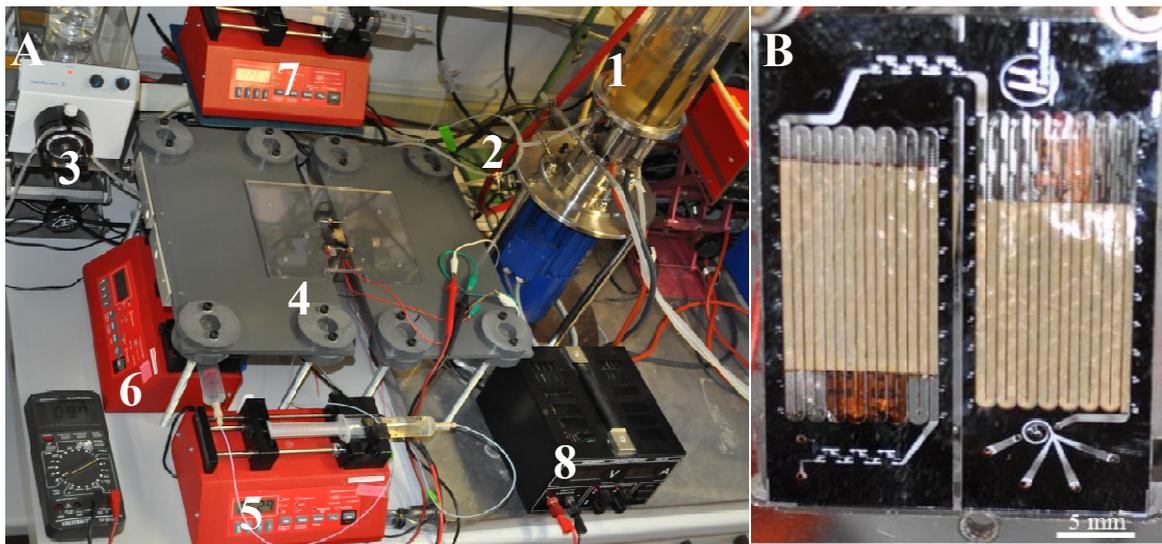


Abb. 26: Experimenteller Aufbau des integrierten LoaC und Bioreaktors (A) und detaillierte Ansicht des hergestellten LoaC (B).

1: VSF2000 Bioreaktor, 2: Waschsleife; 3: Pufferpumpe; 4: Integrierter Mikrochip; 5: Spritzenpumpe für Medium oder gewünschte Lösung (Eingang 2); 6: Spritzenpumpe für ein zweites Medium oder Lösung (Eingang 3); 7: Spritzenpumpe für den Waschpuffer; 8: Stromversorgung; [250].

Die Separationseffizienz der CHO-K1 Zellen vom Kulturmedium durch den LoaC wurde bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten getestet, indem ein Überdruck auf den Bioreaktor aufgebaut wurde (Kapitel 3.17). Die Zellsuspension wurde auf diese Weise in einem druckgetriebenen Fluss direkt von dem Bioreaktor in das Mikrochipssystem überführt. Nach dem Durchlauf durch das Mikrochipssystem wurden die Proben an den drei Ausgängen des integrierten Spiralseparators gesammelt, um die Separationseffizienz der Zellen von ihrem ursprünglichen Medium zu bestimmen. Als ein leicht zu detektierender Bestandteil des Kulturmediums repräsentiert die Messung der Glukosekonzentration die Medienverteilung an den drei Ausgängen des Mikrochipssystems und gibt somit Aufschluss über die Separationseffizienz der CHO Zellen von dem alten Medium. Die Separationseffizienz in Abhängigkeit des auf den Bioreaktor ausgeübten Überdrucks ist in den Diagrammen in Abbildung 27 dargestellt.

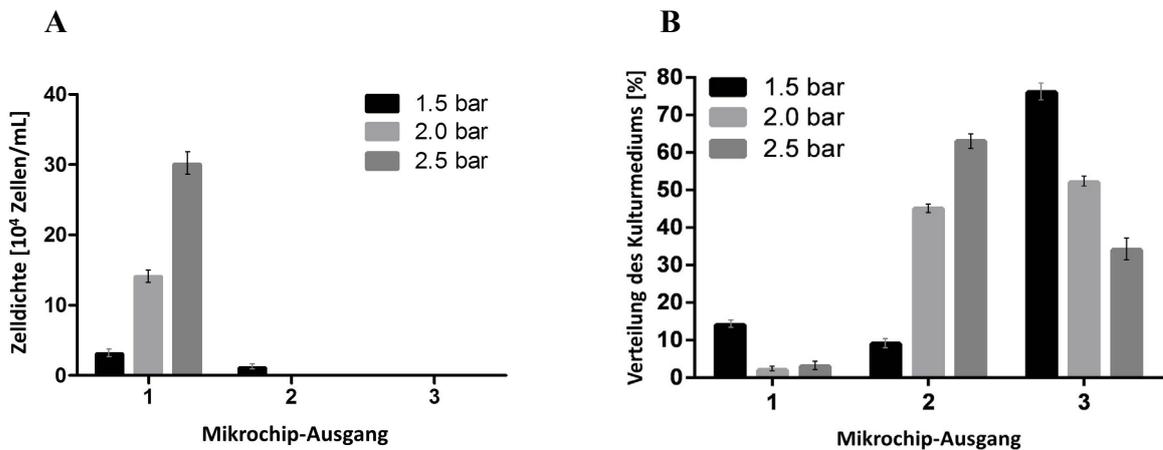


Abb. 27: Einfluss des Überdrucks im Bioreaktor

(A) auf die Verteilung von CHO-K1 Zellen an den Mikrochip-Ausgängen 1, 2 und 3 und (B) auf die Verteilung des Kulturmediums (als Messung der Glukosekonzentration) an den Mikrochip-Ausgängen 1, 2 und 3. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Messwerte bei Dreifachbestimmung.

Die in Abbildung 27A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit steigendem Druck die Zelldichte in den an Ausgang 1 des LoaC gesammelten Proben deutlich zunimmt. Bei einem Überdruck von 1,5 bar im Bioreaktor konnten am Ausgang 1 in den entsprechenden Fraktionen vergleichsweise niedrige Zelldichten von maximal $3 \cdot 10^4$ Zellen/mL detektiert werden. Bei diesem Druck passierten vereinzelt Zellen ebenfalls den Ausgang 2 des LoaC. Im Vergleich dazu verließen bei einem Überdruck von 2 oder 2,5 bar 100 % der in das System gedrückten Zellen den Ausgang 1 des Mikrochips. Hier wurden bei einem Druck von 2 bar durchschnittlich Zelldichten von $15 \cdot 10^4$ Zellen/mL bestimmt, während $30 \cdot 10^4$ Zellen/mL bei einem Druck von 2,5 bar gesammelt wurden. Für metabolische Analysen, die im Anschluss an die mikrofluidische Probenbehandlung erfolgen sollen, wird eine große Gesamtmenge an Zellen benötigt, um nicht an die analytischen Detektionsgrenzen für die Messungen intrazellulärer Metaboliten zu stoßen. Daher werden für diesen Zweck hohe Zelldichten in den Proben bevorzugt. Gleichzeitig wird jedoch auch eine effiziente Trennung der Zellen von ihrem Medium und den in diesem enthaltenen extrazellulären Metaboliten gefordert, so dass der Erhalt einer medienfreien Zellsuspension am Ausgang 1 des Mikrochips erzielt werden sollte.

Die Verteilung des Mediums bzw. der Glukose an den drei Ausgängen des LoaC in Abhängigkeit des Druckes ist in Abbildung 27B dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Verteilung des Mediums mit Veränderung des Druckes im Bioreaktor variieren lässt. Bei einem Druck von 1,5 bar wurden vergleichsweise hohe Glukosekonzentrationen

(~14 % der gemessenen Gesamtmenge) in den Proben gemessen, die am Ausgang 1 gesammelt wurden. Hier wurde die geringste Glukosekonzentration (~2 %) bei 2 bar Überdruck detektiert. Eine weitere Erhöhung des Druckes auf 2,5 bar führte wiederum zu einem Anstieg der gemessenen Glukosekonzentration (~3 %) in den Proben, die am Ausgang 1 aufgefangen wurden. In dieser Versuchsreihe konnte beobachtet werden, dass die Druckerhöhung eine Verschiebung der Glukoseverteilung vom Ausgang 3 in Richtung des Ausgangs 2 des LoaC bewirkt. Da bei 2 bar die effizienteste Trennung der CHO-K1 Zellen von ihrem Medium erzielt werden konnte, wurden 2 bar Überdruck als Standardeinstellung für den weiteren Betrieb des integrierten Mikrochip-Bioreaktor-Systems verwendet, obwohl höhere Drücke eine höhere Ausbeute an Zellen innerhalb der gleichen experimentellen Zeit liefern würden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine repräsentative Menge an CHO-K1 Zellen während des Durchlaufs durch den LoaC bei 2 bar effizient von ihrem Kulturmedium in das Waschmedium überführt wird. Innerhalb dieser Versuchsreihe waren alle an das Mikrosystem angeschlossenen Spritzen mit physiologischer Kochsalzlösung befüllt. Diese Lösung diente als Testflüssigkeit um die Flussraten innerhalb des Mikrosystems konstant zu halten, ohne dabei den lebenden Zellen zu schaden. Je nach experimenteller Fragestellung ließen sich für weitere biologische Experimente stattdessen aber auch andere Lösungen oder Reagenzien verwenden, die eine ähnliche Viskosität aufweisen. Der für die Systemintegration hier verwendete Versuchsaufbau bestehend aus Bioreaktor und der Probenahme mittels Überdruck ermöglicht einerseits die Kultivierung unter definierten und regelbaren Bedingungen und andererseits eine schnelle, direkte und kontinuierliche Probenverarbeitung. Allerdings ist dieser Aufbau vergleichsweise komplex und erfordert neben der Verwendung eines druckstabilen Bioreaktors auch lange Vorbereitungszeiten, nicht zuletzt wegen der hohen Sterilitätsansprüche tierischer Zellkulturen. Abhängig von der gewünschten experimentellen Anwendung ließe sich der Mikrochip auch in weniger komplexe Systeme (z.B. direkt über eine Spritzenpumpe) integrieren, die in ähnlichen Druckbereichen arbeiten. Solche Systeme erreichen jedoch, verglichen mit einem kontrollierten Bioreaktor, für zellbiologische Anwendungen schnell ihre Grenzen (Bereitstellung geringere Zellmengen, eingeschränkte Kontrolle über die Kultivierungsbedingungen wie z.B. pH-Wert, Temperatur oder Sedimentation).

4.2.2 Visualisierung des Zellflusses im Spiralseparator

Im Kapitel 4.2.1 wurde gezeigt, dass mit dem hier verwendeten Mikrochip-Bioreaktor-System eine effiziente Trennung der CHO-K1 Zellen von ihrem Medium erzielt werden konnte. Die funktionale Einheit, die diese Trennung hervorruft, ist der Spiralseparator, das letzte Modul des LoAC. Um einen Einblick in dieses Modul während des Betriebs zu erhalten, sollte im Folgenden eine Visualisierung des Zellflusses erfolgen. Hierfür wurden die Zellen mit einem grün fluoreszierenden Vitalfarbstoff angefärbt (siehe Kapitel 3.17.8). Die gefärbten Zellen wurden anschließend manuell mithilfe einer Spritzenpumpe bei einer Gesamtflussrate von 2,25 mL/min am Eingang 1 in den LoAC gepumpt. Diese Flussrate entspricht dem Gesamtfluss, der durch den Überdruck von 2 bar im Bioreaktor und den festgelegten Pumpraten im Mikrochip erzeugt wird. Um den Zellfluss innerhalb der Kanäle des Spiralseparators zu veranschaulichen, sind in Abbildung 28 die überlagerten Bildausschnitte von entsprechenden Fluoreszenz- und Auflichtaufnahmen dargestellt.

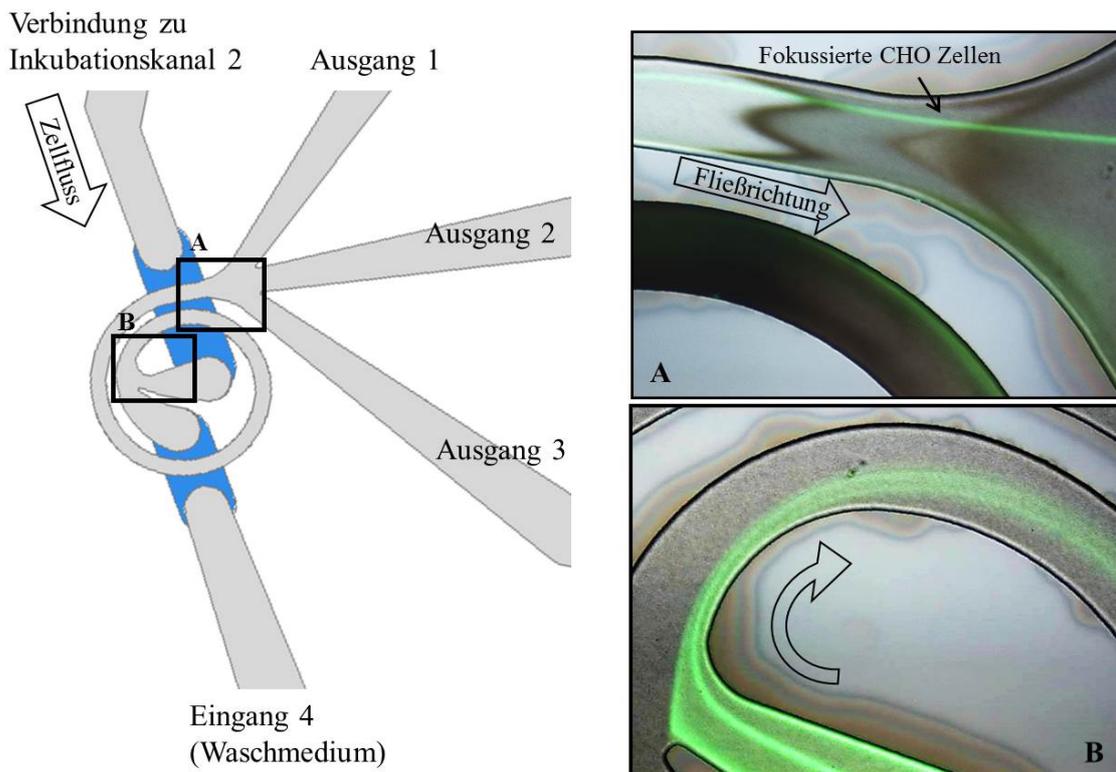


Abb. 28: Fluoreszenz- und auflichtmikroskopische Aufnahmen im Overlay vom Verlauf der CHO-K1 Zellen im Spiralseparator.

Die entsprechenden Bildausschnitte des Separators sind in der linken Grafik eingezeichnet. **(A)** Fokussierung der Zellen (grün) dicht an den Ausgängen des Spiralseparators bei einer Flussrate von 2,5 mL/min. **(B)** Zellfluss (grün) am Eingang des Spiralseparators, verbunden mit Inkubationskanal 2 [252].

Die beim Durchlauf der grün fluoreszierenden Zellen erhaltenen Bilder zeigen, dass die CHO-K1 Zellen innerhalb des Spiralseparators fokussiert werden (Abb. 28). Die Zellen, die den Mikrochip durchlaufen, werden vom Inkubationskanal 2 direkt in den Spiralseparator geleitet und erreichen diesen an der inneren Kanalwand (Abb. 28B). Dann wechseln die Zellen ihren Pfad von der inneren Wand in Richtung der äußeren Kanalwand, wo sie einen Gleichgewichtszustand erreichen (Abb. 28B und 28A). Die Zellen werden während des Durchlaufs durch den Spiralseparator in einem einzelnen, dünnen Strahl dicht an der äußeren Kanalwand fokussiert, bevor sie den Mikrochip verlassen. Aufgrund dieser Fokussierung werden die Zellen gezielt durch einen Ausgang des Spiralseparators gelenkt. Der hier zugrundeliegende Effekt ist die interne Fokussierung von Partikeln aufgrund ihrer Trägheit in einem Flüssigkeitsfluss. Dieser Effekt resultiert aus der Überlagerung der trägen Fokussierung und des Dean-Effekts in gebogenen Kanälen [253].

Die hier gemachten Beobachtungen liefern eine Erklärung für die hohe Trenneffizienz der Zellen von ihrem ursprünglichen Medium. Diese Trennung durch den Spiralseparator erfolgt innerhalb von wenigen Millisekunden, was für die Probenverarbeitung einen entscheidenden Vorteil gegenüber herkömmlicher Methoden zur Zellseparation (z.B. Zentrifugation oder Filtration) darstellt [252, 256].

4.2.3 Zellpermeabilisierung mittels Digitonin: Off-Chip

Für die Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus tierischer Zellen spielt neben der schnellen Probenverarbeitung auch die effektive Separation des zytosolischen vom mitochondrialen Zellkompartiment eine wichtige Rolle. Hierbei ist besonders entscheidend, dass die Mitochondrien während des Zellaufschlusses und des Separationsvorganges nicht beschädigt werden, um eine diskrete Analyse der mitochondrialen und zytosolischen Metaboliten zu ermöglichen. Darüber hinaus müssen für den Einsatz im Bereich der Mikrofluidik die entsprechenden Methoden in den Mikromaßstab übertragbar sein. Durch entsprechende Versuchsreihen zur Mitochondrienisolation aus CHO-K1 Zellen (siehe Kapitel 4.1), hat die Zellpermeabilisierung mittels Digitonin ein großes Potential für die Anwendung im Mikromaßstab gezeigt. Dies lässt sich einerseits dadurch begründen, dass der Einsatz des chemischen Detergens keinen hohen technologischen Anspruch bei der Entwicklung eines entsprechenden Mikrosystems stellt. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die

Mitochondrien bei der Zellpermeabilisierung bei einer Digitoninkonzentration von 0,01 % (w/v) nicht beschädigt werden und innerhalb der Zellen verbleiben. Um die benötigte Inkubationszeit bei dieser Konzentration für eine vollständige Zellpermeabilisierung zu bestimmen, wurden die CHO-K1 Zellen während der Permeabilisierung mittels Trypanblaufärbung mikroskopisch verfolgt. In Abbildung 29 sind die Aufnahmen des Permeabilisierungsverlaufs dargestellt.

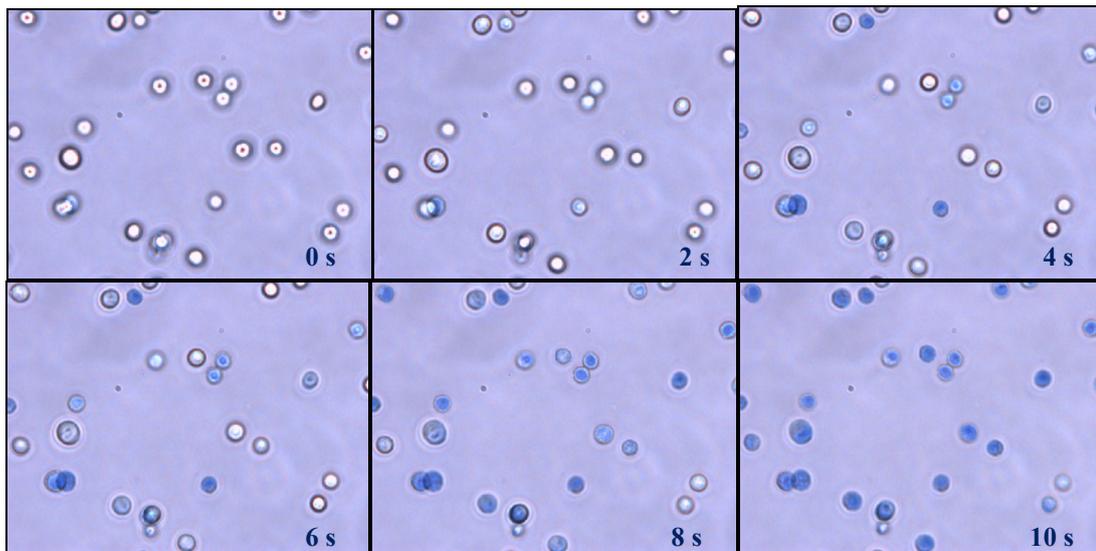


Abb. 29: Permeabilisierung von CHO-K1 Zellen mittels Digitonin (0,01 % (w/v)).

Die erfolgte Permeabilisierung wird durch den Eintritt des Trypanblau-Farbstoffes in die Zellen veranschaulicht und ist in Abhängigkeit der Zeit [s] dargestellt.

Die Permeabilisierung kann durch den Eintritt des Farbstoffes Trypanblau in die Zellen verfolgt werden. Während zu Beginn des Versuchs eine Viabilität der Zellen von 98 % bestimmt wurde (0 s), zeigen die Aufnahmen, dass bereits nach 4 s über 60 % der Zellen permeabilisiert wurden, was durch die blaue Färbung der Zellen zu erkennen ist (Abb. 29). Nach einer Inkubationszeit von 10 s erscheinen alle Zellen blau gefärbt, was für eine vollständige Permeabilisierung der Zellen spricht.

Durch diesen Versuch wurde der Eintritt eines Farbstoffes in die Zellen beobachtet. Mit dem Ziel der Separation der Mitochondrien von dem Zytosol der Zellen, ist jedoch der Austritt des Zytosols im Laufe der Permeabilisierung entscheidend. In der Literatur wird beschrieben, dass die Behandlung von Zellen mittels Digitonin in der Freisetzung von löslichen zytosolischen Komponenten resultiert [261]. Um den Austritt des Zytosols zeitlich verfolgen zu können, wurden CHO-K1 Zellen mit Calcein-AM angefärbt und anschließend die Freisetzung des grün fluoreszierenden Zytosols während der

Permeabilisierung der Zellen mittels Digitonin fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Die resultierenden Bildaufnahmen sind in Abbildung 30A gezeigt.

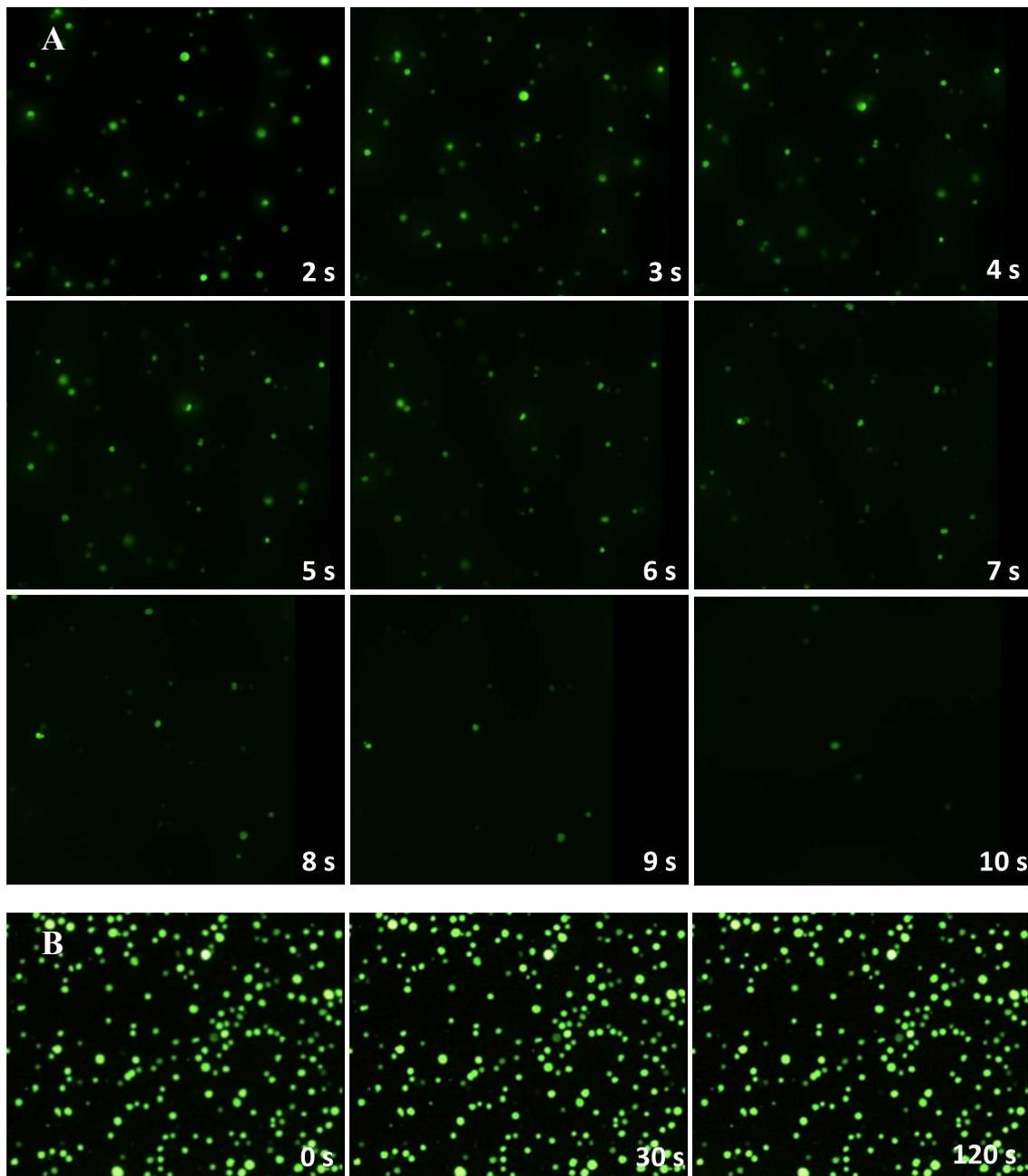


Abb. 30: Austritt des Zytosols nach der Permeabilisierung von CHO-K1 Zellen mittels Digitonin (0,01 % (w/v)).

(A) Die erfolgte Permeabilisierung wird durch die Abnahme der grünen Fluoreszenz der Zellen (Färbung durch Calcein-AM) veranschaulicht. (B) Mit Calcein-AM gefärbte Zellen ohne Zugabe von Digitonin (Referenz für die Fluoreszenzstabilität).

Als Referenz wurden die grün fluoreszierenden Zellen ohne die Zugabe von Digitonin über einen Zeitraum von insgesamt 120 s bei kontinuierlicher Laseraktivität mikroskopisch betrachtet. In Abbildung 30B sind die erhaltenen Referenzaufnahmen dargestellt.

Anhand der Aufnahmen in Abbildung 30A ist zu erkennen, dass bereits nach einer Inkubationszeit von 10 s eine vollständige Permeabilisierung der Zellen mittels Digitonin erfolgt ist, was durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität der Zellen zu beobachten ist. Nach 10 s lässt sich in dem aufgenommenen Bildausschnitt nur noch eine schwach grün fluoreszierende Zelle beobachten, deren Fluoreszenzintensität jedoch stark abgenommen hat, so dass davon auszugehen ist, dass diese Zelle ebenfalls permeabilisiert wurde. Die Referenzaufnahmen (Abb. 30B) zeigen, dass die Fluoreszenzintensität der Calcein-gefärbten Zellen auch nach 120 s Laserbestrahlung unverändert bleibt. Somit lässt sich ausschließen, dass die Abnahme der Fluoreszenzintensität der mit Digitonin behandelten Zellen auf die Ausbleichung des Farbstoffes (Photobleichung) zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass der Austritt des Zytosols aus den permeabilisierten Zellen innerhalb weniger Sekunden erfolgen kann. Allerdings lassen die Ergebnisse vermuten, dass der Austritt des Zytosols nicht gleichmäßig erfolgt und erlauben zudem keine Aussage darüber, wie hoch der in den Zellen verbleibende Restanteil des Zytosols ist. Freigesetztes sowie verbleibendes Zytosol innerhalb der permeabilisierten Zellen ließe sich jedoch durch geeignete Waschschriffe (z.B. durch gezielten Medien austausch oder Zentrifugation) entfernen.

4.2.4 Zellpermeabilisierung mittels Digitonin: On-Chip

Ein entscheidender Vorteil der Zellpermeabilisierung mittels Digitonin ist, dass die permeabilisierten Zellen ihre runde Form behalten. Durch die Verwendung von mikrofluidischen Methoden zur Partikelseparation, lässt sich somit die Separation der permeabilisierten Zellen (inkl. der in ihnen enthaltenen Mitochondrien) erzielen. Dieses Verfahren erscheint deutlich praktikabler, verglichen mit der Separation freigesetzter Mitochondrien aus einem Zellysat. Sowohl die Zellyse, als auch die anschließende Separation der CHO-K1 Zellen sollte innerhalb dieser Arbeit mit dem integrierten Mikrochip-Bioreaktor-System getestet werden. Aufgrund des Designs des verwendeten Mikrochips (siehe Kapitel 3.17.3), wird einerseits innerhalb von Millisekunden eine effektive Vermischung der aus dem Bioreaktor kommenden Zellen mit dem

Permeabilisierungsdetergens ermöglicht [249]. Andererseits bietet der an den Mikromixer angeschlossene Inkubationskanal eine durchschnittliche Inkubationszeit von 9 s, wodurch eine effektive Permeabilisierung der Zellen und die Freisetzung des Zytosols erfolgen können. Dadurch, dass zwei dieser Mikromischer und Inkubationskanäle auf dem Chip hintereinander integriert sind, ließen sich metabolische Reaktionen vor der Permeabilisierung durch die Zugabe einer gekühlten (4°C) Quenching-Lösung stark reduzieren. Eine andere Anwendungsmöglichkeit besteht hingegen in der Zugabe eines definierten Substratpulses im Vorfeld der Zellpermeabilisierung.

Um das Konzept der Zellpermeabilisierung und der anschließenden Zellseparation mit dem Mikrochip-Bioreaktor-System zu testen, wurde der in Kapitel 3.17.5 beschriebene Versuchsaufbau verwendet, wobei die Spritzenpumpe am Chipeingang 2 mit gekühlter NaCl-Lösung (0,9 %, 4°C) und die Spritzenpumpe am Eingang 3 mit einer Digitonin-Lösung (0,025 % (w/v), 4°C) betrieben wurden. Durch Zellzählungen, Viabilitäts- und Glukosebestimmungen in Proben, die an den drei Ausgängen des Mikrochips gesammelt wurden, konnten die Permeabilisierungseffizienz sowie die Separationseffizienz der Zellen vom Medium bestimmt werden. Die Ergebnisse der Zellzählung und der Glukosemessung sind in Abbildung 31 dargestellt.

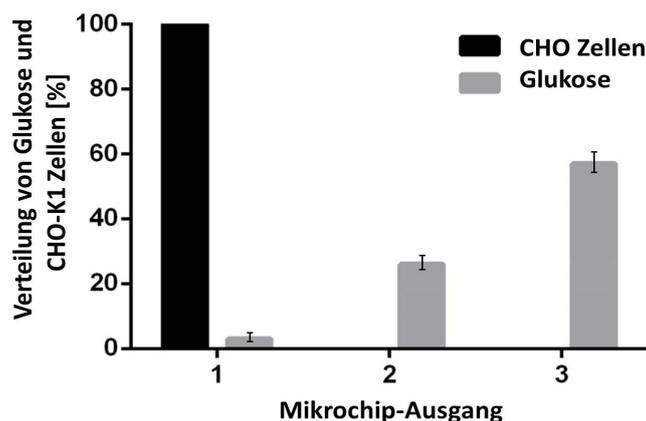


Abb. 31: Verteilung der permeabilisierten CHO-K1 Zellen und des Mediums (als Messung der Glukosekonzentration) an den Mikrochip-Ausgängen 1, 2 und 3.

Versuche wurden mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL und einem Überdruck von 2 bar auf den Bioreaktor durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Messwerte bei Dreifachbestimmung.

Wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, repräsentiert die Messung der Glukosekonzentration die Verteilung des alten Mediums an den drei Mikrochip-Ausgängen. Durch die Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau konnte die Permeabilisierungseffizienz bestimmt werden, die bei jedem Versuchsdurchlauf bei 100 % lag. Außerdem zeigen die durch diese Versuchsreihe erhaltenen Ergebnisse (Abb. 31), dass die Separation der permeabilisierten CHO Zellen von ihrem Medium ebenso effizient abläuft, wie mit nicht permeabilisierten Zellen (zum Vergleich siehe Abb. 27). 100 % der permeabilisierten Zellen wurden am Ausgang 1 des LoaC detektiert, während eine maximale Glukosekonzentration von 2,7 % in den entsprechenden Proben gemessen wurde. Die verbleibenden 97,3 % der Glukose wurden an den Ausgängen 2 und 3 gemessen. Durch den Eingang 4 des LoaC wurde während des Versuchs kontinuierlich NaCl-Lösung (0,9 %) als Waschmedium in den Spiralseparator geleitet. Durch die Überführung der Zellen von ihrem alten Medium in dieses Waschmedium erfolgt somit neben der Separation gleichzeitig auch ein Waschschriff der Zellen. Hierbei werden die verbleibende Digitoninlösung sowie das freigesetzte Zytosol von den Zellen abgetrennt.

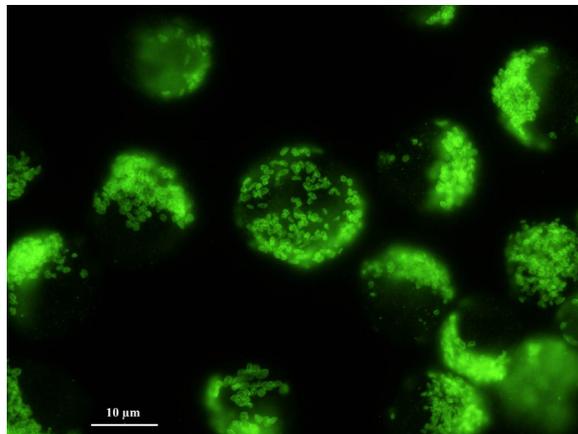


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von anti-Tom20 markierten Mitochondrien innerhalb von Digitonin permeabilisierten CHO-K1 Zellen.

(nach dem Durchlauf des Mikrochipsystems (100-fache Vergrößerung)).

Um zu prüfen ob die Mitochondrien nach dem Durchlauf durch den Mikrochip (die Separations- und Waschprozesse durch den Spiralseparator mit eingeschlossen) weiterhin innerhalb der permeabilisierten Zellen verbleiben, wurden die Mitochondrien durch spezifische Antikörperfärbung fluoreszenzmarkiert und die angefärbten Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (siehe Kapitel 3.14.6). Eine repräsentative Aufnahme ist in Abbildung 32 gezeigt.

4.2.5 Dynamische Experimente mit definiertem Substratpuls

Nach der Evaluierung des integrierten Mikrochip-Bioreaktor-Systems durch erste biologische Experimente sollte die Praktikabilität des Systems für die Durchführung metabolischer Pulsexperimente getestet werden. Hierfür wurden die CHO-K1 Zellen entsprechend Kapitel 3.17.7 unter Glutamin-limitierten Bedingungen kultiviert. Eine Skizze des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 33 gezeigt. Definierte Substratpulse (0 s, 9 s und 18 s) mit glutaminhaltigem Medium konnten aufgrund des Mikrochipdesigns und des experimentellen Aufbaus (siehe Kapitel 3.17) erfolgreich durchgeführt werden.

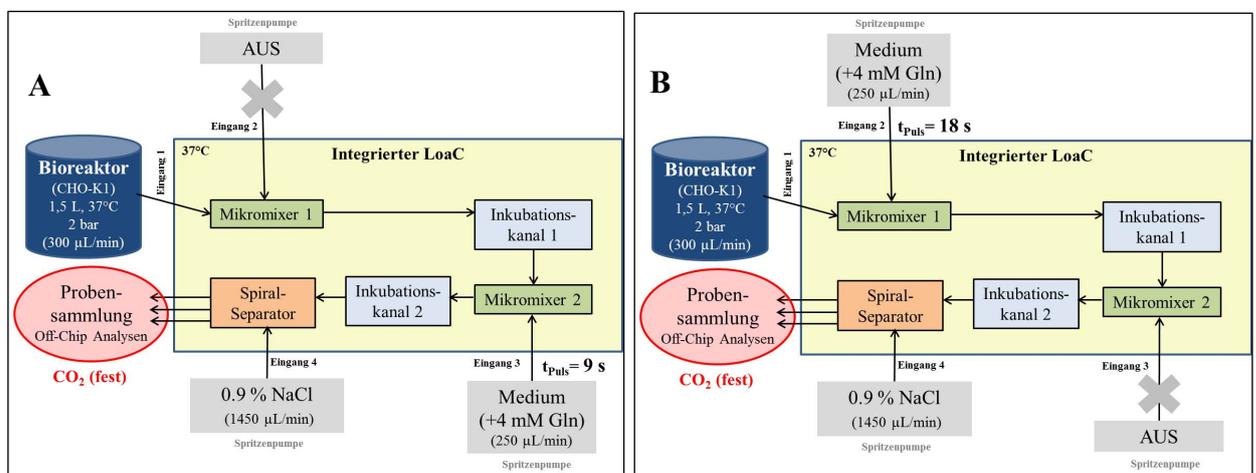


Abb. 33: Skizze des experimentellen Aufbaus des integrierten Mikrochip-Bioreaktor-Systems für Glutaminpuls-Experimente.

(A) Experimenteller Aufbau für einen 9 s Puls. Hier ist die Spritzenpumpe am Eingang 2 ausgeschaltet, während die Pumpe am Eingang 3 betrieben wird. (B) Experimenteller Aufbau für einen 18 s Puls. Hier ist die Spritzenpumpe am Eingang 2 in Betrieb, während die Pumpe am Eingang 3 ausgeschaltet ist.

Für jedes Experiment (0 s, 9 s und 18 s) konnten innerhalb von 45 min kontinuierlicher Betriebsdauer jeweils eine Gesamtmenge von 10^7 Zellen am Ausgang 1 des Mikrochips gesammelt werden (ausgehend von einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL im Bioreaktor). Die Ergebnisse der Separationseffizienz der Zellen von ihrem ursprünglichen Medium sind in Abbildung 34 dargestellt (Messergebnisse nach 6 h). Dadurch, dass die Proben direkt in trockeneisgekühlten Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurden, konnte hierbei gleichzeitig das Abstoppen der Stoffwechselaktivität der Zellen erzielt werden.

Das hier verwendete Mikrochip-Bioreaktor-System wurde für verschiedene Experimente mit CHO-K1 Zellen kontinuierlich über eine Gesamtdauer von 18 h betrieben.

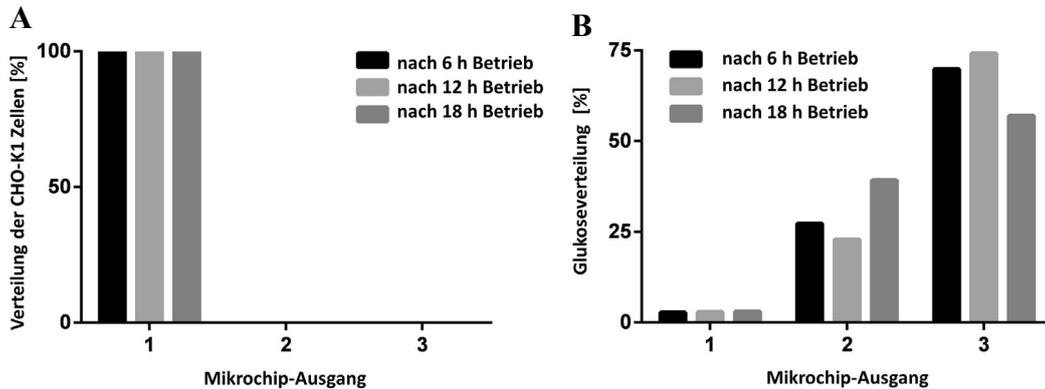


Abb. 34: Messung der Reproduzierbarkeit der Separationseffizienz des Mikrochip-Bioreaktor-Systems. (A) Verteilung von CHO-K1 Zellen und **(B)** Verteilung des Kulturmediums (als Messung der Glukosekonzentration) an den Mikrochip-Ausgängen 1, 2 und 3 nach 6 h, 12 h und 18 h Dauerbetrieb des Mikrochip-Bioreaktor-Systems.

In regelmäßigen Abständen von 45 min wurde der Mikrochip manuell mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, um eventuelle Zellablagerungen und dadurch bedingte Verblockungen des Systems zu vermeiden. Die Reproduzierbarkeit der Separationseffizienz des Chipsystems wurde durch regelmäßige Probenanalysen an den drei Chipausgängen überprüft. Wie in Abbildung 34 gezeigt ist, bleibt die Effizienz der Zell- und Medienseparation während der Versuchsdurchläufe erhalten. Aufgrund der effektiven Trennung der CHO-K1 Zellen von ihrem extrazellulären Medium kann im Anschluss an die entsprechenden Pulsexperimente eine separate Analyse der intrazellulären und extrazellulären Metaboliten ermöglicht werden.

In einem zweiten experimentellen Ansatz für die Durchführung dynamischer Substratpulse durch das vorgestellte Mikrochip-Bioreaktor-System, wurden die CHO-K1 Zellen unter Glukose-limitierten Bedingungen kultiviert. Der experimentelle Aufbau, die Kultivierungsparameter sowie die Fließgeschwindigkeit im Mikrosystem entsprachen dabei denen der vorangegangenen Glutaminpulsversuche (siehe Kapitel 3.17.7).

Glukosefreies TC-42 Medium wurde als Sonderanfertigung von der Firma TeutoCell bezogen und vor Gebrauch mit 4 mM L-Glutamin supplementiert. Nach einer Kultivierungsdauer von 2 h unter Glukoselimitierung wurden entsprechende Substratpulse mit vollmarkierter $[U-^{13}C_6]$ -Glukose in einer Konzentration von 40 mM im Zellkulturmedium durchgeführt. Die Verwendung von ^{13}C -markierten Substraten ermöglicht die gezielte Messung des Markierungsmusters intrazellulärer Metaboliten, die

nach Verstoffwechslung des markierten Substrates gebildet werden. Auf Basis der Markierungsdaten können ^{13}C -Stoffflussanalysen durchgeführt werden, wodurch beispielsweise Rückschlüsse über die Auswirkung der Substratpulse auf den Metabolismus nach entsprechenden Verhungerungsphasen gezogen werden können [128]. Durch regelmäßige Bestimmung der Zelldichte sowie der Glukoseverteilung an den drei Ausgängen des Mikrochips, wurde auch bei dieser Versuchsreihe die Reproduzierbarkeit der Separationseffizienz festgestellt. Als repräsentatives Beispiel dieser Messungen sind die Glukose- und Zellverteilung nach 18 h Gesamtbetriebszeit des integrierten Systems (was dem letzten Versuch des Glukosepulsexperiments entspricht) in Abbildung 34 dargestellt. Die vielfältigen Versuche, die mit dem integrierten Mikrochip-Bioreaktor durchführbar sind, demonstrieren das große Potential dieses Systems durch die schnelle, gezielte und effiziente Probenverarbeitung, anschließende metabolische Analysen der Zellen sowie einzelner Zellkompartimente zu ermöglichen.

Die metabolischen Analysen der Proben der durchgeführten Mikrochip-Bioreaktor-Experimente wurden am Institut für Technische Biochemie der Universität des Saarlandes (AK Heinzle, Judith Wahrheit) durchgeführt. Die Ergebnisse der Analysen lagen zum Zeitpunkt der Abfassung der vorliegenden Arbeit noch nicht vor, so dass die hier vorgestellten Ergebnisse lediglich die potentielle Leistungsfähigkeit der getesteten Hardware für den Einsatz in metabolischen Studien demonstrieren können.

Da die Verweilzeit der Zellen in jedem integrierten Mikromodul durch das Chipdesign und die angelegte Fließgeschwindigkeit bestimmt wird und nicht von der manuellen Präzision eines Experimentators abhängt, kann die Variabilität von Versuch zu Versuch durch den Einsatz dieses Mikrochip-Systems enorm reduziert werden. Darüber hinaus ermöglichen die dünnen Chipgeometrien einen schnellen Wärmeaustausch und erlauben somit die Nutzung einer äußeren Temperaturregelung. So konnte durch angebrachte Peltierelemente eine physiologische Temperatur von 37°C in dem LoC gehalten werden [256]. In dem hier präsentierten Mikrochip-Bioreaktor-System wurden feste Inkubationszeiten von 9 s und 18 s für die Pulsexperimente gewählt. Allerdings lässt sich die Inkubationszeit in dem Mikrochip durch eine Adaptierung der Fließgeschwindigkeit (durch niedrigere oder höhere Drücke oder Pumpraten) verändern. Um jedoch gleichzeitig eine effiziente Trennung der Zellen von ihrem extrazellulären Medium zu erzielen, müsste hierfür die Pumprate der Spritzenpumpe am Eingang 4 (Spiralseparator) entsprechend angepasst werden.

4.2.6 Zusammenfassende Diskussion

Für quantitative metabolische Analyse sind eine schnelle Probenahme, das unmittelbare Abstoppen des Metabolismus (Quenching) und die Abtrennung extrazellulärer Metaboliten von essentieller Bedeutung. Da gewöhnliche, manuelle Methoden und Protokolle zur Probenverarbeitung von tierischen Zellen zeitaufwändig sind und häufig zu einem Verlust der physiologischen Bedingungen führen, bestand das Ziel dieser Versuchsreihe in der Integration eines Mikrochip-Systems in einen Bioreaktor, wodurch eine direkte und schnelle Probenverarbeitung unter physiologischen und dynamischen Bedingungen ermöglicht werden sollte. Durch eine kapillare Verbindung des mikrofluidischen Chips mit dem Bioreaktor konnte eine direkte Probenahme unter gewünschten Kultivierungsbedingungen realisiert werden. Die kontinuierliche Probenahme von Suspensionszellen wurde dabei durch das Anlegen eines Überdrucks auf den Bioreaktor erzielt. Um eine ideale Separation der CHO-K1 Zellen von ihrem Kulturmedium zu erzeugen, wurden verschiedene Fließgeschwindigkeiten durch die Variation des Überdrucks in dem System getestet. Hierbei konnten die besten Separationsergebnisse bei einem Überdruck im Bioreaktor von 2 bar erzielt werden, was einer totalen Fließgeschwindigkeit von 2,25 mL/min im Mikrochip entsprach. Bei dieser Fließgeschwindigkeit konnten 100 % der Zellen am Ausgang 1 des Mikrochips aufgefangen werden, während lediglich 2,1 % \pm 0,4 des ursprünglichen Mediums ebenfalls diesen Ausgang passierten. Ausgehend von einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL im Bioreaktor wurden durchschnittlich $15 \cdot 10^4$ Zellen/mL an dem ersten von drei Ausgängen des Mikrochips gesammelt. Das entspricht einer Probenausbeute von rund $33,8 \cdot 10^4$ Zellen/min. Durch das integrierte Mikrochip-System wurden die CHO-K1 Zellen in dem Spiralseparator-Modul innerhalb von wenigen Millisekunden von ihrem extrazellulären Medium in metabolitenfreien Puffer überführt, ohne dass die Zellen hierbei hohen Scherkräften wie bei konventionellen Zentrifugationsmethoden ausgesetzt wurden. Die Viabilität der gesammelten Zellen lag in allen Versuchsdurchläufen (mit Ausnahme der gezielten Permeabilisierung der Zellen mittels Digitonin) bei ≥ 98 %, was den schonenden Charakter der Probenverarbeitung in dem Mikrosystem demonstriert. Hierdurch konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich der Überdruck auf den Bioreaktor nicht negativ auf die Zellviabilität auswirkt. Zusätzlich zu der hohen Separationseffizienz ermöglichte der Einsatz des Mikrochips bei der Fließgeschwindigkeit von 2,25 mL/min auch definierte Inkubationszeiten der Zellen von

9 s und 18 s, so dass verschiedene Substratpulseexperimente oder die gezielte Behandlung der Zellen mit Detergenzien durchgeführt werden konnten. Für die Evaluierung des integrierten Systems wurden einerseits Glukose- und Glutaminpulseexperimente erfolgreich durchgeführt. Andererseits konnte durch die Digitoninpermeabilisierung und die anschließende Trennung der Zellen mithilfe des integrierten Mikrochips dessen großes Potential für die schnelle, schonende und effiziente Separation der mitochondrialen und zytosolischen Zellkompartimente für metabolische Analysen aufgezeigt werden. Der integrierte Mikrochip wurde innerhalb dieser Arbeit für die Durchführung der biologischen Experimente über einen Zeitraum von insgesamt 18 h betrieben, wobei eine hohe Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Separation der Zellen von ihrem ursprünglichen Medium verzeichnet werden konnte. Diese Resultate lassen erkennen, dass das verwendete Mikrochip-Bioreaktor-System die Durchführung von kontinuierlichen biologischen Kurzzeitexperimenten im Mikromaßstab ermöglicht. Darüber hinaus zeigt das entwickelte System ein großes Potential für quantitative und dynamische Untersuchungen tierischer Zellen unter realen Kultivierungsbedingungen in einem Bioreaktor. Neben den hier vorgestellten Experimenten kann das System prinzipiell auch für weitere biologische Versuche herangezogen werden, in denen andere Substratpulse, Lösungen oder Reagenzien mit ähnlichen Viskositäten für gewünschte Untersuchungen eingesetzt werden.

4.3 Systembiologische Untersuchungen von CHO-K1 Zellen

Im vorherigen Kapitel wurde ein integriertes Mikrochip-Bioreaktor-System vorgestellt, durch das eine direkte, kontinuierliche Probenahme aus dem Bioreaktor sowie eine schnelle und reproduzierbare Probenverarbeitung von CHO Zellen erzielt werden konnte. Dieses System bildet einen fundamentalen Schritt für die systembiologische Untersuchung des Zellmetabolismus unter physiologischen und dynamischen Bedingungen. Neben effizienten Probenverarbeitungssystemen spielt jedoch auch der Zustand einer jeden Zelle eine wesentliche Rolle für den Erhalt aussagekräftiger Stoffwechselanalysen. Denn die Stoffwechselaktivität der Zelle wird durch zahlreiche Faktoren maßgeblich beeinflusst, was zu unterschiedlichen Substratverbrauchsdaten und entsprechend veränderten Metabolitenkonzentrationen führt. Neben den Kultivierungsbedingungen, der Verfügbarkeit von Substrat und Sauerstoff sowie der Wachstumsphase der Zellen, haben auch die verschiedenen Zellzyklusphasen einen entscheidenden Einfluss auf den Stoffwechsel. Vor diesem Hintergrund ist eine detaillierte Untersuchung der CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen und im Besonderen in Bezug auf die Zellzyklusphasen erforderlich. Für diesen Zweck wurden die CHO-K1 Zellen zunächst als Mischpopulation im Batch- und im kontinuierlichen Betrieb kultiviert. Um ein synchrones Wachstum der Zellen zu erzielen wurden CHO-K1 Mischpopulationen durch die Methode der Gegenstrom-Zentrifugationselutriation anhand ihrer Zellgröße und somit entsprechend ihrer Zellzyklusphasen getrennt [262]. Die getrennten Zellfraktionen wurden anschließend im Bioreaktor weiter kultiviert. Im Folgenden werden die Ergebnisse aller Kultivierungen und der sich anschließenden Untersuchungen gezeigt und erläutert. Zunächst werden die Charakteristika unsynchroner Zellpopulationen im Batch- und kontinuierlichen Verfahren veranschaulicht und miteinander verglichen. Anschließend sollen die Ergebnisse der synchronisierten Kultivierungen erläutert werden und die Zellzyklusabhängigkeit einzelner Zellzusammenhänge untersucht werden. Durch diese Vergleichskultivierungen sollen die grundlegenden Charakteristika der genutzten Zelllinie CHO-K1 in Bezug auf Proliferation, Metabolismus, die mitochondriale Struktur sowie die Expression stoffwechselrelevanter Enzyme innerhalb der Zelle erfasst werden.

4.3.1 Batch-Kultivierung von CHO-K1 Mischpopulationen im Bioreaktor

Eine Grundvoraussetzung für die Untersuchung von Zellen unter physiologischen Bedingungen stellt die Kultivierung unter definierten, geregelten und reproduzierbaren Bedingungen dar. Diese Bedingungen können in einfachen Zellkultursystemen, wie beispielsweise Schüttelkolben oder T-Flaschen, nicht gewährleistet werden. Daher wurden innerhalb dieser Arbeit mehrere Vergleichskultivierungen mit CHO-K1 Zellen in einem Kleinmaßstabbioreaktor durchgeführt. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse nicht synchronisierter Batch-Kultivierungen von CHO-K1 Zellen im Vario 1000 Bioreaktor dargestellt. Die Kultivierungen im Batch-Betrieb sollten einer ersten Erfassung des Verhaltens der CHO-K1 Zellen im geregelten Bioreaktor dienen. Da für systembiologische Untersuchungen von Zellen die Kultivierungsbedingungen sowie die Reproduzierbarkeit und Konstanz des Zellwachstums eine wichtige Rolle spielen, wurden diese Kultivierungen dreifach durchgeführt. Das Kulturvolumen betrug dabei jeweils 250 mL und die Animpfzellichte lag bei $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die gesamte Versuchsdauer je Batch belief sich auf 144 h, wobei zweimal täglich eine Probenahme erfolgte. Die Proben wurden auf die Zelldichte, Viabilität und die Medienzusammensetzung hin untersucht. Eine detaillierte Analyse extrazellulärer Metaboliten wurde als Kooperationsprojekt am Institut für Technische Biochemie (Universität des Saarlandes, AK Heinzle) durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben für die spätere intrazelluläre Färbung der Mitochondrien sowie für Analysen des intrazellulären Enzymgehalts fixiert. Hierfür wurde ein Teil der Zellen in Kooperation mit dem Max Planck Institut in Göttingen (AK Jakobs) mittels hochauflösender STED-Mikroskopie untersucht, um hierdurch Rückschlüsse auf die Verteilung mitochondrialer Proteine zu erhalten (siehe Kapitel 3.15.3). Durch die Integration eines *at-line* Mikroskops sollte dessen Funktionalität für eine permanente Überwachung der Zellsuspension über den Kultivierungsverlauf getestet werden.

4.3.1.1 Zelldichte und Wachstumsrate

Abbildung 35 zeigt den repräsentativen Verlauf der Lebendzellichte, der Gesamtzellichte, die mittels *at-line* Mikroskop bestimmt wurde, und der Viabilität der CHO-K1 Zellen über den Batch-Kultivierungsverlauf im Vario 1000 Bioreaktor.

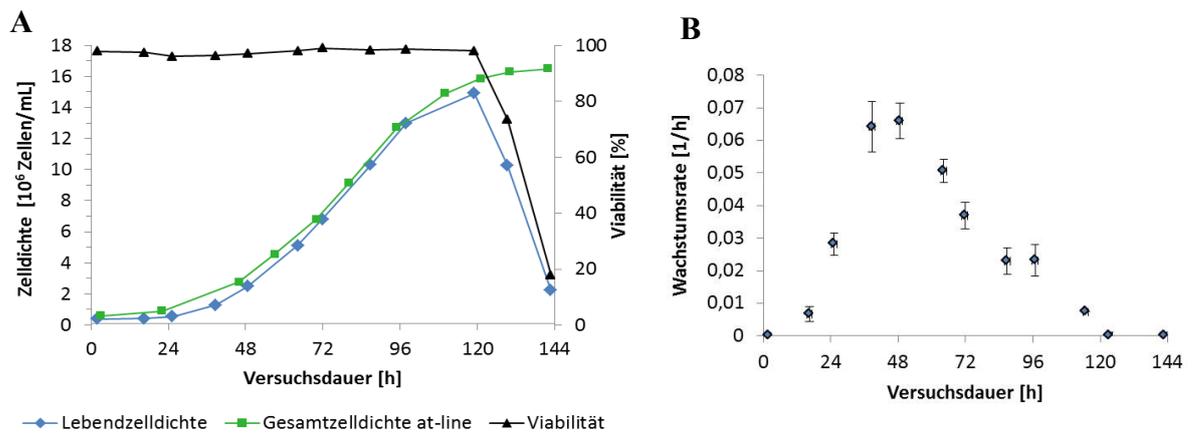


Abb. 35: Typischer Verlauf einer Batch-Kultivierung von CHO-K1 Zellen im Vario 1000 Bioreaktor.

(A) Gezeigt sind die Zelldichte und Viabilität während der Batch-Kultivierung und (B) die entsprechenden Wachstumsraten. Die Fehlerbalken repräsentieren die bestimmte Standardabweichung ($n=3$).

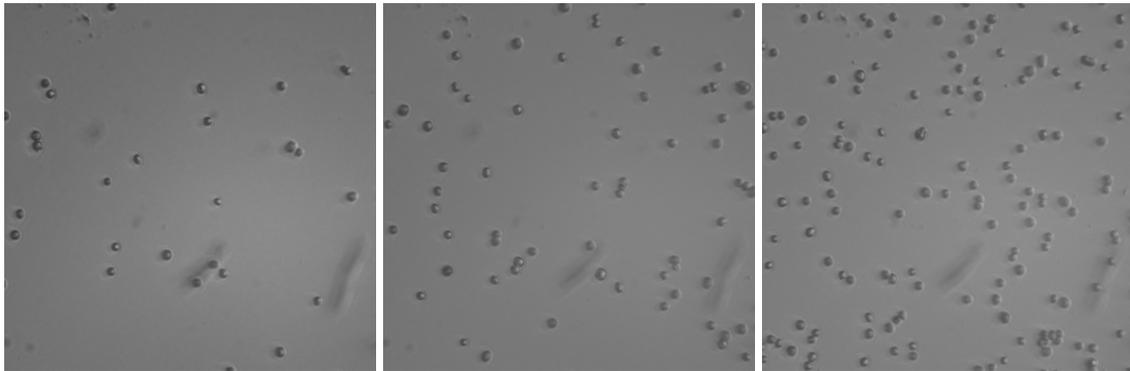
Im typischen Kultivierungsverlauf treten die CHO-K1 Zellen nach einer anfänglichen Lag-Phase von etwa 24 h, in der die Zelldichte nahezu konstant bei $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL liegt, in die exponentielle Wachstumsphase ein. Die in der exponentiellen Phase berechnete Verdopplungszeit beträgt dabei $15,3 \pm 0,3$ h. Das exponentielle Wachstum geht nach 72 h und einer Zelldichte von $7,3 \cdot 10^6$ Zellen/mL in ein nahezu lineares Wachstum über. Nach etwa 96 h und einer Zelldichte von $12,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL setzt eine Übergangsphase ein, in der das Wachstum nur noch verlangsamt stattfindet. Hier erreicht die Lebendzellichte nach 120 h ein Maximum von $15 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die Viabilität beträgt bis zu diesem Zeitpunkt $\geq 97\%$ und fällt in den folgenden 24 Stunden auf 20 % ab. Eine klassische stationäre Phase kann für das Wachstum der CHO-K1 Zelllinie nicht beobachtet werden. Dieser Wachstumsverlauf, mit der für tierische Zellen vergleichsweise kurzen Übergangs- bzw. stationären Phase und dem darauffolgenden schlagartigen Absterben der kompletten Zellpopulation, ist charakteristisch für die hier verwendete CHO-K1 Zelllinie bei Batch-Kultivierungen und konnte ebenfalls für Kultivierungen in Schüttelkolben beobachtet werden. Anhand der gemessenen Wachstumsraten und der bestimmten Standardabweichungen über den Verlauf von drei Batch-Kultivierungen zeigt sich, dass die CHO-K1 Zellen ein reproduzierbares Wachstumsverhalten aufweisen (Abb. 35B). Die in Abbildung 35B dargestellte Wachstumsrate liegt in der Lag-Phase bei etwa 0,005 1/h und erreicht ihr Maximum von 0,065 1/h während der exponentiellen Wachstumsphase nach

36 bis 52 h. Im folgenden Kultivierungsverlauf wird ein Rückgang der Wachstumsrate verzeichnet. Sie erreicht mit Werten zwischen 0,025 1/h und 0,03 1/h während des linearen Wachstums bis zum Eintritt in die Übergangsphase (stationäre Phase) nur noch bis zu 46 % der maximalen Wachstumsrate. Mit dem beginnenden Absterben der Zellen nach 120 h sinkt die Wachstumsrate folglich auf null.

4.3.1.2 Integration eines *at-line* Mikroskops

Beim Vergleich der Lebendzellichte, die über manuelle Probenahme bestimmt wurde, mit der Gesamtzellichte, die über die Bildauswertung des *at-line* Mikroskops erhalten wurde, zeigt sich bis zu einer Kultivierungsdauer von 120 h ein nahezu paralleler Verlauf beider Werte (Abb. 35A). Allerdings liegt die mittels *at-line* Mikroskop bestimmte Gesamtzellichte während des gesamten Verlaufs leicht über der Lebendzellichte (3 bis 10 %). Die leicht erhöhten Werte der mittels *at-line* Mikroskop bestimmten Zellichte resultieren einerseits daraus, dass durch diese Methode kein Ausschluss der toten Zellen erfolgen konnte. Aufgrund der hohen Viabilität der CHO-K1 Zellen ist dieser Einfluss hier jedoch als gering einzuschätzen. Andererseits wurde die Spaltöffnung des verwendeten Mikroskops, welches als Prototyp zuvor noch nicht bei einer Kultivierung tierischer Zellen im Bioreaktor getestet wurde, vor Beginn der Kultivierung manuell kalibriert. Ein minimal zu weit geöffneter Spalt könnte einen erhöhten Durchfluss der Zellsuspension bedingt haben. Daraus resultierend könnten erhöhte Werte für die Zellichte ermittelt worden sein, da das tatsächliche unter dem Mikroskop befindliche Volumen von dem zuvor kalibrierten abwich. Mit Beginn der Absterbephase ab 120 h ist eine rapide Abnahme der Lebendzellichte zu beobachten, während die Gesamtzellichte (*at-line* Mikroskop) nahezu konstant bleibt und nach 144 h bei $16,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL liegt. Besonders während der Absterbephase der Zellen zeigt sich der Unterschied der beiden Bestimmungsmethoden deutlich.

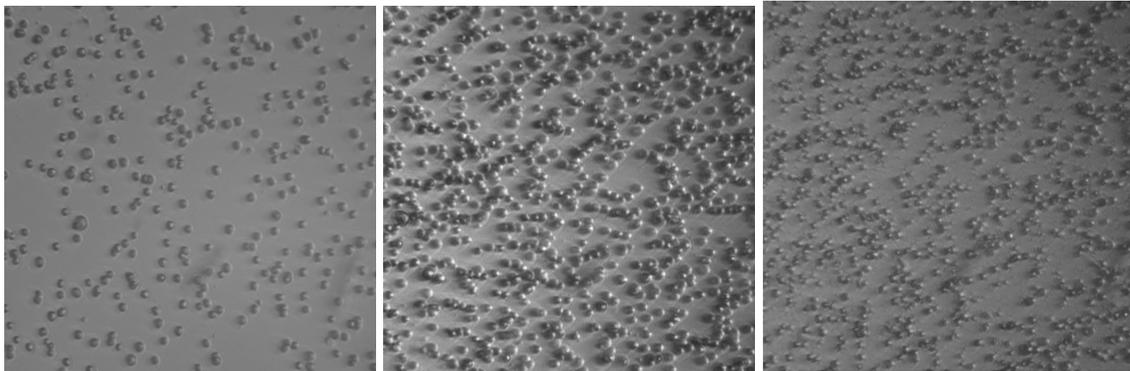
Abbildung 36 zeigt repräsentative Bilder der Zellsuspension, die zu verschiedenen Zeitpunkten während der Batch-Kultivierung durch das *at-line* Mikroskop aufgenommen wurden.



(A) Zelldichte: $0,52 \cdot 10^6$ Zellen/mL
Versuchsdauer: 3 h
 \varnothing Zelldurchmesser: 12,6 μm

(B) Zelldichte: $2,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL
Versuchsdauer: 46 h
 \varnothing Zelldurchmesser: 12,9 μm

(C) Zelldichte: $4,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL
Versuchsdauer: 57 h
 \varnothing Zelldurchmesser: 13,1 μm



(D) Zelldichte: $9,1 \cdot 10^6$ Zellen/mL
Versuchsdauer: 80 h
 \varnothing Zelldurchmesser: 13,1 μm

(E) Zelldichte: $12,8 \cdot 10^6$ Zellen/mL
Versuchsdauer: 96 h
 \varnothing Zelldurchmesser: 13,2 μm
(Viabilität: ~99 %)

(F) Zelldichte: $16,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL
Versuchsdauer: 144 h
 \varnothing Zelldurchmesser: 10,7 μm
(Viabilität: ~20 %)

Abb. 36: Aufnahmen des integrierten *at-line* Mikroskops von CHO-K1 Zellen im Laufe einer Batch-Kultivierung.

(20-fache Vergrößerung, gezeigte Fläche: 0,438 mm²).

Neben der Bestimmung der Zelldichte ermöglicht der Einsatz des *at-line* Mikroskops zusätzlich den Erhalt von Prozessinformationen über die Zellmorphologie und die Zellgrößenverteilung [234]. Morphologische Unterschiede lebender und toter Zellen können beim Vergleich der Aufnahmen bei hoher Viabilität (Abb. 36A-E) und während der Absterbephase (Abb. 36F) deutlich beobachtet werden. In der Literatur wird beschrieben, dass bei apoptotischen Zellen häufig eine Abnahme des Zellvolumens eintritt [263]. Der durchschnittliche Zelldurchmesser wurde während der Batch-Kultivierung mithilfe eines Durchflusszytometers bestimmt (für Details siehe Kapitel 3.13.4). Im Kultivierungszeitraum von 0 bis 96 h (Zeitpunkt der Glukoselimitierung, siehe 4.3.1.3)

konnte ein kontinuierlich zunehmender, durchschnittlicher Zelldurchmesser von 12,6 bis 13,2 μm bestimmt werden. Im Vergleich dazu lag der Zelldurchmesser bei apoptotischen Zellen (nach 144 h, 20 % Viabilität) nur noch bei durchschnittlich 10,7 μm . Bis zum Erreichen dieses Wertes wurde ein stetiger Rückgang des durchschnittlichen Zelldurchmessers ab Beginn der Glukoselimitierung (96 h) verzeichnet. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Zellgröße in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen zu ändern scheint. Bei Verwendung geeigneter Software für die Bildauswertung zur Bestimmung des durchschnittlichen Zelldurchmessers, könnte mittels *at-line* Mikroskopie zukünftig auch eine Überwachung der Zellviabilität ermöglicht werden [234].

4.3.1.3 Substratverbrauch und Produktbildung

Der Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit an Substraten und der metabolischen Aktivität der CHO-K1 Zellen sollte durch die Messung extrazellulärer Metaboliten im Zellkulturmedium untersucht werden. Glukose und Glutamin bilden die Hauptsubstrate des Energiestoffwechsels, während Laktat als Stoffwechselprodukt primär gebildet wird. Die Überwachung dieser metabolischen Parameter sollte Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der CHO-K1 Zellen liefern. Die Substratkonzentrationen und die entsprechenden Verbrauchs- bzw. Bildungsraten in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer sind in Abbildung 37 dargestellt.

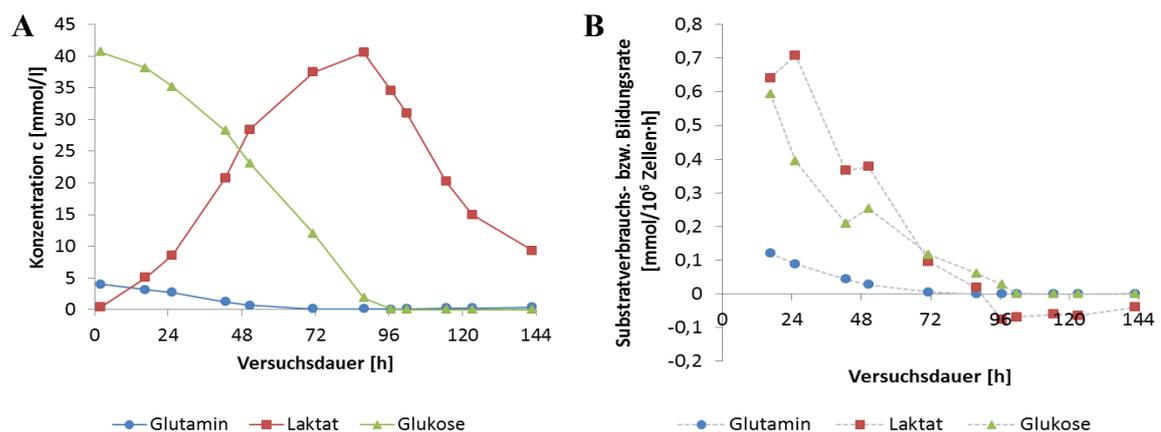


Abb. 37: Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen (A) sowie die entsprechenden Verbrauchs- und Bildungsraten (B) während der Batch-Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei separaten Batch-Kultivierungen.

Die Glukosekonzentration liegt, wie in Abbildung 37A gezeigt, zu Beginn der Kultivierung bei 40 mmol/L und wird innerhalb von 96 h nach Kultivierungsbeginn komplett verbraucht. Die Glukoseverbrauchsrate erreicht ihr Maximum zu Beginn des exponentiellen Wachstums nach circa 24 h (Abb. 37B). Der Wert beträgt dabei 0,6 mmol/10⁶ Zellen·h. Danach sinkt die Glukoseverbrauchsrate stetig ab und beträgt zum Ende der exponentiellen Phase nach 72 h nur noch 0,16 mmol/10⁶ Zellen·h. Bis 96 h fällt dieser Wert dann weiter bis auf null ab. Ab diesem Zeitpunkt setzt die Übergangsphase (stationäre Phase), die somit auf die Substratlimitierung zurückzuführen ist. Für die Konzentration und Verbrauchsrate des Glutamins zeigt sich ein ähnlicher Verlauf wie für die Glukosewerte, jedoch zeitlich etwas verkürzt (Abb. 37). Die Anfangskonzentration liegt bei 4 mmol/L, was der supplementierten Glutaminkonzentration im Medium entspricht. Die Glutaminverbrauchsrate erreicht ebenso wie die Glukoseverbrauchsrate nach 24 h ihr Maximum, mit einem Wert von 0,09 mmol/10⁶ Zellen·h. Im folgenden Verlauf sinkt die Verbrauchsrate kontinuierlich ab. Bereits nach 72 h kommt es zu einer Glutaminlimitierung im Bioreaktor. Das von den Zellen produzierte Laktat sammelt sich bis 96 h nach Beginn der Kultivierung im Medium an, sodass die Laktatkonzentration zu diesem Zeitpunkt den maximalen Wert von 40 mmol/L erreicht (Abb. 37A). Die Laktatbildungsrate steigt nach 24 h auf etwa 0,7 mmol/10⁶ Zellen·h und fällt daraufhin mit steigender Laktatkonzentration ab. Nach 96 h ist ein Rückgang der Laktatkonzentration zu verzeichnen, welche bis zum Ende der Kultivierung auf 10 mmol/L fällt. Die Laktatbildungsrate wird dementsprechend nach 96 h aufgrund des Vorzeichenwechsels zu einer Laktatverbrauchsrate. Dies ist bemerkenswert, da die Zellen aufgrund der Substratlimitierung beginnen das zuvor gebildete Laktat wieder zu verstoffwechseln. Diese Verlagerung des Stoffwechsels von der Laktatbildung hin zum Laktatkonsum ist für CHO Zellen auch in der Literatur beschrieben [103, 104, 264]. So lässt sich annehmen, dass durch die Anpassung des Stoffwechsels der Zellen und die Nutzung von Laktat als Kohlenstoffquelle auch bis zu 24 h nach Beginn der Glukoselimitierung noch eine Zunahme der Zelldichte und eine Viabilität von knapp 98 % erhalten werden konnte.

4.3.1.4 Detaillierte Analyse extrazellulärer Metaboliten mittels HPLC

Um weitere Faktoren für das effiziente Wachstum und die Stoffwechselregulation der CHO-K1 Zellen ausfindig zu machen, wurden neben der enzymatischen Bestimmung der Glukose- Glutamin- und Laktatkonzentrationen noch 20 weitere stoffwechselrelevante, extrazelluläre Metaboliten mittels HPLC gemessen: Pyruvat (Pyr), Alanin (Ala), Arginin (Arg), Asparagin (Asn), Asparaginsäure (Asp), Cystein (Cys), Glutaminsäure (Glu), Glycin (Gly), Histidin (His), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Lysin (Lys), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Prolin (Pro), Serin (Ser), Threonin (Thr), Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Valin (Val). Eine Übersicht der Messergebnisse in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit ist in Abbildung 38 dargestellt.

Anhand dieser Messergebnisse lässt sich die Batch-Kultivierung der CHO-K1 Zellen in drei wesentliche Phasen einteilen. Die Phase 1 bezeichnet den Bereich des exponentiellen Wachstums bis 72 h nach Kultivierungsbeginn. Innerhalb dieser Phase erfolgt der komplette Glutaminverbrauch, während Glutaminsäure, Alanin, Glycin und Pyruvat sekretiert werden. In den Diagrammen in Abbildung 38 ist das Ende der Phase 1 durch den grünen Balken in den Diagrammen gekennzeichnet. Die Phase 2 bezeichnet den linearen Wachstumsbereich zwischen 72 h und 96 h. Innerhalb dieses Zeitraumes findet eine Glutaminsäure- und Pyruvataufnahme der Zellen statt. Nach 96 h ist auch das zweite Hauptsubstrat, die Glukose, vollständig verbraucht (siehe Abb. 38, Bereich zwischen grünem und gelbem Balken). Die Phase 3 beginnt nach 96 h. Ab diesem Zeitpunkt setzt die Laktatwiederaufnahme ein. Das Ende dieser Phase ist nach 120 h erreicht und in den Diagrammen durch den roten Balken markiert (Abb. 38). Zu diesem Zeitpunkt wird die maximale Zelldichte mit $\sim 15 \cdot 10^6$ Zellen/mL bestimmt. Nach 120 h setzt die Sterbephase der Zellen ein. Während die Viabilität sinkt, erfolgt gleichzeitig eine Verwertung von Alanin.

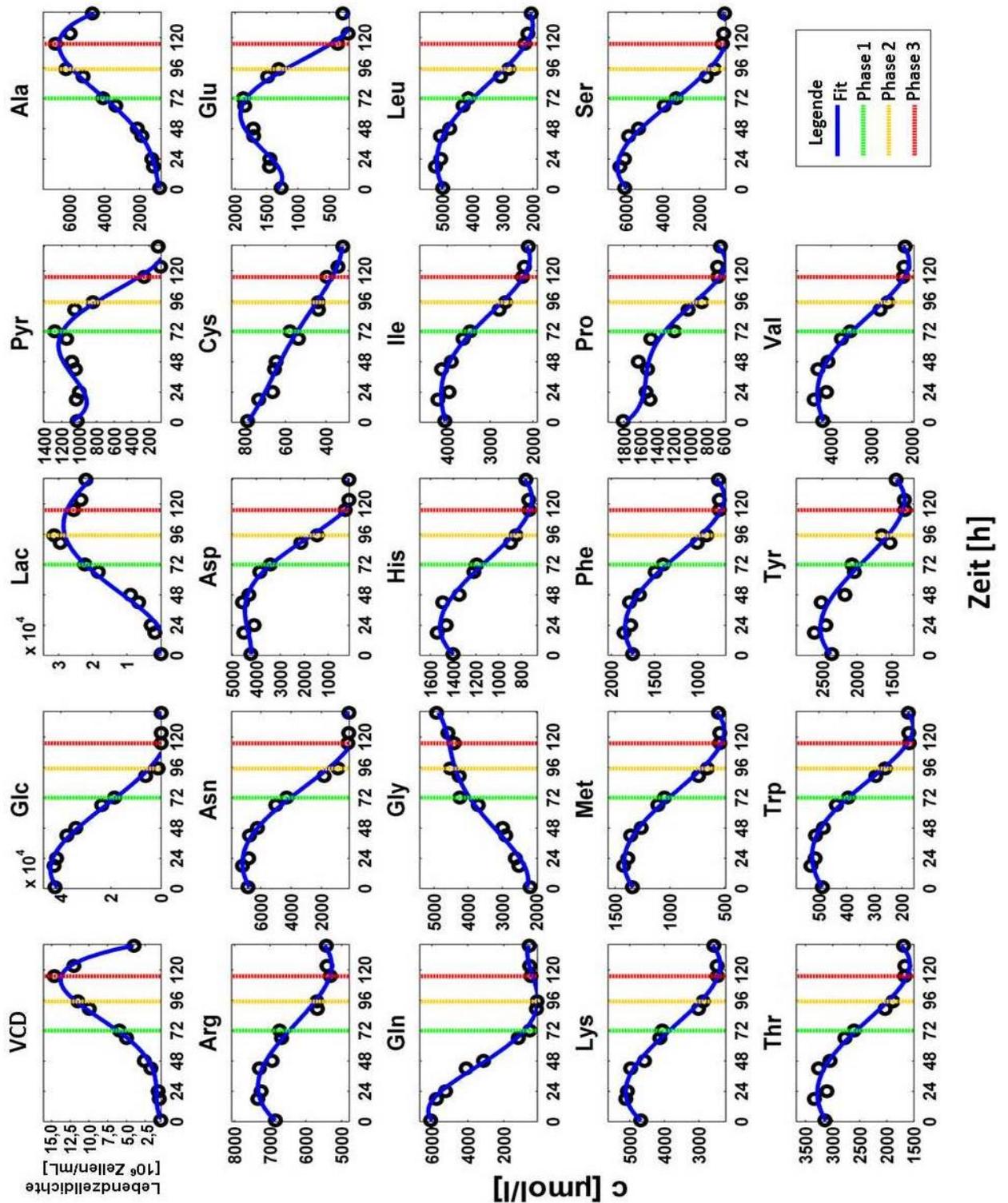


Abb. 38: Metabolitenbestimmung mittels HPLC über den Verlauf der CHO-K1 Batch-Kultivierung.

Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen gegen die Kultivierungsdauer. Anhand der erstellten Profile wurde der Kultivierungsverlauf in drei charakteristische Phasen eingeteilt, die anhand der eingezeichneten Balken (grün = Phase 1, gelb = Phase 2, rot = Phase 3) zu erkennen sind.

In der Phase 1 herrscht ein sogenannter Overflow-Metabolismus, der durch ein Überangebot an Substrat bedingt wird. Zu Beginn der Kultivierung liegen hohe Substratkonzentrationen an Glukose und Glutamin im Medium vor, um möglichst hohe Zelldichten zu erzielen und eine vorzeitige Erschöpfung der Nährstoffe zu vermeiden. Diese anfängliche Phase der Kultivierung zeichnet sich durch hohe Wachstumsraten und hohe Glykolyseraten aus. Dies führt jedoch zu einer unvollständigen Verstoffwechslung von Glukose und Glutamin, einem ineffizienten Transport von Pyruvat in die Mitochondrien und gleichzeitig zu einer Akkumulation von Laktat. Aber auch weitere Nebenprodukten wie z.B. Glycin, Alanin und Glutaminsäure werden in dieser Phase gebildet. Aufgrund der Deregulierung des Metabolismus und der ineffizienten Einbindung des Pyruvats in den TCA-Zyklus ist dessen Aktivität in dieser Phase gestört. In der Phase 2 hat sich hingegen ein Stoffwechselgleichgewicht eingestellt. Die Wachstums- und Glykolyseraten sind niedriger als in der ersten Phase. Da Glutamin als Substrat in dieser Phase bereits vollständig aufgebraucht ist, werden neben Glukose allmählich auch Pyruvat und Glutaminsäure als Kohlenstoffquellen konsumiert. In dieser Phase besteht daher eine engere Verbindung zwischen der Glykolyse und dem TCA-Zyklus. Die Phase 3 beschreibt den Erhaltungsstoffwechsel der Zellen. In dieser Phase sind nahezu alle essentiellen Nährstoffe vollständig aufgebraucht und das Zellwachstum ist stark beschränkt. Das bewirkt eine konstant bleibende Dichte viabler Zellen und eine Abnahme der Glykolyserate.

4.3.1.5 Struktur und Verteilung der Mitochondrien

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Struktur und die Verteilung von Mitochondrien keine starren Anordnungen bilden sondern sich in Abhängigkeit vom Zustand und Energiebedarf der Zelle dynamisch verändern [265, 266]. Anhand von Veränderungen der mitochondrialen Struktur und Verteilung innerhalb der Zellen könnten somit Rückschlüsse auf deren metabolische Aktivität gezogen werden. Hinsichtlich der Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus spielt die Kenntnis über den Zustand der Mitochondrien zudem auch während der Separation und für die extrazelluläre Analyse dieser Organellen eine wichtige Rolle. Für die Betrachtung der Mitochondrienstruktur und Verteilung innerhalb der CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen, wurden die Zellen zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten mittels

Paraformaldehyd fixiert, um eine intrazelluläre Färbung der Mitochondrien durchführen zu können. Für die Analyse wurden die Proben zunächst konfokalmikroskopisch visualisiert. Die während der Batchkultivierung auftretenden Strukturen und Verteilungsmuster der Mitochondrien sind in Abbildung 39 veranschaulicht. Hierbei wurde pro Wachstumsphase jeweils eine repräsentative Bildaufnahme ausgewählt.

Die Mitochondrien in den CHO-K1 Zellen, die während der exponentiellen Wachstumsphase (Overflow-Metabolismus) fixiert wurden, zeigen vorwiegend kreisförmig bis sphärische Formen, die als individuelle, kaum vernetzte Organellen erkennbar sind (Abb. 39A). Die Länge der Mitochondrien variiert dabei zwischen 0,5 bis 2 μm . Ihre Verteilung ist relativ gleichmäßig über die komplette Zelle erstreckt, allerdings lassen sich auch Bereiche unterschiedlicher Mitochondriendichte erkennen. Hierfür kann einerseits die begrenzte räumliche Verfügbarkeit (z.B. durch den Zellkern) verantwortlich sein aber andererseits auch die metabolische Aktivität der Zellen. Im Vergleich dazu zeigen die Mitochondrien in den Zellen während der linearen Wachstumsphase (ausbalancierter Metabolismus) eine sehr starke Clusterbildung (Abb. 39B). Hier können die Mitochondrien kaum als einzelne Organellen beobachtet werden sondern vielmehr als komplexe Netzwerke, die sich über die ganze Zelle erstrecken. Bei der Betrachtung des Verteilungsmusters der Mitochondrien fallen Bereiche sehr hoher Mitochondriendichte an den äußeren Zellebenen auf, wohingegen die Zelldichte zum Zellmittelpunkt hin stark abnimmt. Ein sehr ähnliches Muster zeigt sich auch für die Mitochondrien in den Zellen, die während der Absterbephase (nur noch $\sim 75\%$ Viabilität) fixiert wurden (Abb. 39C). Allerdings wirken die Mitochondrien hier noch deutlich stärker vernetzt, geschwollen und teilweise sogar fragmentiert. Das Anschwellen sowie die Fragmentierung der Mitochondrien mit Beginn der Apoptose wurden für tierische Zellen bereits in der Literatur beschrieben [267–269].

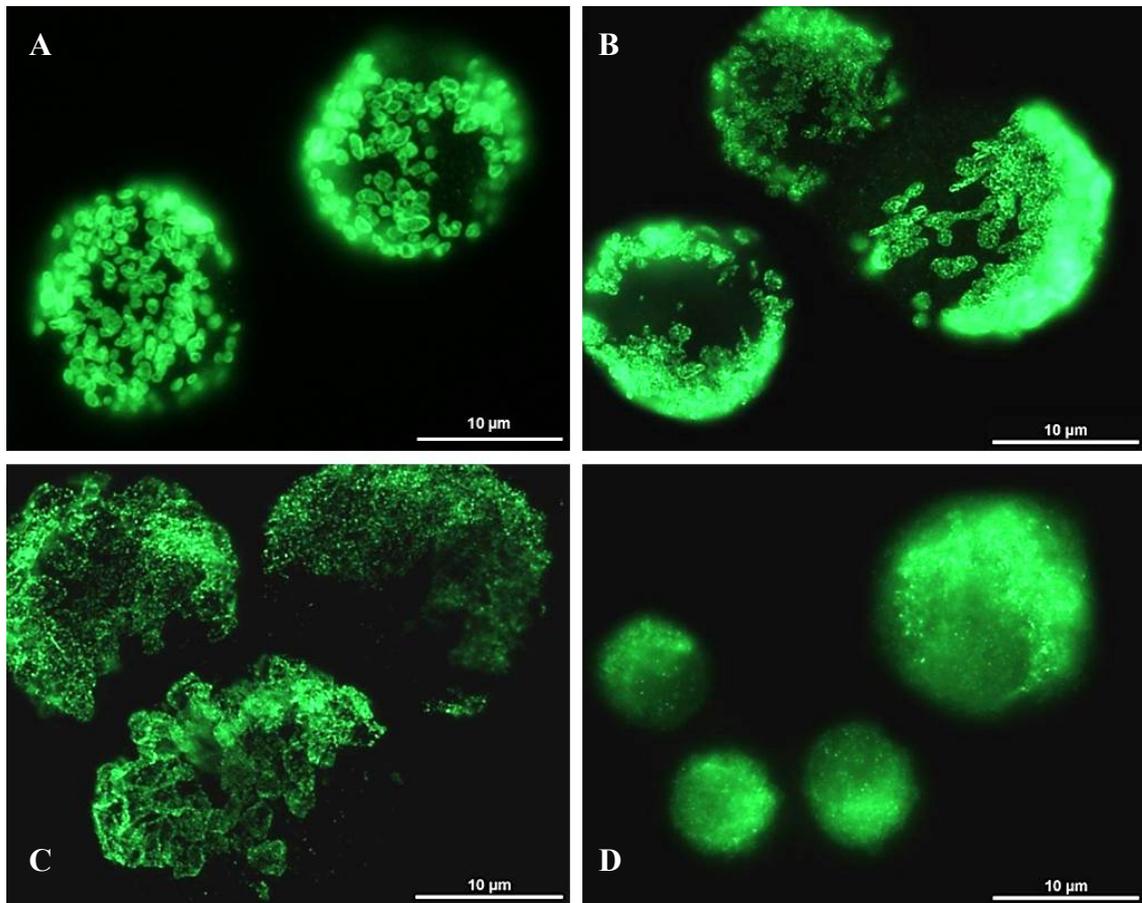


Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Struktur und Verteilung von Mitochondrien in CHO-K1 Zellen in verschiedenen Kultivierungsphasen.

Anti-Tom20 markiert, 100-fache Vergrößerung; **(A)** Während des exponentiellen Wachstums (nach 52 h Kultivierung, 99 % Viabilität), **(B)** Während des linearen Wachstums (nach 92 h Kultivierung, 98 % Viabilität), **(C)** Während der Absterbephase (nach 130 h Kultivierung, 75 % Viabilität), **(D)** Nach der Kultivierung (0 % Viabilität).

Eine vollständige Fragmentierung der Mitochondrien lässt sich in abgestorbenen Zellen am Ende der Kultivierung beobachten (Abb. 39D). Zwar können die mitochondrialen Proteine der toten Zellen noch durch die spezifischen Antikörper detektiert werden, allerdings lassen die resultierenden Fluoreszenzaufnahmen keine klaren Strukturen oder Verteilungsmuster der fragmentierten Mitochondrien erkennen. Abschließend lässt sich hinzufügen, dass innerhalb der unterschiedlichen Wachstumsphasen der CHO-K1 Mischpopulation kein Unterschied in dem Auftreten oder der Häufigkeit einzelner Verteilungsmuster der Mitochondrien festgestellt werden konnte. In jeder Zelle traten unterschiedliche Formen und Größen von Mitochondrien auf, die offenbar in Abhängigkeit vom Kultivierungsverlauf unterschiedlich stark miteinander vernetzt vorlagen.

4.3.1.6 Abbildung mitochondrialer Proteine mittels STED-Mikroskopie

Bislang existieren keine veröffentlichten Ergebnisse zu Untersuchungen der Verteilung mitochondrialer Proteine in CHO Suspensionszellen. Durch die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden die Mitochondrien innerhalb der CHO-K1 Zellen mit einer Auflösung von etwa 230 nm visualisiert, wodurch die intrazelluläre Mitochondrienverteilung verfolgt werden konnte. Für eine detaillierte Analyse der mitochondrialen Strukturen und der Verteilung mitochondrialer Proteine stößt diese Methode jedoch an ihre Grenzen. Um die Verteilung der mitochondrialen Proteine Tom20, PDH und OGDH in Abhängigkeit der Wachstumsphasen untersuchen zu können, wurden die PFA-fixierten CHO-K1 Zellen zusätzlich am Max-Planck-Institut Göttingen (AK Jakobs) mittels hochauflösender Stimulated Emission Depletion (STED) Mikroskopie analysiert. Die STED-Mikroskopie ist die erste Methode, die eine Abbildung von Proteinverteilungen innerhalb der Mitochondrien durch eine Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze von 50 bis zu 25 nm ermöglicht [161, 246, 270]. Als Beispiel für die Auflösungssteigerung durch die STED-Methode im Vergleich zu herkömmlicher konfokaler Mikroskopie wurden isolierte Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen mittels spezifischer anti-Tom20 Antikörper markiert und entsprechend durch einen sekundären, rotfluoreszierenden Antikörper visualisiert. In Abbildung 40 ist der identische Bildausschnitt (5 x 5 μm) einmal als konfokalmikroskopische Maximalprojektion (A) und als Ergebnis der STED-Mikroskopie (B) dargestellt.

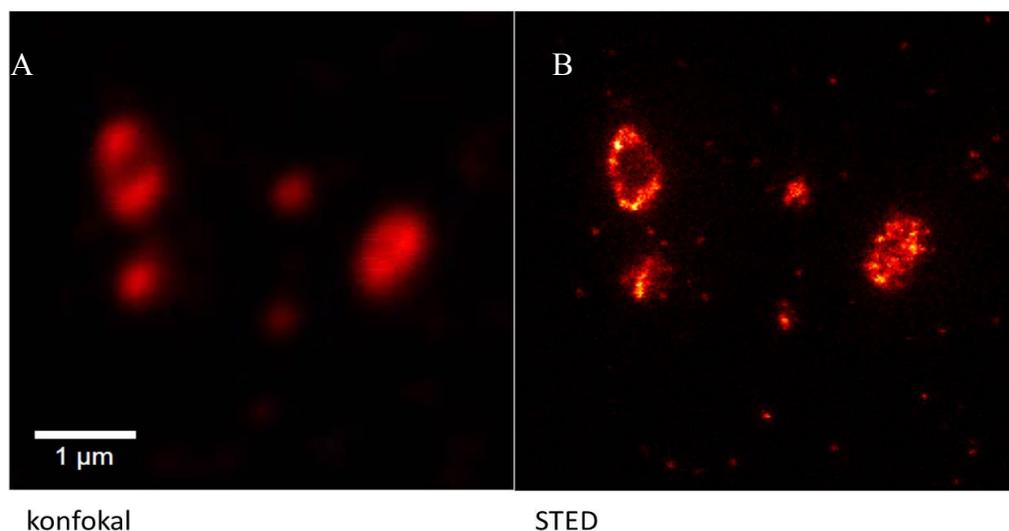


Abb. 40: Konfokale und STED-mikroskopische Aufnahme isolierter Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen.

Während die isolierten Mitochondrien auf dem Bild im herkömmlichen konfokalen Modus nur unscharf zu erkennen sind (Abb. 40A), können im STED-Vergleichsbild feine, hochaufgelöste Strukturen der Mitochondrien detektiert werden (Abb. 40B). Entsprechende Aufnahmen wurden ebenfalls nach Markierung der mitochondrialen Proteine PDH und OGDH durch ihre korrespondierenden Antikörper gemacht (Ergebnisse sind aufgrund der Übersichtlichkeit nicht gezeigt). Durch geeignete Datenanalysen nach Wurm et al. [161] wurde die Verteilung der Proteincluster von Tom20, PDH und OGDH in jeweils 30 Proben bestimmt. Hierbei konnten für die Mitochondrien aus CHO-K1 Zellen im Mittel ~ 113 Tom20-Cluster/ μm^2 , ~ 101 PDH-Cluster/ μm^2 und ~ 92 OGDH-Cluster/ μm^2 detektiert werden. Die Dichte der Proteincluster variiert von Zelltyp zu Zelltyp und kann ebenfalls von den Kultivierungsbedingungen abhängen [161], so dass die erhaltenen Ergebnisse keine Absolutwerte darstellen.

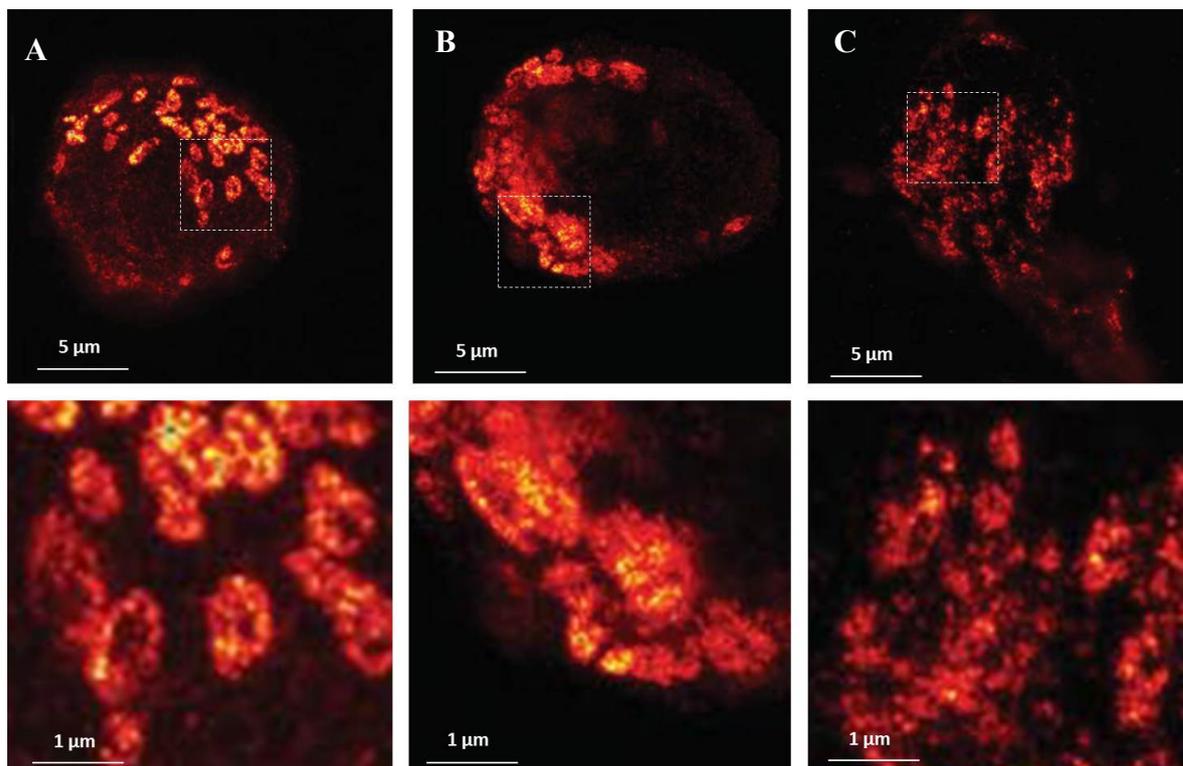


Abb. 41: STED-mikroskopische Aufnahmen PDH-markierter Mitochondrien in CHO-K1 Zellen.

(A) Zellproben während der exponentiellen Wachstumsphase (52 h), (B) Zellproben während des linearen Wachstums (92 h), (C) Zellproben während der Absterbephase (130 h).

Um die Veränderung der Clusterdichte in Abhängigkeit der Wachstumsphasen der CHO-K1 Zellen zu untersuchen, wurden die Mitochondrien nach 52 h, 92 h und 130 h Kultivierungsdauer (entsprechend Kapitel 4.3.1.5) intrazellulär markiert und mittels STED-Mikroskopie visualisiert. Repräsentative Aufnahmen der Zellen nach PDH-Markierung der Mitochondrien sind in Abbildung 41 gezeigt. Hierbei sind jeweils die Übersicht einer vollständigen Zelle (obere Bildreihe) und eine entsprechende Maximalprojektion des analysierten Bereichs der Mitochondrien (untere Bildreihe) gezeigt.

Um die Abweichungen in der Verteilung dieser Proteincluster zu bestimmen, wurde die normierte Varianz des Fluoreszenzsignals innerhalb der markierten Mitochondrien analysiert. Die normierte Varianz des Fluoreszenzsignals gilt als empfindliches Maß für die Bestimmung der Unterschiede zwischen den Proteinverteilungen. Solche normierten Varianzwerte spiegeln mehrere physikalische Parameter wider, wie beispielsweise die Verteilung und Größe des Proteinclusters oder das Verhältnis des Hintergrunds von Cluster zu Mitochondrium [161]. Hierbei gilt, dass dichte Proteincluster niedrige Varianzwerte bedingen, während Cluster mit geringer Proteindichte in hohen Varianzwerten resultieren. Eine Übersicht über die Datenanalyse ist Kapitel 3.15.3 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Datenanalyse zur Bestimmung der Varianzwerte sind in Abbildung 42 dargestellt.

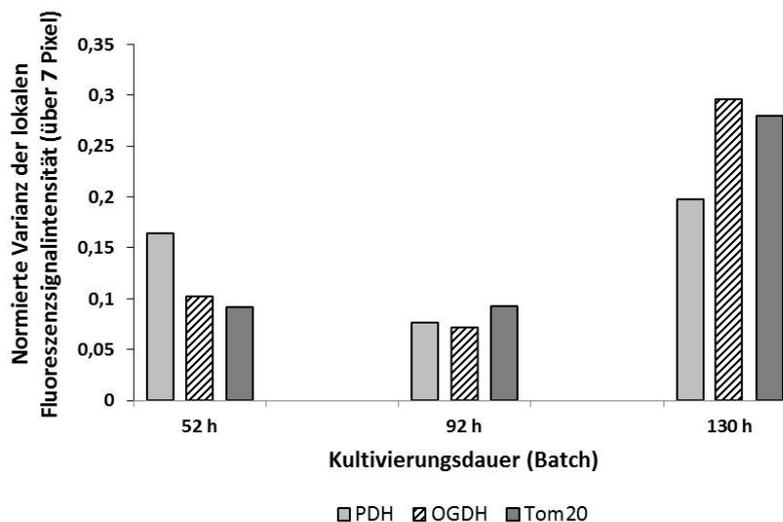


Abb. 42: Bestimmung der Verteilung von PDH-, OGDH- und Tom20-Clustern in CHO-K1 Zellen.

Dargestellt ist die normierte Varianz der lokalen Fluoreszenzsignalintensität der Mitochondrien in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. 30 Zellen pro Protein und Kultivierungszeitpunkt wurden mittels STED-Mikroskopie visualisiert und analysiert.

Beim Vergleich der Varianzen lässt sich für die drei untersuchten Proteine eine signifikante Erhöhung der Werte nach einer Kultivierungsdauer von 130 h feststellen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen in der Absterbephase, wobei die Viabilität bereits auf 75 % gesunken war. Hier wurden normierte Varianzwerte von 0,2, 0,3 und 0,28 für die PDH-, OGDH-, bzw. Tom20-Clusterverteilung bestimmt (Abb. 42). Die Zunahme der Varianzwerte spricht für eine Abnahme der Proteinclusterdichte. Die Clusterdichte der mitochondrialen Proteine wird maßgeblich von der Aktivität der Mitochondrien beeinflusst [161], so dass die hier beobachtete Abnahme der Dichte auf eine gesenkte mitochondriale Aktivität in der Absterbephase der Zellen zurückzuführen sein könnte. Zusätzlich könnte auch die Degradation der Proteine mit Beginn der Apoptose in einer Abnahme der Clusterdichte resultieren.

Im Vergleich dazu liegen die normierten Varianzen bei den Proben während der exponentiellen Wachstumsphase (52 h) bei 0,16, 0,1 und 0,09 für die Verteilung der PDH-, OGDH-, bzw. Tom20-Cluster und während des linearen Wachstums (92 h) in einem engen Bereich zwischen 0,07 und 0,09. Diese Werte lassen auf eine höhere Dichte der Proteincluster während des exponentiellen und linearen Zellwachstums im Vergleich zur Absterbephase schließen. Hierbei fällt jedoch der Varianzwert für die PDH-Verteilung auf, der während der exponentiellen Phase doppelt so hoch ist wie der Wert während des linearen Wachstums. Diese Beobachtung lässt auf eine niedrigere PDH-Dichte während der exponentiellen Phase schließen und könnte auch in einer geringeren PDH-Aktivität resultieren. Diese These lässt sich durch vorherige Ergebnisse bestätigen. So konnte die Analyse der extrazellulären Metaboliten (Abb. 38) zeigen, dass während der exponentiellen Wachstumsphase der CHO-K1 Zellen eine Anhäufung von Pyruvat bis zu einer Kultivierungsdauer von etwa 72 h stattfindet, was auf eine mangelnde dehydrierende Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetyl-CoA durch die Pyruvatdehydrogenase zurückzuführen ist. In der Literatur wird ebenfalls beschrieben, dass bei tierischen Zellkulturen der Übergang der glykolytischen Intermediate in den TCA-Zyklus aufgrund fehlender Aktivität der entsprechenden Verbindungsenzyme PDH, Pyruvat-Carboxylase (PC) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) unterbunden ist und somit eine Deregulierung des Stoffwechsels während des exponentiellen Wachstums bedingt wird [45, 99, 271].

Die hier erhaltenen Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass die Verteilung mitochondrialer Proteine während eines Kultivierungsverlaufs variiert und sich der metabolischen Aktivität der Zellen dynamisch anpasst.

4.3.1.7 Bestimmung des mitochondrialen Enzymlevels mittels In-Cell ELISA

Durch die Messung der extrazellulären Metaboliten sowie die Bestimmung der Dichte mitochondrialer Proteincluster konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivität von Mitochondrien im Laufe der Kultivierung an verschiedene zelluläre Bedingungen und Ansprüche (z.B. den Energiebedarf) anpasst. Diese Adaption wird durch die Regulation mitochondrialer Enzymaktivitäten ermöglicht und spiegelt sich in der Dynamik der metabolischen Reaktionen innerhalb der Zellen wider. Dabei wurde gezeigt, dass kurzzeitige Veränderungen des Energiebedarfs ohne eine Modifizierung des mitochondrialen Proteingehalts ablaufen können. Bei dauerhaften Veränderungen der Kultivierungsbedingungen wurde hingegen eine Veränderung des Gehalts mitochondrialer Proteine oder des Phosphorylierungsgrades beobachtet [176]. Um die Regulation des mitochondrialen Enzymes PDH und dessen Phosphorylierungsgrad sowie den Gehalt von OGDH direkt innerhalb der CHO-K1 Zellen bestimmen zu können, wurde die quantitative Methode des In-Cell ELISA verwendet. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass für die Bestimmung des Proteinlevels die jeweilige Zellprobe nicht homogenisiert und das Zielprotein nicht speziell extrahiert werden muss. Hierdurch wird ein Proteinverlust oder ein proteolytischer Abbau durch vorherige Probenverarbeitungsschritte vermieden. Die intrazelluläre Bestimmung des relativen Proteingehalts ermöglicht somit die direkte Überwachung zellulärer Veränderungen und Regulationen *in vitro*.

Für den In-Cell ELISA wurden die CHO-K1 Zellen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten fixiert und die Enzyme PDH und OGDH anschließend mittels spezifischer Immundetektion markiert und photometrisch detektiert. Für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der PDH wurde einerseits die komplette E1 α -Einheit und parallel dazu die Phosphorylierung der E1 α -Serinreste Ser232, Ser293 sowie Ser300 mittels spezifischer Antikörper markiert. Ein detailliertes Protokoll der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 3.16 beschrieben. Die Ergebnisse der In-Cell ELISA Messungen für die Proben der Batchkultivierung sind in Abbildung 43 und 44 zusammengefasst.

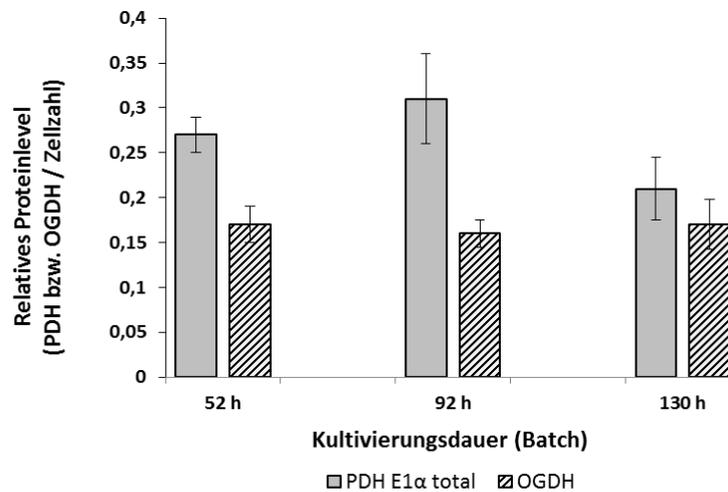


Abb. 43: Bestimmung des Proteinlevels von PDH und OGDH in CHO-K1 Zellen.

Dargestellt ist das relative Proteinlevel gemessen als das PDH- bzw. OGDH-Signal normiert auf die Zellzahl (Janusgrün) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte (n=3).

Durch die Normierung der gemessenen PDH- bzw. OGDH-Signale auf die Zellzahl lassen sich Unterschiede des Proteingehalts in Abhängigkeit von den jeweiligen Wachstumsphasen der CHO-K1 Zellen bestimmen. Für die Gesamtmenge an PDH (als Messung der PDH E1 α Einheit) kann im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase (52 h) eine Zunahme von 12,9 % während des linearen Wachstums (92 h) festgestellt werden (Abb. 43). Ausgehend von diesem Niveau ist das PDH-Level während der Absterbephase (130 h) hingegen um 32,2 % geringer. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Dichten der PDH-Proteincluster, die mittels STED-Mikroskopie bestimmt wurden (vergleiche Abb. 42). Auch hier wurde die höchste Dichte der PDH-Cluster während des linearen Wachstums bestimmt, während eine etwas geringere PDH-Dichte zu Beginn der Kultivierung während der exponentiellen Phase beobachtet werden konnte und eine deutliche Abnahme der PDH-Dichte während der Absterbephase zu verzeichnen war. Die In-Cell ELISA Messungen des OGDH-Levels zeigen hingegen keinen Unterschied zwischen der exponentiellen, der linearen und der Absterbephase (Abb. 43). Für diese Ergebnisse kann im Gegensatz zu den Ergebnissen der PDH-Bestimmung keine direkte Korrelation zu der Dichte der OGDH-Proteincluster gefunden werden. Mittels STED-Mikroskopie wurden hohe Dichten der OGDH-Cluster nach einer Kultivierungsdauer von 52 h und 92 h bestimmt, wohingegen nach 130 h eine deutliche Abnahme der Dichte zu

verzeichnen war. Die Betrachtung der Regulation des relativen Gehalts mitochondrialer Enzyme ermöglicht ein tieferes Verständnis der Stoffwechselaktivität und bildet die Grundlage für die Modellierung systembiologischer Zusammenhänge.

Allerdings spielt nicht nur die vorliegende Menge eines Enzyms sondern vor allem dessen Aktivität eine entscheidende Rolle für den Ablauf der von ihm katalysierten Reaktionen. Die PDH-Aktivität wird maßgeblich durch dessen Phosphorylierungszustand reguliert, wobei ihre Aktivität im dephosphorylierten Zustand am höchsten ist [272]. Abbildung 44 stellt den relativen Phosphorylierungsgrad der PDH-Serinreste in Abhängigkeit von den Kultivierungsphasen dar.

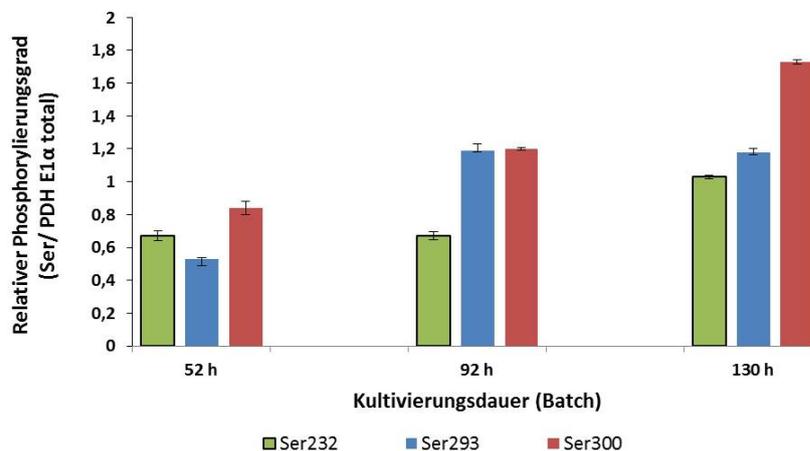


Abb. 44: Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von PDH in CHO-K1 Zellen im Verlauf der Batch-Kultivierung.

Dargestellt ist der relative Phosphorylierungsgrad gemessen als das Signal der Serinreste normiert auf das gemessene PDH-Level in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte (n=3).

Der Phosphorylierungsgrad der drei gemessenen Serinreste nimmt im Verhältnis zum gemessenen PDH-Gehalt im Laufe der Kultivierung tendenziell zu, was für eine Abnahme der PDH-Aktivität spricht. Hierbei liegen die gemessenen Werte während der Absterbephase (130 h) um etwa 42 bis 53 % über den Werten, die während des exponentiellen Wachstums (52 h) bestimmt wurden (Abb. 44). Es wurde gezeigt, dass der Grad der Phosphorylierung und somit auch die PDH-Aktivität von der Glukoseverfügbarkeit abhängt [272]. Bei hoher Glukosekonzentration ist der Grad der PDH-Phosphorylierung verhältnismäßig am geringsten, wohingegen er bei einer Glukoselimitierung ansteigt. Diese Abhängigkeit lässt sich auch für die hier gezeigten Ergebnisse beobachten.

4.3.1.8 Zusammenfassende Diskussion

Ein Ziel dieser Versuchsreihe war die systembiologische Untersuchung der Zelllinie CHO-K1 in Hinblick auf den Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf das Wachstumsverhalten und den Metabolismus. Hierfür wurden mehrere Kultivierungen im Batch-Betrieb durchgeführt. Durch die Integration eines *at-line* Mikroskops konnte parallel zu der externen Zellzählung die Gesamtzelldichte durch die zusätzliche Auswertung der Mikroskopbilder verifiziert werden. Die Bestimmung der Lebendzelldichte war hingegen mit dem Mikroskop nicht möglich. Anhand der Batch-Kultivierungen konnte einerseits ein reproduzierbares Wachstumsverhalten der Zellen gezeigt werden und andererseits konnte der Kultivierungsverlauf durch eine detaillierte Bestimmung extrazellulärer Metaboliten in verschiedene Kultivierungsphasen unterteilt werden. Durch diese Phasenprofile konnte die Veränderung des Metabolismus in Abhängigkeit von der Substratverfügbarkeit beobachtet werden. Auch bei der Betrachtung der Mitochondrienverteilung ließen sich Veränderungen in Abhängigkeit der Kultivierungsphasen beobachtet. Anhand der Ergebnisse der Metabolitenbestimmungen, der Untersuchung der Mitochondrienstrukturen sowie der submitochondrialen Verteilung zentraler Enzyme des Stoffwechsels konnte gezeigt werden, dass der Metabolismus der CHO-K1 Zellen stark von den Kultivierungsbedingungen beeinflusst wird und einen dynamischen Charakter aufweist. Die Expression, Phosphorylierung und Verteilung einiger für den Stoffwechsel essentieller mitochondrialer Proteine wurden während des Kultivierungsverlaufs reguliert, was auf eine Adaption der metabolischen Aktivität auf Proteinebene schließen lässt. Durch die Korrelationen der Kultivierungsphasen mit entsprechenden Änderungen innerhalb der Zellen kann angenommen werden, dass diese Regulationen im direkten Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von Substraten und Metaboliten stehen. Zur Betrachtung der CHO-K1 Zellen unter nahezu konstant bleibenden Bedingungen sollten diese im nächsten Schritt im kontinuierlichen Betrieb kultiviert werden.

4.3.2 Kontinuierliche Kultivierung von CHO-K1 Mischpopulationen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der kontinuierlichen Kultivierung im Bioreaktor erläutert. Der kontinuierliche Betrieb wurde durchgeführt, um das Verhalten und den Metabolismus der CHO-K1 Zellen in einer konstanten Kultivierungsumgebung („steady state“) untersuchen zu können und hierdurch Vergleichswerte für die synchronen Kultivierungen in Bezug auf die Zellzyklusphasenverteilung und Zellgrößenverteilung zu erhalten. Eine manuelle Probenahme wurde dreimal täglich durchgeführt und die Zelldichte, Viabilität, Zellgrößenverteilung und Medienzusammensetzung untersucht. Während der kontinuierlichen Phase wurden zusätzlich Proben zur Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung genommen. Außerdem wurden Zellen für die intrazelluläre Färbung der Mitochondrien und die Bestimmung des mitochondrialen Enzymgehalts fixiert. Über ein an den Bioreaktor integriertes *at-line* Mikroskop erfolgte eine permanente Überwachung der Zellsuspension. Der Versuchsaufbau, die Regelparameter und die detaillierte Durchführung der kontinuierlichen Kultivierung sind in Kapitel 3.10.9 zusammengefasst. Die gesamte Versuchsdauer betrug 266 h, wobei die ersten 69 h im Batch-Modus verliefen.

4.3.2.1 Zelldichte und Wachstumsrate

Die Zelldichte, die zusätzlich zur gewöhnlichen Zellzählung mittels Neubauerzählkammer auch über die Bildaufnahmen des integrierten *at-line* Mikroskops bestimmt wurde, sowie die Viabilität der CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung sind in Abbildung 45 dargestellt. Zu Beginn der Kultivierung lässt sich die Batch-Phase in dem gezeigten Diagramm beobachten. Der kontinuierliche Betrieb wurde nach 69 h bei einer Lebendzellendichte von $5,17 \cdot 10^6$ durch die Inbetriebnahme der Pumpen für den Zu- und Ablauf gestartet. Dieser Zeitpunkt ist in dem Diagramm in Abbildung 45 durch den grauen Balken gekennzeichnet. Damit die Zellen nicht aus dem Bioreaktor ausgewaschen werden, sollte die Verdünnungsrate D unterhalb der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} liegen. Die Pumpraten wurden daher ausgehend von einer Verdünnungsrate von 90 % der maximalen Wachstumsrate des Batch-Betriebs festgelegt. Die maximale Wachstumsrate wurde nach 24 h mit einem Wert von 0,056 1/h erreicht (siehe Abb. 46). Die Verdünnungsrate für den kontinuierlichen Betrieb wurde ausgehend von diesem Wert mit D 0,05 1/h bestimmt.

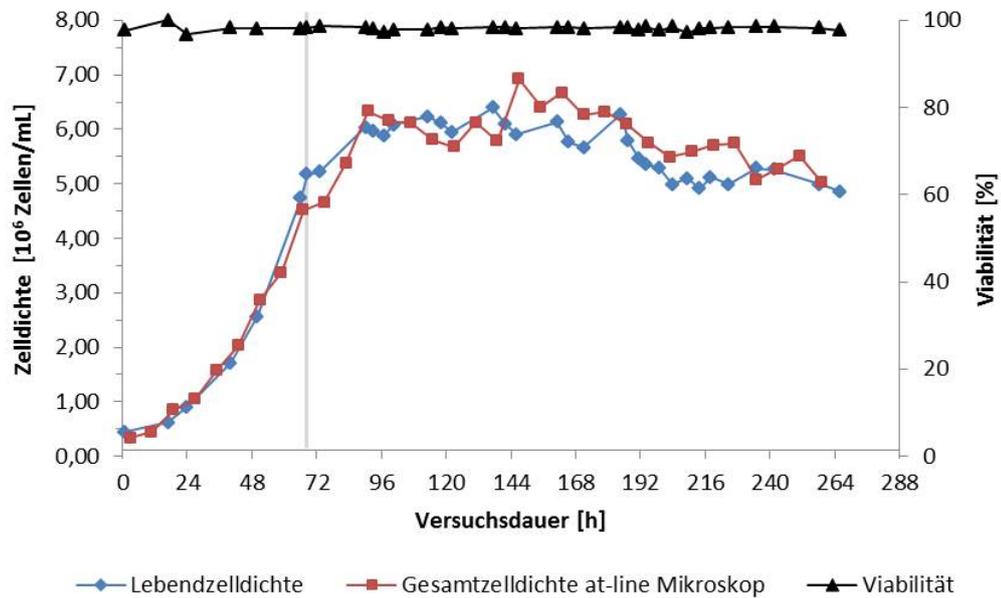


Abb. 45: Zellichte und Viabilität über den Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.

Gezeigt sind die ermittelten Zellichten mittels Neubauerzählkammer als auch mittels Bildauswertung der Aufnahmen des integrierten *at-line* Mikroskops. Der graue Balken kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Betriebs nach 69 h Kultivierung.

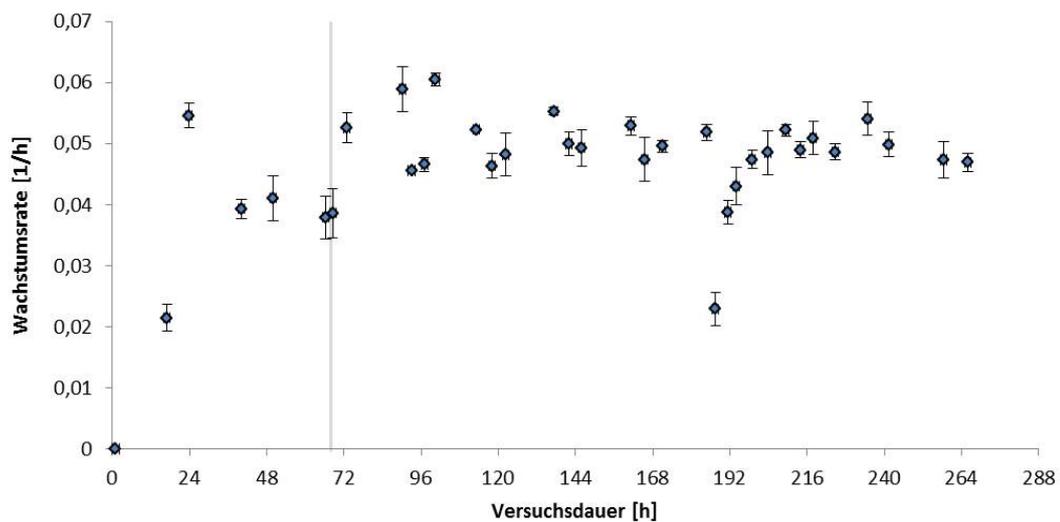


Abb. 46: Wachstumsrate über den Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung im Bioreaktor.

Die Fehlerbalken zeigen die aus der Zellzahlbestimmung (Neubauer-Zählkammer) resultierende Standardabweichung ($n=4$). Der graue Balken kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Betriebs nach 69 h Kultivierung.

Der physiologische Gleichgewichtszustand ist erreicht, wenn die Zell- und Metabolitkonzentrationen über den Kultivierungsverlauf hinweg konstant bleiben. Dieser Zustand stellt sich erfahrungsgemäß spätestens nach drei- bis fünfmaligem Austauschen des Reaktorvolumens durch frisches Medium ein [273, 274]. Für die eingestellten Pumpraten (D 0,05 1/h) nahm ein dreimaliges Austauschen des Mediums 60 h in Anspruch, sodass ab einer gesamten Kultivierungszeit von 130 h ein vollständig kontinuierlicher Betrieb angenommen werden sollte. Bis zu diesem Zeitpunkt pendelt sich die Lebendzell-dichte um $6 \pm 0,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL ein (Abb. 45) und auch die Wachstumsrate bewegt sich mit Abweichungen von maximal $\pm 0,01$ 1/h um den Sollwert von 0,05 1/h (Abb. 46). Die Verdopplungszeit in dem Zeitraum von 90 h bis 185 h wird zu $15,1 \pm 1,6$ h berechnet. Da ab 185 h eine erweiterte Probenahme für die Zellzyklusphasenverteilung begonnen wurde, kommt es zu einem verstärkten Rückgang des Kulturvolumens und daraus resultierend zu einem Anstieg der Verdünnungsrate. Dies führt in den folgenden 30 h zu einem Auswaschen der Zellen. Infolgedessen sinkt die Lebendzell-dichte im Reaktor auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL, die Wachstumsrate verzeichnet unterdessen einen Ausreißer nach unten auf 0,02 1/h und steigt erst nach einer Anpassung der Pumpraten wieder auf Werte um 0,05 1/h an. Die Lebendzell-dichte bleibt im Anschluss für die restliche Versuchsdauer konstant bei $\sim 5 \cdot 10^6$ Zellen/mL, wobei die Viabilität während des gesamten Versuches bei über 96 % liegt. Die mit dem *at-line* Mikroskop bestimmten Werte für die Gesamtzell-dichte können die durch externe Probenahmen gemessenen Zelldichten bestätigen und weisen nur geringe Abweichungen auf.

4.3.2.2 Substratverbrauch und Produktbildung

Die Substratkonzentrationen und die entsprechenden Verbrauchs- bzw. Bildungsraten in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer sind in Abbildung 47 dargestellt.

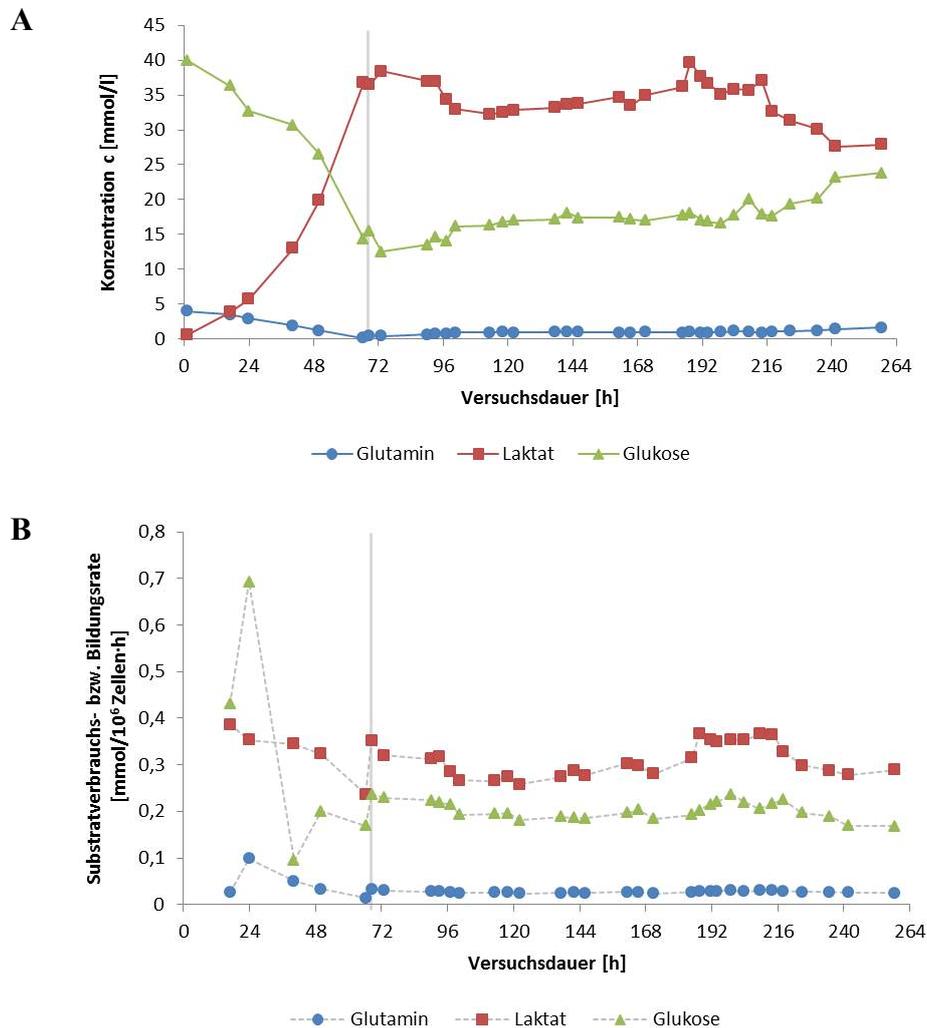


Abb. 47: Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen (A) sowie die entsprechenden Verbrauchs- und Bildungsraten (B) während der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.

Dargestellt sind die Mittelwerte der enzymatischen Konzentrationsbestimmungen ($n=4$) über den Kultivierungsverlauf. Der graue Balken kennzeichnet den Start des kontinuierlichen Betriebs nach 69 h Kultivierung.

Die Glukosekonzentration liegt anfänglich bei 40 mmol/L und sinkt während der Batch-Phase innerhalb von 69 h auf 14,5 mmol/L (Abb. 47A). Die Glukoseverbrauchsrate erreicht hier nach 24 h ihr Maximum mit 0,69 mmol/10⁶ Zellen·h. In der kontinuierlichen Phase stabilisiert sich die Glukosekonzentration nach 120 h bei einem durchschnittlichen Wert von 17 mmol/L und bleibt bis etwa 220 h nach Kultivierungsbeginn konstant. Analog hierzu pendelt sich die Glukoseverbrauchsrate im gleichen Zeitraum bei 0,19 mmol/10⁶ Zellen·h ein, sodass hier tatsächlich von einem kontinuierlichen Betrieb

ausgegangen werden kann. Gegen Ende der Kultivierung ist jedoch ein Anstieg der Glukosekonzentration bis auf 23 mmol/L zu beobachten, welcher durch das erhöhte Probenahmenvolumen und das hieraus resultierende Auswaschen der Zellen bedingt ist.

Für die Glutaminkonzentration und -verbrauchsrate (Abb. 47B) zeigt sich ein sehr ähnlicher Verlauf wie für die Glukose. So kommt es während des Batch-Betriebs zu einer raschen Verstoffwechselung von einem Großteil des Glutamins. Die Konzentration sinkt innerhalb der 69 h von 4 mmol/L auf 0,2 mmol/L. Durch das Starten des Medienzulaufes ab diesem Zeitpunkt wird eine Limitierung des Glutamins somit verhindert. Die Glutaminverbrauchsrate erreicht ihren maximalen Wert von 0,1 mmol/10⁶ Zellen·h analog zu der Glukoseverbrauchsrate nach 24 h. Mit Beginn der kontinuierlichen Phase steigt die Glutaminkonzentration bis 120 h auf 1,0 mmol/L an und bleibt im folgenden Verlauf konstant. Gleiches gilt für die Glutaminverbrauchsrate, die einen konstanten Wert von 0,025 mmol/10⁶ Zellen·h annimmt. Allerdings ist auch für die Glutaminkonzentration das Auswaschen der Zellen aufgrund der vermehrten Probenahmen zu beobachten, was ab dem Kultivierungszeitpunkt von 185 h bis zum Ende der Kultivierung (266 h) einen kontinuierlichen Anstieg der Konzentration auf 1,6 mmol/L bewirkt.

Die Laktatkonzentration steigt innerhalb der Batch-Phase von 0,6 mmol/L bis auf 37 mmol/L an und sinkt mit Beginn des Medienzulaufs (ab 69 h) auf einen Wert von 33 mmol/L, welcher bis 180 h nach Kultivierungsbeginn nahezu konstant bleibt (Abb. 47A). Die Laktatbildungsrate erreicht ihr Maximum während des Batch-Betriebs nach 17 h mit einem Wert von 0,39 mmol/10⁶ Zellen·h und pendelt sich dann bei 0,28 mmol/10⁶ Zellen·h ein. In dem Zeitraum nach 185 h ist ein leichter Anstieg der Laktatkonzentration bis auf 37 mmol/L zu beobachten. Aufgrund der vermehrten Probenahme und der daraus resultierenden erhöhten Verdünnungsrate sinkt dieser Wert ab 185 h bis zum Ende der Kultivierung kontinuierlich auf 28 mmol/L ab. Korrelierend dazu steigt die Laktatbildungsrate ab Beginn der kontinuierlichen Phase bis 185 h auf 0,36 mmol/10⁶ Zellen·h an, und fällt zum Ende der Kultivierung auf 0,28 mmol/10⁶ Zellen·h ab. Die Werte der Laktatkonzentration verlaufen dabei entgegengesetzt proportional zu den Werten der gemessenen Glukosekonzentration, wie in Abbildung 47A veranschaulicht ist. Je höher die Verdünnungsrate bzw. der Auswaschungseffekt während des kontinuierlichen Betriebs ist, desto höher ist die Glukosekonzentration und folglich niedriger die Laktatkonzentration.

Da für den Zeitraum zwischen 100 bis 185 h nahezu konstant bleibende Werte für die Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen bestimmt werden konnten, lässt sich für diesen Bereich ein herrschender Gleichgewichtszustand („steady state“) annehmen. Diese Beobachtung sollte durch die detaillierte Analyse extrazellulärer Metaboliten im Folgenden geprüft werden.

4.3.2.3 Detaillierte Analyse extrazellulärer Metaboliten mittels HPLC

Entsprechend der Analysen der Batch-Kulturen wurden für die kontinuierliche Kultivierung der CHO-K1 Zellen neben der enzymatischen Bestimmung der Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen noch 20 weitere stoffwechselrelevante, extrazelluläre Metaboliten mittels HPLC gemessen (siehe Kapitel 3.13.6). Eine Übersicht der Messergebnisse in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer ist in Abbildung 48 dargestellt. Der Beginn der kontinuierlichen Phase ist in den gezeigten Diagrammen durch den grauen Balken gekennzeichnet. Ähnlich zu den enzymatischen Messergebnissen der Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen können im Zeitraum zwischen 100 bis 185 h nahezu konstant bleibende Werte für die gemessenen Metaboliten bestimmt werden, so dass für diesen Bereich ein herrschender Gleichgewichtszustand („steady state“) angenommen werden kann. Ausnahmen bilden hierbei Pyruvat, Prolin und die Asparaginsäure, deren Messergebnisse eine deutliche Konzentrationserhöhung innerhalb dieses Zeitraums aufzeigen. Da sich die CHO-K1 Zellen während des kontinuierlichen Betriebs dauerhaft im exponentiellen Wachstum befinden, könnte die vermehrte Anhäufung dieser Metaboliten auf den deregulierten Metabolismus der Zellen zurückzuführen sein.

Die Erhöhung der Verdünnungsrate aufgrund der vermehrten Reduktion des Kulturvolumens kann durch die sprunghafte Konzentrationsabnahme der gemessenen Metaboliten ab einer Kultivierungszeit von 185 h beobachtet werden.

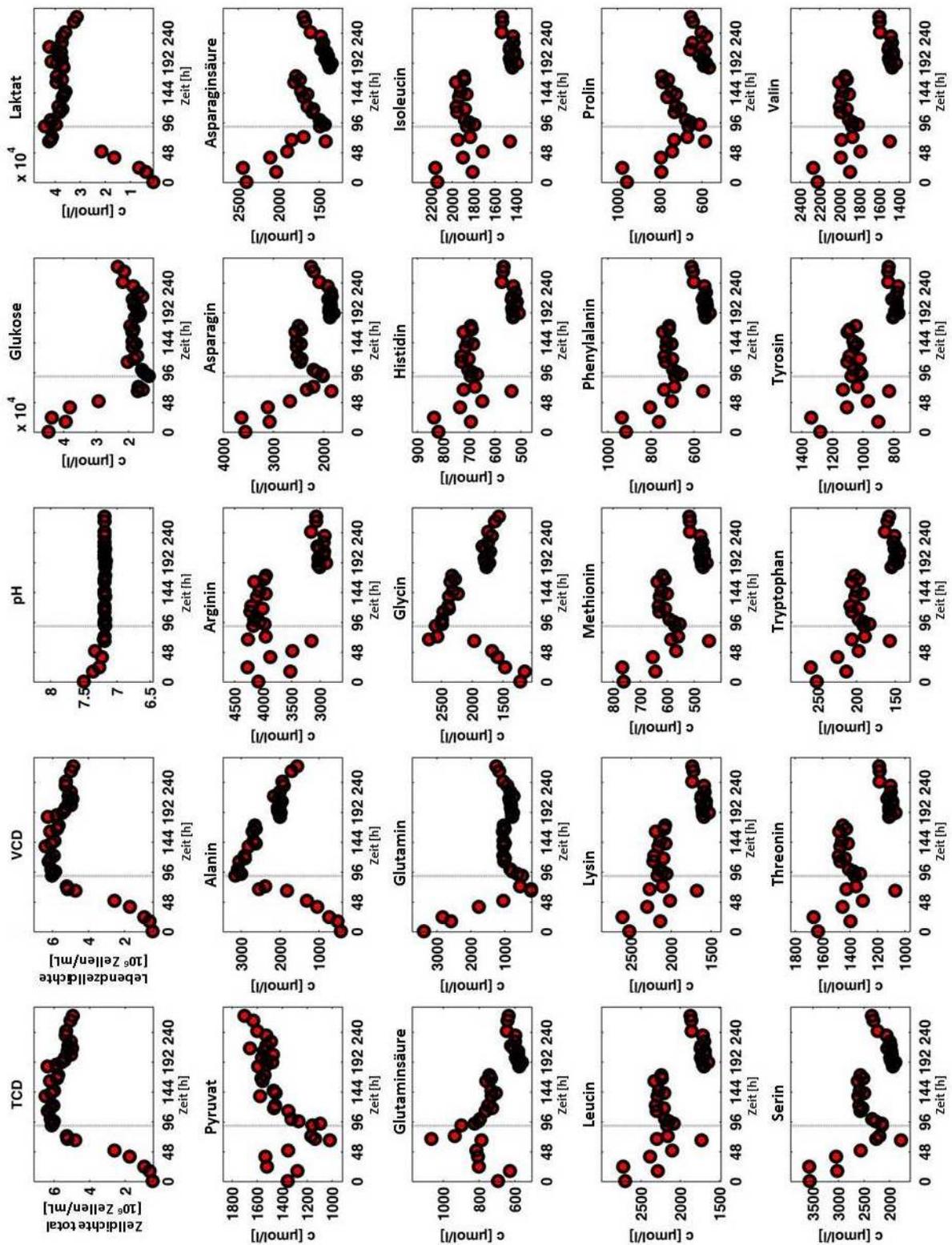


Abb. 48: Metabolitenbestimmung mittels HPLC über den Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung von CHO-K1 Zellen.

Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen gegen die Kultivierungsdauer. Der Beginn der kontinuierlichen Phase ist durch den grauen Balken gekennzeichnet.

4.3.2.4 Zellzyklusanalyse

Während der kontinuierlichen Phase wurden von insgesamt neun CHO-K1 Proben Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Messergebnisse sollten als Referenzwerte einer unsynchronen Mischpopulation dienen und dessen typischen Verlauf der Zellzyklusphasenverteilung über mehrere Stunden zeigen. Die Proben wurden ab einer Versuchsdauer von 152 h in unterschiedlichen Zeitabständen genommen. Die Ergebnisse in Abbildung 49 zeigen die jeweiligen prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen über die Versuchsdauer.

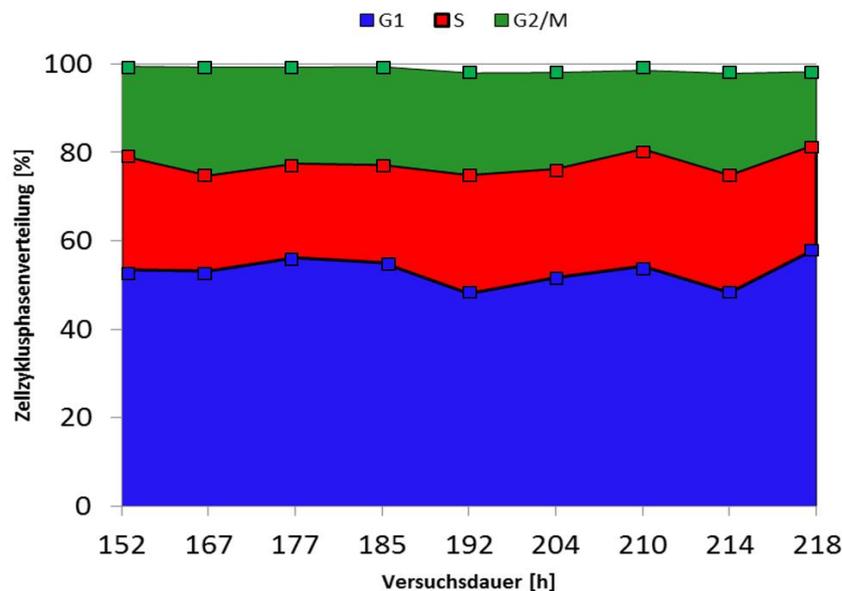


Abb. 49: Zellzyklusphasenverteilung der CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.

Über den Kultivierungsverlauf von insgesamt 66 h befinden sich durchgehend 50 bis 57 % der Zellen in der G1-Phase. Die prozentualen Anteile der S-Phase und der G2/M-Phase unterscheiden sich hingegen kaum voneinander. Die Zellen der S-Phase nehmen 21 bis 25 % ein, die der G2/M-Phase 18 bis 23 %. Über den analysierten Zeitraum können keine signifikanten Schwankungen in der Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich in der exponentiellen Wachstumsphase, die während der kontinuierlichen Kultivierung vorliegt, eine nahezu konstante Verteilung der Zellzyklusphasen für eine unsynchrone Zellpopulation einstellt.

4.3.2.5 Zellgrößenverteilung

Da sich die Zellgröße vor der Zellteilung verdoppelt, lässt sich theoretisch anhand der Verteilung der Zellgrößen in einer Population auf den Verlauf des Zellzyklus rückschließen [275]. Neben dieser Abhängigkeit wird auch ein Zusammenhang zwischen der Zellgröße und der metabolischen Aktivität tiersicher Zellen beschrieben [275, 276]. Als zweiter Parameter für die Zellzyklusphasenverteilung der Zellpopulation sowie zur Überprüfung der Homogenität der Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung sollte daher die Bestimmung der Zellgrößenverteilung erfolgen. Für die Auswertung wurden die Daten von Zellproben verwendet, die sowohl während der Batch-Phase, als auch aus dem späteren kontinuierlichen Betrieb genommen wurden. Die Ergebnisse der Zellgrößenverteilung in Abhängigkeit vom Kultivierungsverlauf sind in den Abbildungen 50 und 51 gezeigt. Einerseits ist hier die Auftragung der Verteilungsdichte gegenüber dem Zelldurchmesser dargestellt (Abb. 50). Hierfür wurden die Verteilungsdichten gemittelt, um eine vergleichbare Skalierung der Daten gewährleisten zu können. Andererseits ist der mittlere Zelldurchmesser über die Kultivierungsdauer aufgetragen (Abb. 51).

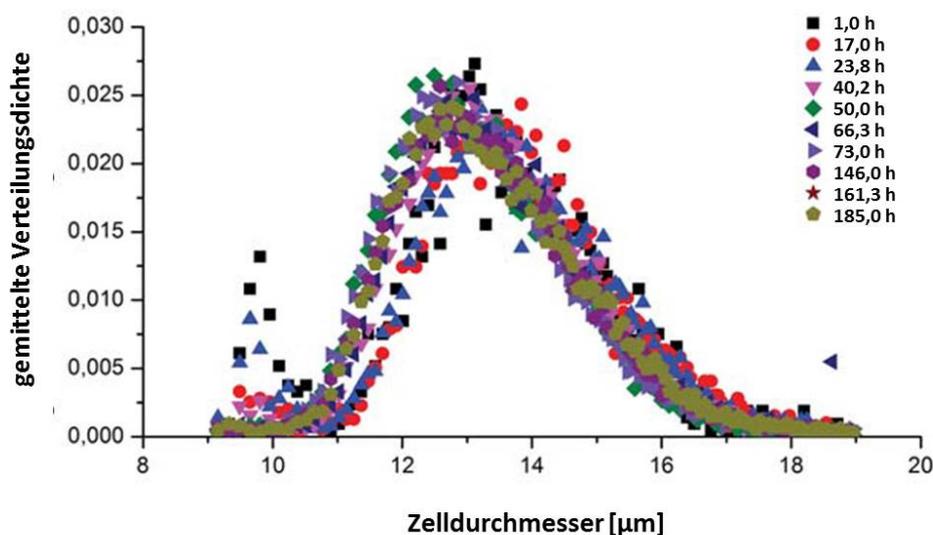


Abb. 50: Gemittelte Verteilungsdichte des CHO-K1 Zelldurchmessers während der Batch-Phase und der kontinuierlichen Kultivierung im Vario 1000 Bioreaktor.

Bei Betrachtung der gemittelten Verteilungsdichten der analysierten Proben (Abb. 50) zeigt sich ein homogenes Bild, bei dem sich die Verteilungsdichten zum größten Teil überlagern. Die Durchmesser der Zellen bilden eine leicht nach rechts verlängerte Glockenkurve mit Werten zwischen 9,5 bis 18,5 μm . Die am häufigsten auftretenden Zelldurchmesser liegen bei 13 μm . Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kultivierungsphasen lässt sich nicht ausmachen. Lediglich für die ersten drei Kultivierungszeitpunkte (nach 1 h, 17 h und 23,8 h) lassen sich eine erhöhte Verteilungsdichte der detektieren Zelldurchmesser im Bereich von 10 μm und gleichzeitig eine Verschiebung des Verteilungsmaximums auf etwa 14 μm beobachten. Da sich die Zellen zu diesen Zeitpunkten in der Lag-Phase der Kultivierung befanden, lässt sich vermuten, dass die Adaption der Zellen an die Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf die Zellgrößenverteilung hat. Für die Charakterisierung von Veränderungen der Zellgrößenverteilung während des Kultivierungsverlaufs wurden aus den Histogramm-daten die mittleren Zelldurchmesser berechnet.

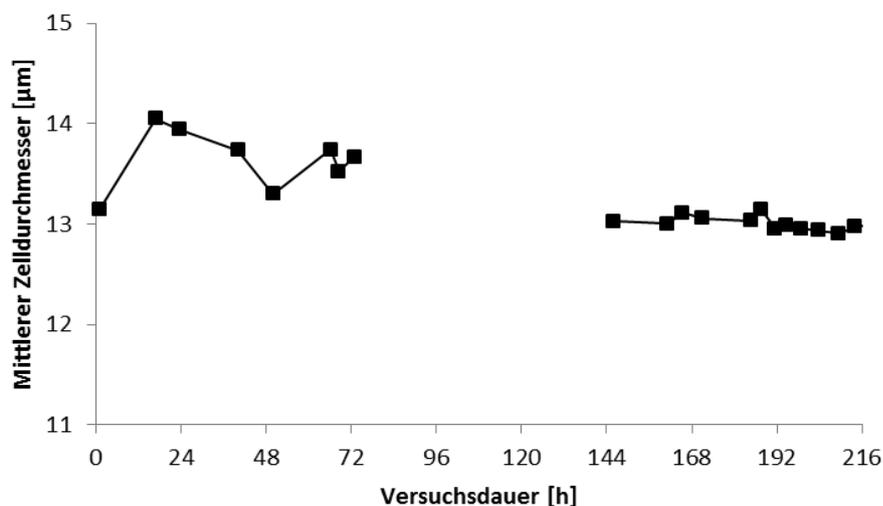


Abb. 51: Mittlerer Durchmesser während der Batch-Phase (bis 72 h) und der kontinuierlichen Kultivierung (ab 144 h) im Vario 1000 Bioreaktor.

Die mittleren Durchmesser der CHO-K1 Zellen schwanken zu Beginn der Kultivierung (0 bis 72 h) im Bereich zwischen 13 bis 14 μm (Abb. 51). Im kontinuierlichen Verlauf (ab 144 h) werden hingegen gleichbleibende durchschnittliche Zelldurchmesser von $13 \pm 0,16 \mu\text{m}$ beobachtet, was die Homogenität der Verteilungsdichte über den kontinuierlichen Kultivierungsverlauf bestätigt.

4.3.2.6 Struktur und Verteilung der Mitochondrien

Analog zur Untersuchung der Struktur und Verteilung der Mitochondrien über den Verlauf der Batch-Kultivierung (siehe Kapitel 4.3.1.5), wurden Proben der CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Phase entsprechend präpariert und mikroskopisch analysiert. Durch diese Analysen sollten Kenntnisse über die Homogenität der Mitochondrienmorphologie unter konstant gehaltenen Kultivierungsbedingungen gewonnen werden. Gleichzeitig sollten die erhaltenen Ergebnisse als Referenzwerte für den Vergleich mit Zellen während der Batch-Kultivierung sowie in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen dienen. Die während der kontinuierlichen Phase auftretenden Strukturen und Verteilungsmuster der Mitochondrien sind in Abbildung 52 veranschaulicht. Hierbei ist für zwei verschiedene Zeitpunkte innerhalb des kontinuierlichen Betriebs jeweils eine repräsentative Bildaufnahme gezeigt.

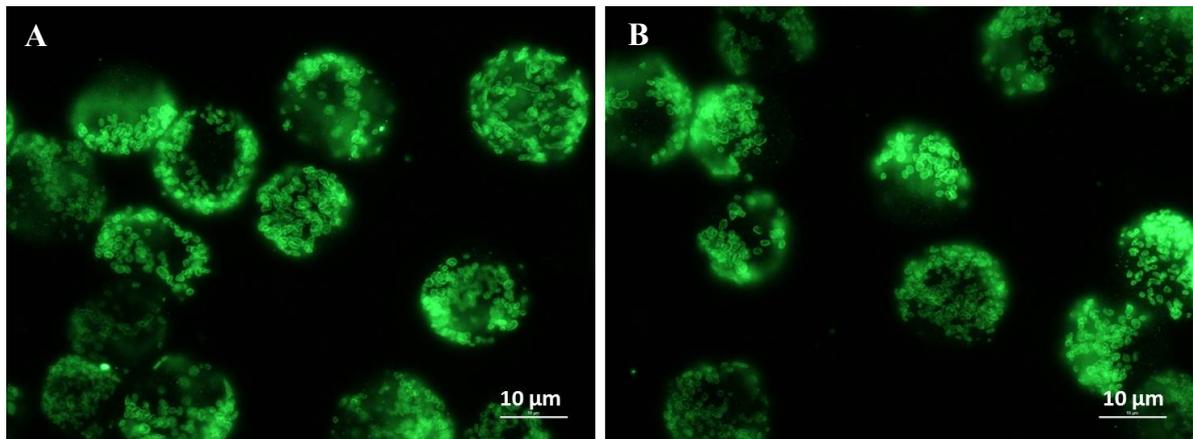


Abb. 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Struktur und Verteilung von Mitochondrien in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung.

Anti-Tom20 markiert, 100-fache Vergrößerung; (A) nach 152 h Kultivierung, 99 % Viabilität, (B) nach 185 h Kultivierung, 98 % Viabilität.

Die Mitochondrien in den CHO-K1 Zellen, die während der kontinuierlichen Kultivierungsphase fixiert wurden, gleichen der Struktur und dem Verteilungsbild, wie es bereits während der exponentiellen Wachstumsphase im Batch-Betrieb beobachtet werden konnte (vergleiche Abb. 39). Hier sind vorwiegend kreisförmig bis sphärische Formen der Mitochondrien erkennbar, die als individuelle, kaum vernetzte Organellen vorliegen (Abb. 52A + B). Signifikante Unterschiede zwischen den analysierten Zellproben zu

verschiedenen Kultivierungszeitpunkte können nicht beobachtet werden. Die Verteilung der Mitochondrien ist relativ gleichmäßig über die komplette Zelle erstreckt, wobei jedoch auch Bereiche unterschiedlicher Mitochondriendichte zu erkennen sind. Hierfür kann einerseits die begrenzte räumliche Verfügbarkeit (z.B. durch den Zellkern) verantwortlich sein aber andererseits auch die metabolische Aktivität der Zellen. Für eine detailliertere Analyse der Verteilung mitochondrialer Proteine wurden die fixierten Zellproben der kontinuierlichen Kultivierung zusätzlich mittels STED-Mikroskopie visualisiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

4.3.2.7 Abbildung mitochondrialer Proteine mittels STED-Mikroskopie

Um die Clusterdichte der mitochondrialen Proteine Tom20, PDH und OGDH in den CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung zu untersuchen, wurden die Mitochondrien intrazellulär markiert und mittels STED-Mikroskopie visualisiert. Die Präparationen und Datenanalysen erfolgten entsprechend zu den Zellproben, die während der Batch-Kultivierung untersucht wurden (siehe 4.3.1.6). Details können dem Kapitel 3.15.3 entnommen werden. Repräsentative Aufnahmen der Zellen nach Tom20- sowie nach PDH-Markierung der Mitochondrien sind in den Abbildungen 53 bzw. 54 gezeigt. Hierbei sind jeweils die Übersichten mehrerer Zellen (linke Bildaufnahme) und eine entsprechende Maximalprojektion eines analysierten Bereichs der Mitochondrien (rechte Bildaufnahme) dargestellt.

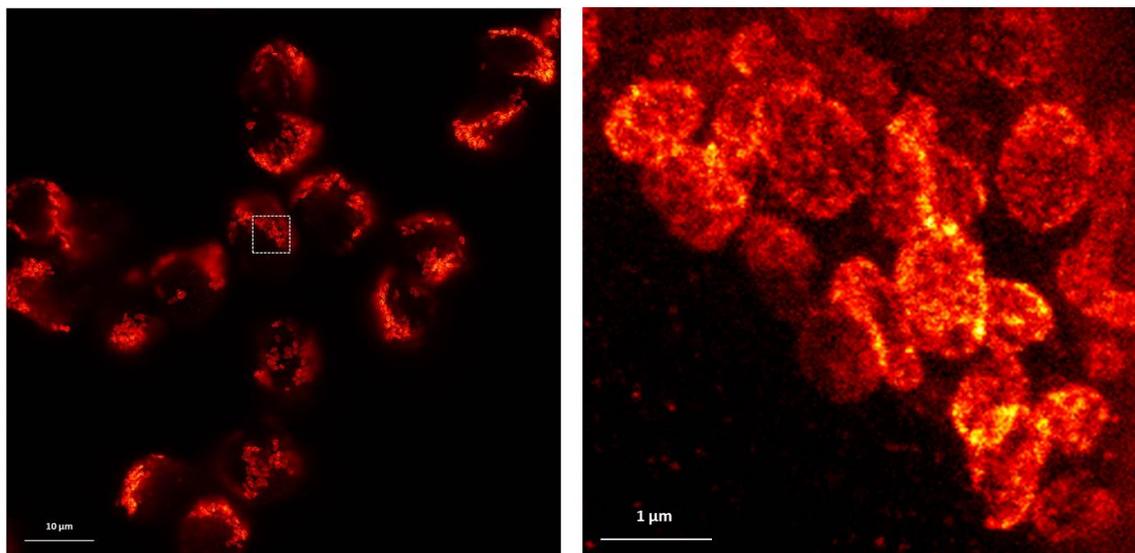


Abb. 53: STED-mikroskopische Aufnahmen Tom20-markierter Mitochondrien in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung (nach 185 h).

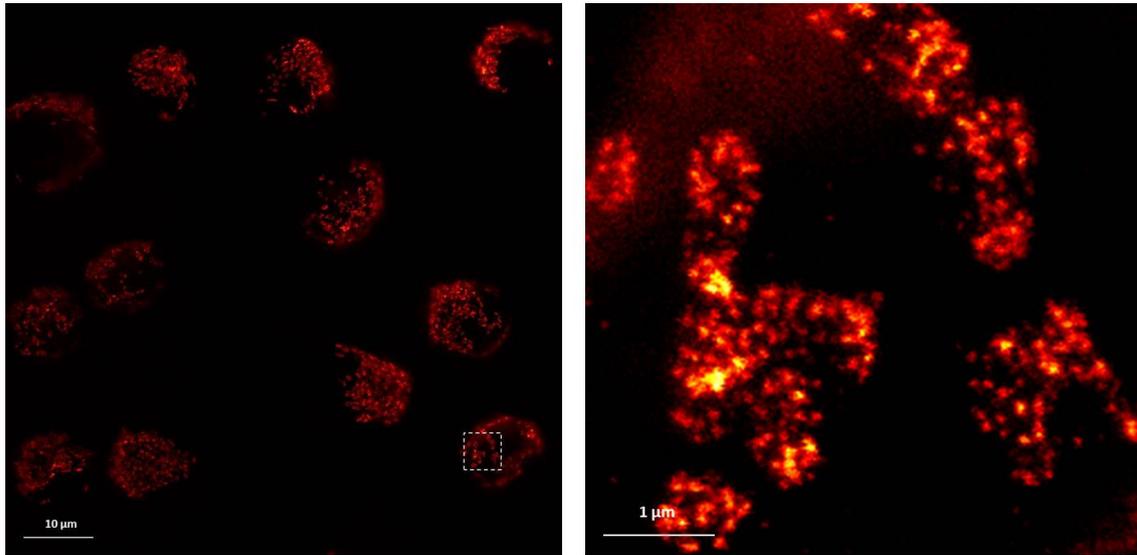


Abb. 54: STED-mikroskopische Aufnahmen PDH-markierter Mitochondrien in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung (nach 185 h).

Der Vergleich der STED-mikroskopischen Aufnahmen von Tom20- und PDH-markierten Mitochondrien innerhalb der Zellen lässt deutliche Unterschiede erkennen. Als Protein, das in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, kann für Tom20 eine sehr gleichmäßige Verteilung auf den Oberflächen der Mitochondrien beobachtet werden (Abb. 53). Im Gegensatz dazu lässt sich PDH innerhalb der Mitochondrien detektieren, und zeigt dort eine inhomogene Verteilung (Abb. 54). Für den Proteinkomplex OGDH, der ebenfalls innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist, konnten auf den STED-mikroskopischen Aufnahmen sehr ähnliche Verteilungsmuster wie für PDH beobachtet werden (Aufnahmen nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der Verteilung der Proteincluster von Tom20, PDH und OGDH während der kontinuierlichen Kultivierung wurden die normierten Varianzen aus jeweils 30 analysierten Zellen berechnet. Die Ergebnisse der Datenanalyse zur Bestimmung der Varianzwerte sind in Abbildung 55 dargestellt.

Die normierten Varianzen der drei untersuchten Proteine zeigen nahezu konstant bleibende Werte während der kontinuierlichen Phase über einen betrachteten Kultivierungszeitraum von insgesamt 52 h (Abb. 55). Eine leichte Abnahme der Clusterdichte kann lediglich für PDH nach einer Kultivierungszeit von 204 h bestimmt werden.

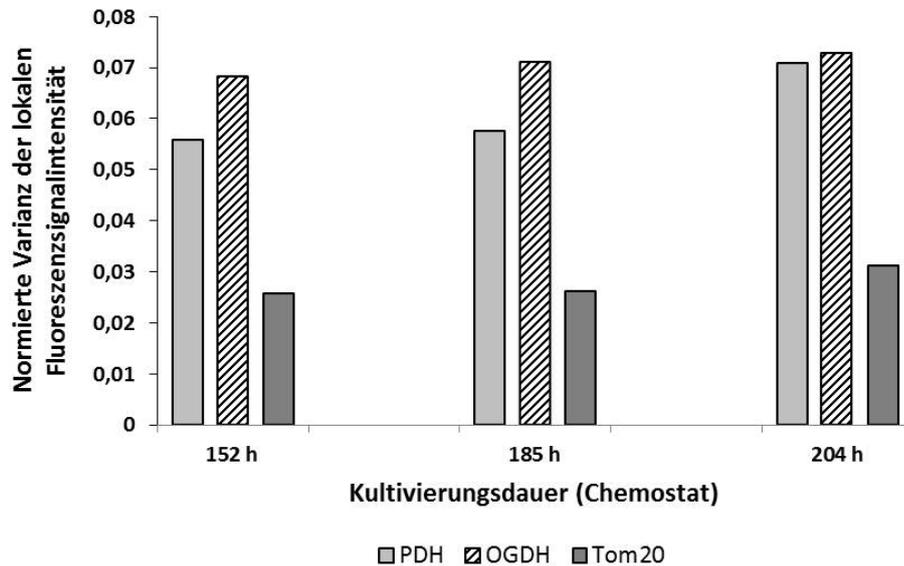


Abb. 55: Bestimmung der Verteilung von PDH-, OGDH- und Tom20-Clustern in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung.

Dargestellt ist die normierte Varianz der lokalen Fluoreszenzsignalintensität der Mitochondrien in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. 30 Zellen pro Protein und Kultivierungszeitpunkt wurden mittels STED-Mikroskopie visualisiert und analysiert.

Die Varianzwerte für PDH und OGDH liegen im Bereich zwischen 0,05 und 0,07. Entsprechende Werte wurden für beide Proteine auch während der Batch-Kultivierung nach 92 h (lineare Wachstumsphase) bestimmt (vergleiche Abb. 42). Für die Verteilung der Tom20-Cluster wurden sehr niedrige Varianzen mit Werten zwischen 0,025 bis 0,03 bestimmt, was auf eine hohe Dichte der Tom20-Cluster während der kontinuierlichen Phase schließen lässt. Die Tom20-Cluster weisen hier eine um etwa 55 bis 73 % höhere Dichte auf als während der exponentiellen und linearen Wachstumsphase innerhalb der Batch-Kultivierung (vergleiche Abb. 42). Die während der kontinuierlichen Kultivierung konstant bleibenden Varianzwerte der analysierten Proteine lassen sich auf die nahezu konstant gehaltenen Kultivierungsbedingungen („steady state“) zurückführen. Da die drei mitochondrialen Proteine im direkten Zusammenhang mit Stoffwechselreaktionen der Zellen stehen, lässt sich diese Konstanz auch durch die gleichbleibende metabolische Aktivität der Zellen begründen. Die Proteine werden über den kontinuierlichen Betrieb im gleichen Maße benötigt, so dass ihre Dichte einerseits hoch ist und andererseits keine signifikanten Schwankungen zu verzeichnen sind.

4.3.2.8 Bestimmung des mitochondrialen Enzymlevels mittels In-Cell ELISA

Um neben der Clusterdichte auch den relativen Proteingehalt von PDH und dessen Phosphorylierungsgrad sowie den Gehalt von OGDH innerhalb der CHO-K1 Zellen zu bestimmen, wurde die Methode des In-Cell ELISA verwendet. Hierfür wurden die CHO-K1 Zellen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten des kontinuierlichen Betriebs fixiert und die Enzyme PDH und OGDH mittels spezifischer Immundetektion markiert. Ein detailliertes Protokoll der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 3.16 beschrieben. Die Ergebnisse der In-Cell ELISA Messungen für die Proben der kontinuierlichen Kultivierung sind in Abbildung 56 und 57 zusammengefasst.

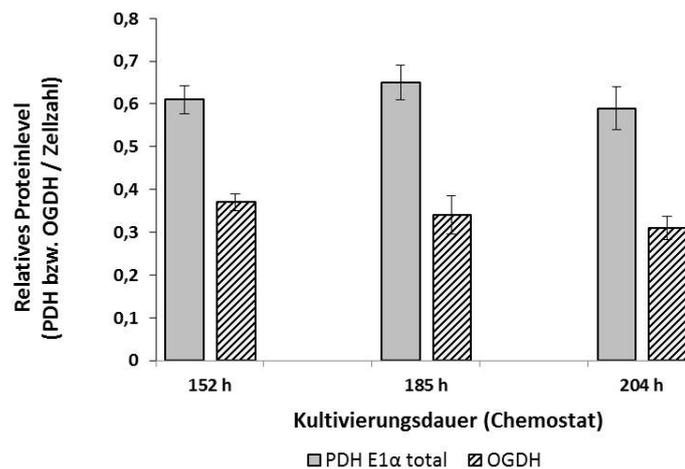


Abb. 56: Bestimmung des Proteinlevels von PDH und OGDH in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung.

Dargestellt ist das relative Proteinlevel gemessen als das PDH- bzw. OGDH-Signal normiert auf die Zellzahl (Janusgrün) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte (n=3).

Ähnlich wie bei der Bestimmung der Proteinclusterdichte lassen sich auch für die Proteinlevel von PDH und OGDH gleichbleibende Werte während der kontinuierlichen Phase beobachten (Abb. 56). Das relative Proteinlevel von PDH ist hierbei zwischen 44 bis 51 % höher als das von OGDH. Im Vergleich mit den Messwerten der Batch-Kultivierung (siehe Abb. 43) können während der kontinuierlichen Kultivierung für beide Proteine etwa doppelt so hohe Werte verzeichnet werden. Da die gemessenen Signale auf die bestimmte Zellzahl pro Probe normiert wurden, lässt sich ausschließen, dass dieser deutliche Unterschied auf unterschiedlich große Zellmengen zurückzuführen ist. Diese Beobachtung

könnte vermuten lassen, dass sich die Zellen aufgrund des dauerhaft vorliegenden Substratüberschusses während des kontinuierlichen Betriebs durch eine erhöhte Synthese dieser stoffwechselrelevanten Enzyme anpassen.

Für den Phosphorylierungsgrad der Serinreste der PDH E1 α Einheit können ebenfalls nahezu gleichbleibende Werte über einen Zeitraum von 52 h während der kontinuierlichen Kultivierung bestimmt werden (Abb. 57).

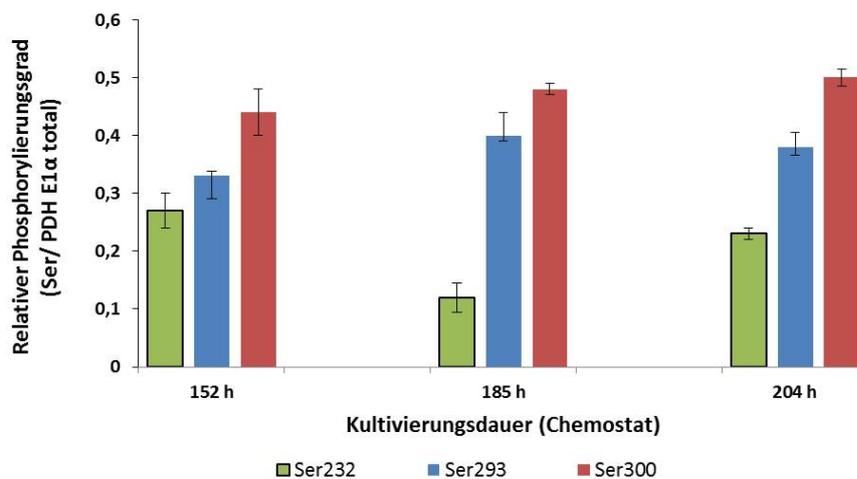


Abb. 57: Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von PDH in CHO-K1 Zellen während der kontinuierlichen Kultivierung.

Dargestellt ist der relative Phosphorylierungsgrad gemessen als das Signal der Serinreste normiert auf das bestimmte PDH-Level in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte (n=3).

Lediglich für Ser232 wird eine Abnahme um etwa 50 % des gemessenen Phosphorylierungsgrades nach 185 h im Vergleich zu den Kultivierungszeitpunkten von 152 h und 204 h verzeichnet. Analog zu den Messwerten der Batch-Kultivierung kann unabhängig von der Kultivierungsdauer der niedrigste Phosphorylierungsgrad für den Serinrest Ser232 gemessen werden, während die höchste Phosphorylierung für Ser300 bestimmt werden kann. Verglichen mit den hier erhaltenen Messwerten lassen sich allerdings rund doppelt bis vierfach so hohe Phosphorylierungsniveaus während der Batch-Kultivierung beobachten. Da der Grad der Phosphorylierung mit der Hemmung der Enzymaktivität korreliert, deuten diese Beobachtungen auf höhere Aktivitäten von PDH während des kontinuierlichen Betriebs hin.

4.3.2.9 Zusammenfassende Diskussion

Bei der kontinuierlichen Kultivierung konnte eine Zelldichte von $6 \cdot 10^6$ Zellen/mL für knapp 100 h konstant gehalten werden, bis ein Auswaschen durch das erhöhte Probenahmenvolumen eintrat. In diesem Zeitraum blieben auch die Raten für Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung stabil. Durch die Implementierung eines *at-line* Mikroskops konnte zusätzlich zu der manuellen Probenahme eine Bestimmung der Zelldichte und eine kontinuierliche Überwachung der Zellsuspension ermöglicht werden. Darüber hinaus konnten Daten über die Zellgrößen- und Zellzyklusphasenverteilung innerhalb einer Mischpopulation gewonnen werden, die mittels durchflusszytometrischer Methoden bestimmt wurden. Beide Verteilungen wiesen nur geringe Schwankungen über den Kultivierungsverlauf auf, wie dies für eine unsynchrone Mischpopulation während der kontinuierlichen Kultivierung zu erwarten war. Bei der Analytik der Mitochondrien zeigte sich während des kontinuierlichen Betriebs ein ähnliches Verteilungsmuster, wie es auch während der Batch-Kultivierung in der exponentiellen Phase beobachtet werden konnte (vergleiche 4.3.1.5). So lagen in den meisten Zellen die Mitochondrien gleichmäßig verteilt vor, ohne dabei sichtbare Vernetzungen zu bilden. Bei einem geringen Teil der Zellen befanden sich die Mitochondrien nur in einer Hälfte der Zelle oder konnten an den Randbereichen der Zellen beobachtet werden. Die Verteilungsdichte der Proteincluster sowie der relative Proteingehalt von PDH und OGDH blieben während der kontinuierlichen Phase nahezu konstant. Verglichen mit den Ergebnissen, die während der Batch-Kultivierung von Mischpopulationen erhalten wurden, können hier jedoch rund doppelt so hohe Proteinlevel und etwa 50 bis 70 % höhere Dichten der Proteincluster bestimmt werden. Dadurch, dass während der kontinuierlichen Kultivierung ein permanenter Substratüberschuss vorliegt, die toxischen Nebenprodukte im Laufe des Prozesses abgeführt werden und aufgrund der moderaten Zelldichte keine Sauerstofflimitierung eintreten kann, lassen die erhöhten Proteinlevel und Proteindichten innerhalb der Mitochondrien eine Adaption der Zellen an die konstant bleibenden Kultivierungsbedingungen vermuten.

4.3.3 Synchrone Kultivierungen von CHO-K1 Zellen

Neben den herrschenden Kultivierungsbedingungen hat der Zellzyklus einen entscheidenden Einfluss auf die metabolische Aktivität sowie die Genexpression tierischer Zellen [277–280]. Das Verständnis der Zellzyklusabhängigkeit von Stoffwechselreaktionen erfordert eine getrennte Betrachtung und quantitative Bestimmung der Stoffflüsse bzw. Metabolitenkonzentration während der jeweiligen Zellzyklusphasen. Dies ist für eine normale Mischpopulation nur schwer möglich, da hier die Zellen heterogen verteilt in allen Zellzyklusphasen vorliegen. Aus diesem Grund sollten neben geregelten Batch- und kontinuierlichen Kultivierungen von Mischpopulationen, ebenfalls Kultivierungen mit zuvor synchronisierten CHO-K1 Zellen durchgeführt werden.

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse von zwei synchronen Kultivierungsexperimenten mit CHO-K1 Zellen dargestellt, von denen die erste Kultur mit Zellen der G1-Phase gestartet wurde und die zweite mit vorwiegend Zellen der S-Phase. Durch die Untersuchung des Wachstumsverhaltens und des Metabolismus sollten Rückschlüsse auf das Verhalten der Zellen während der einzelnen Zellzyklusphasen gewonnen werden. Ebenso sollte die Zellzyklusabhängigkeit von der Morphologie und Verteilung der Mitochondrien sowie von dem mitochondrialen Proteingehalt untersucht werden. Über ein an den Bioreaktor integriertes *at-line* Mikroskop erfolgte dabei eine permanente Überwachung der Zellsuspension.

4.3.3.1 Kalibrierung des Elutriators nach Zellzyklusphasen

Für die Synchronisierung der Zellen wurde in dieser Arbeit die physikalische Methode der zentrifugalen Elutriation verwendet. Diese Methode bietet den Vorteil, dass der Metabolismus und die Viabilität der Zellen nicht oder nur in sehr geringem Maß beeinträchtigt werden. Dies macht sie bei einer sich an die Synchronisierung anschließenden Kultivierung mit Untersuchung des Metabolismus zum Mittel der Wahl [281]. Durch die Elutriation einer CHO-K1 Mischpopulation und einer sich direkt anschließenden Zellzyklusanalyse der gesammelten Zellfraktionen sollten die Pumpraten bestimmt werden, die für die Separation der Zellen entsprechend ihrer Zellzyklusphasen eingestellt werden müssen. Hierfür wurde die Pumprate während der Elutriation schrittweise um 2 bis 3 mL/min erhöht, um die Separationseffizienz des Prozesses zu erhöhen.

Tab. 2: Zellzyklusphasenverteilung von Zellfraktionen, die nach der Elutriation einer CHO-K1 Mischpopulation erhalten wurden.

Fraktion	Pumprate [mL/min]	Zellzyklusphase			Gesammelte Zellzahl [$\cdot 10^6$]
		G1	S	G2/M	
Misch- population	-	48,3 %	29,9 %	21,8 %	380 ($4 \cdot 10^6$ Zellen/mL)
P1	22	82,9 %	15,1 %	2,0 %	0,80
P2	26	92,4 %	5,7 %	1,9 %	3,42
P3	30	72,9 %	23,7 %	3,4 %	1,98
P4	34	34,4 %	51,4 %	14,2 %	16,98
P5	38	13,4 %	57,6 %	29,0 %	26,50
P6	42	8,5 %	42,1 %	49,3 %	8,82
P7	46	6,3 %	24,7 %	69,0 %	6,30
P8	50	6,8 %	13,0 %	80,2 %	2,64

Zusätzlich zur Zellzyklusanalyse wurde für den Elutriationsdurchlauf die dabei ausgetragene Zellzahl pro Fraktion bestimmt. Die Details des Elutriationsexperiments können Kapitel 3.12 entnommen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Da die Pumprate und Größe der ausgetragenen Zellen direkt korrelieren, werden bei niedrigen Pumpraten zuerst die kleinsten Zellen der G1-Phase separiert, anschließend die Zellen der S-Phase und mit steigender Pumprate zunehmend die größten Zellen der G2M-Phase. Die maximalen Anteile der G1-Phase betragen dabei bis zu 92 % bei einer Pumprate von 26 mL/min. In der S-Phase können hingegen maximal 58 % bei einer Pumprate von 38 mL/min angereichert werden. Eine Anreicherung von rund 80 % der Zellen in der G2/M-Phase kann bei 50 mL/min beobachtet werden.

Da für die Inokulation der folgenden synchronen Kultivierungen jeweils eine Animpfzellzahl von insgesamt $100 \cdot 10^6$ Zellen benötigt wird (entsprechend 250 mL Kulturvolumen mit einer Anfangszellichte von $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL), geben die bestimmten Zellzahlen einen Hinweis darauf, wie häufig ein Elutriationsdurchlauf wiederholt werden muss, um eine ausreichende Menge an Zellen zu erhalten.

4.3.3.2 Wachstumsverlauf und Zellzyklusanalyse synchronisierter CHO-K1 Zellen

Innerhalb dieser Arbeit wurden zwei Batch-Kultivierungen von zuvor synchronisierten CHO-K1 Zellen im Vario 1000 Bioreaktor durchgeführt. Für die erste synchrone Kultivierung wurde der Bioreaktor mit Zellen angeimpft, die in der G1-Phase angereichert wurden. Entsprechend der Ergebnisse der Elutriation (siehe Tab. 2) wurden hierfür die Fraktionen P2 und P3 vereint, um eine höhere Zellzahl pro Elutriationsdurchlauf zu erhalten. Die Synchronität der vereinten Fraktionen wurde mit 85,2 % berechnet. Für die zweite synchrone Kultivierung wurden Zellen mit einem Synchronitätsgrad von 57,6 % in der S-Phase (Fraktion P5) für die Inokulation des Bioreaktors verwendet. Der Wachstumsverlauf und die bestimmte Synchronität während der beiden Kultivierungsverläufe sind in Abbildung 58 dargestellt.

Anhand des stufenförmigen Wachstumsverlaufs lässt sich für beide Experimente ein synchrones Zellwachstum annehmen (Abb. 58A + B). Dieses zeigt sich besonders gut innerhalb der ersten 24 h für das zweite Kultivierungsexperiment (Abb. 58B). Der stufenweise Anstieg der Zelldichte deutet an, dass drei bis vier synchrone Teilungen während der Kultivierungsverläufe erreicht werden können. Ab einer Kultivierungsdauer von etwa 48 h lässt sich für beide Experimente kein eindeutig synchrones Wachstum mehr feststellen. Durch das Wachstumsprofil kann während der synchronen Phasen eine Verdopplungszeit von 15 bis 16 h bestimmt werden. Verglichen mit der Verdopplungszeit, die während der kontinuierlichen Kultivierung einer Mischpopulation mit $15,1 \pm 1,6$ h bestimmt wurde (siehe Kapitel 4.3.2.1), zeigt sich hier somit ein unbeeinträchtigtes Wachstum der synchronisierten CHO-K1 Zellen. Anhand der hohen Viabilitäten (96 bis 99 %), die sowohl zu Beginn als auch über den Verlauf beider Kultivierungen bestimmt werden konnten, zeigt sich ebenfalls der schonende Charakter der Elutriationsmethode.

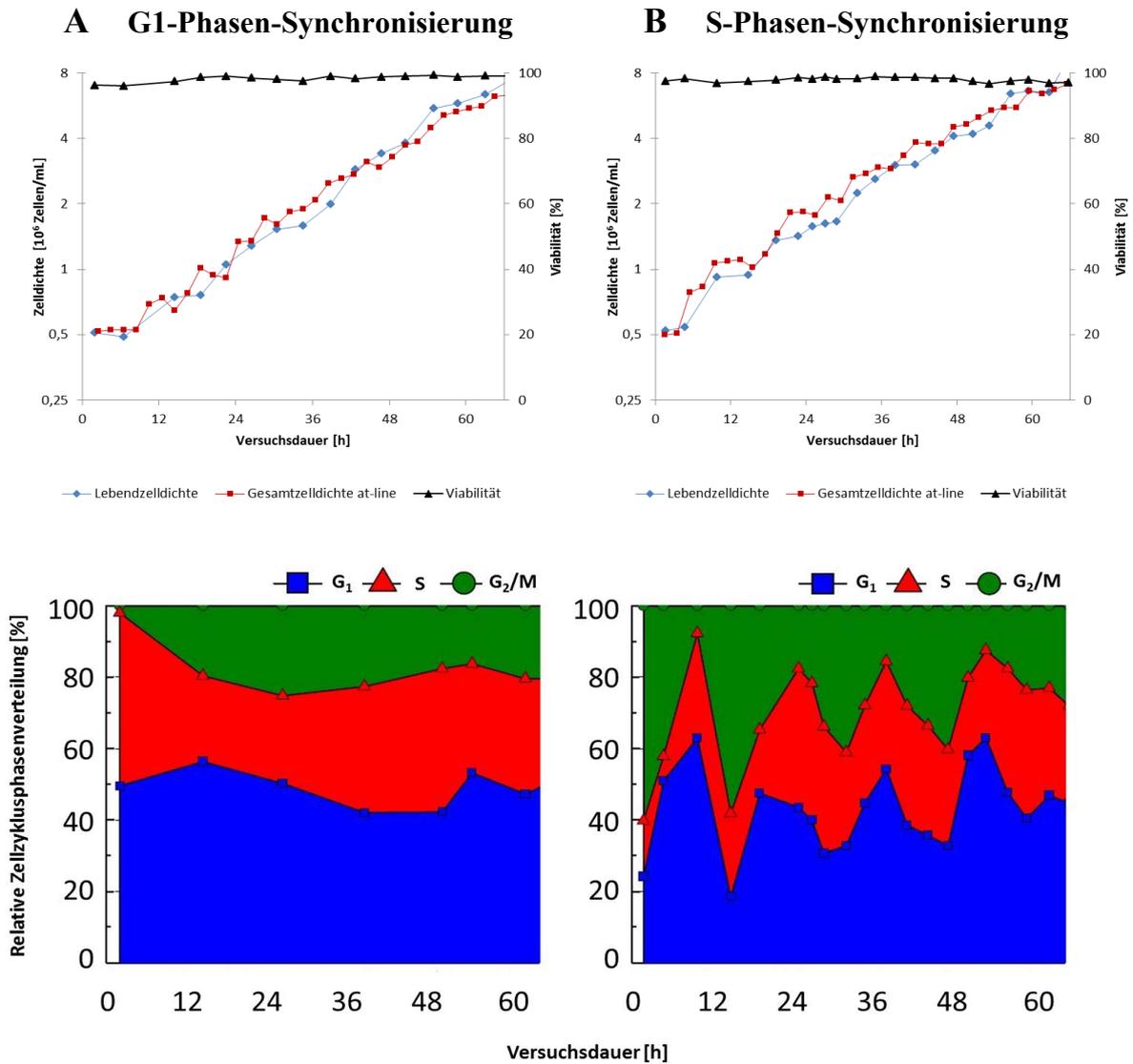


Abb. 58: Wachstumsverlauf und Zellzyklusphasenverteilung von Batch-Kultivierungen synchronisierter CHO-K1 Zellen.

(A) Synchronische Kultivierung mit Zellen, die in der G1-Phase angereichert wurden. (B) Synchronische Kultivierung mit Zellen, die in der S-Phase angereichert wurden.

Die Profile der Zellzyklusphasenverteilung beider Experimente weisen deutliche Unterschiede auf (Abb. 58A+B, untere Bildreihe). Im ersten Experiment (G1-Phasen-Synchronisierung) befinden sich die Zellen kurz nach dem Animpfen mit nahezu gleichen Anteilen in der G1- und der S-Phase, während nur vereinzelte Zellen in der G2/M-Phase vorliegen (Abb. 58A). Der erhöhte Anteil der Zellen in der S-Phase ist dadurch zu erklären, dass sich die synchronisierten Zellen bei der Inokulation größtenteils am Ende der G1-Phase befanden und somit zu Beginn der Kultivierung in die S-Phase übergehen.

Im weiteren Kultivierungsverlauf weist die Verteilung der Zellzyklusphasen nur geringe Schwankungen auf, so dass anhand dieser Ergebnisse keine Rückschlüsse auf ein synchrones Zellwachstum gezogen werden können. Verglichen dazu weist die Zellzyklusphasenverteilung im zweiten Experiment (S-Phasen-Synchronisierung) ein deutlich oszillierendes Profil auf (Abb. 58B). Wie zu erwarten war, ist der Anteil der Zellen der G1-Phase zu Beginn der Kultivierung vergleichsweise gering (~20 %). Dem gegenüber befinden sich 60 % der Zellen in der G2/M-Phase und lediglich noch 20 % in der S-Phase, was aus dem Übergang der Zellen der S-Phase in die G2/M-Phase während der Inokulation resultiert. Verglichen mit dem Anteil der G2/M-Phase von etwa 20 % in einer Mischpopulation (vergleiche Abb. 49) liegt hier der dreifache Wert vor, was auf einen hohen Synchronitätsgrad schließen lässt. Parallel zu dem stufenartigen Kultivierungsverlauf der in der S-Phase synchronisierten Zellen oszillieren die Zellzyklusphasenverteilungen, wobei jeweils sehr ähnliche Peakhöhen erreicht werden (vergleiche Abb. 58B obere mit unterer Bildreihe). Zu den Zeitpunkten der sprunghaften Zunahme der Zelldichte ist jeweils ein Übergang der Zellen von der G2/M in die G1-Phase zu beobachten. Dieses oszillierende Profil zeigt, dass die Synchronität der Zellpopulation auch nach einer Kultivierungsdauer von 50 h erhalten bleibt. Der enorme Unterschied zwischen den Profilen der Zellzyklusphasenverteilungen beider Experimente könnte durch die verschiedenen Längen der Probenahmeintervalle begründet sein. Innerhalb des ersten Experiments wurden durchschnittlich nur alle 10 h Proben genommen, während beim zweiten Kultivierungslauf etwa alle 3 h eine Probenahme erfolgte. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde das oszillierende Verhalten der Zellzyklusphasenverteilung für die G1-Phasen-Synchronisierung durch Dr. Uwe Jandt modelliert. Hierfür wurde die Periodendauer entsprechend der bestimmten Verdopplungszeit der Zellen mit 15 h angegeben. Die modellierten Werte der prozentualen Verteilung der Zellzyklusphasen über den Kultivierungsverlauf der G1-Phasen-Synchronisierung sind in Abbildung 59 den experimentell ermittelten Daten gegenüber gestellt.

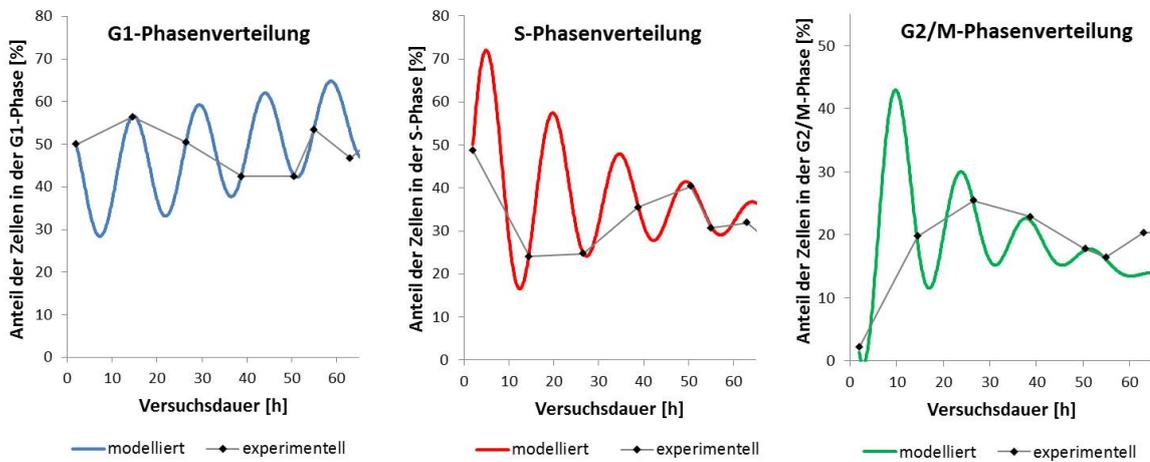


Abb. 59: Modellierung der Zellzyklusphasenverteilung während der G1-Phasen-Synchronisierung.

Dargestellt sind die modellierten und die experimentellen Daten für die jeweilige Zellzyklusphase. (Die Daten der Modellierung wurden freundlicherweise von Dr. Uwe Jandt zur Verfügung gestellt.)

Die modellierten, oszillierenden Werte verlaufen bis zu einer Kultivierungsdauer von etwa 55 h für jede Zellzyklusphase exakt durch die experimentellen Messpunkte. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass aufgrund der geringen Probenahmefrequenz kein oszillierender Verlauf der Zellzyklusphasen durch die experimentellen Daten beobachtet werden konnte. Dies zeigt, dass die Probenahmeintervalle für die Untersuchung einer synchronen CHO-K1 Zellpopulation in vergleichsweise kurzen Abständen von etwa 1 bis 3 h liegen sollten. Die erfordernten Intervalle der Probenahmen sind dabei von der Dynamik des Stoffwechsels abhängig und können von Zelltyp zu Zelltyp variieren [282].

4.3.3.3 Zellgrößenverteilung synchronisierter CHO-K1 Zellen

Neben der Verteilung der Zellzyklusphasen wurde ebenfalls die Zellgrößenverteilung zu jedem Probenahmezeitpunkt bestimmt, um einen weiteren Bezugspunkt auf das synchrone Wachstumsverhalten der Zellen zu erhalten. Die resultierenden Ergebnisse für beide Experimente sind in Abbildung 60 gegenübergestellt. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden jeweils nur die Verteilungsdichten des Zelldurchmessers der ersten fünf gemessenen Proben abgebildet.

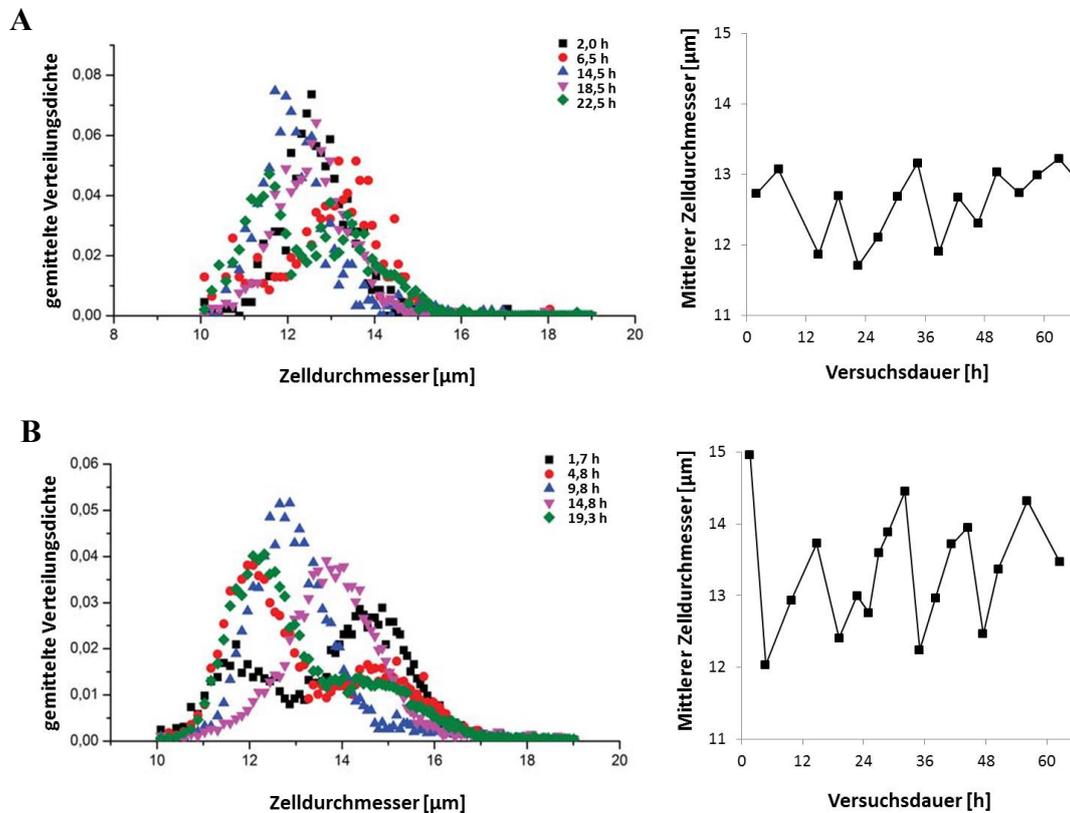


Abb. 60: Bestimmung des Zelldurchmesser synchronisierter CHO-K1 Zellen während der Batch-Kultivierung.

(A) Zellgrößenverteilung und mittlerer Durchmesser während der Kultivierung von Zellen, die in der G1-Phase angereichert wurden. (B) Zellgrößenverteilung und mittlerer Durchmesser während der Kultivierung von Zellen, die in der S-Phase angereichert wurden.

Für beide synchronen Kultivierungen ist hier im Vergleich zum homogenen Verteilungsprofil der Mischpopulation (vergleiche Kapitel 4.3.2.5) eine Verschiebung der Maxima der Verteilungsdichten über den Kultivierungsverlauf festzustellen (Abb. 60A+B). Aufgrund der Anreicherung der Zellen in einer Zellzyklusphase (und entsprechend ihrer Zellgröße) zu Beginn der Kultivierungen, lässt sich hier über die Verschiebung der Zellgrößen auch der Verlauf des Zellzyklus beobachten. Für einige Verteilungsprofile können zwei lokale Maxima beobachtet werden. Hier liegen die Zellen vorwiegend in zwei verschiedenen Zellzyklusphasen vor, was durch die deutliche Trennung der Zellgrößen zu erkennen ist. Gleichzeitig erstreckt sich die Verteilung der gemessenen Zellgrößen über einen deutlich schmalen Bereich (zwischen 10 und 16 μm) als bei der Mischpopulation (zwischen 9,5 und 18,5 μm). Bei Betrachtung der mittleren Zelldurchmesser können für beide Experimente oszillierende Schwankungen über den Verlauf der Kultivierung

beobachtet werden. Für die Kultivierung der in der S-Phase angereicherten Zellen korreliert dieser Verlauf umgekehrt proportional mit dem Gehalt an Zellen der G1-Phase über den Kultivierungsverlauf (vergleiche Zellzyklusphasenverteilung Abb. 58B). Folglich wurden bei maximalen Werten in der G1-Phase gleichzeitig die kleinsten Zellgrößen (nach einer Zellteilung) gemessen und umgekehrt.

4.3.3.4 Wachstumsrate synchronisierter CHO-K1 Zellen

Die bestimmten Wachstumsraten über den Verlauf der synchronisierten Kultivierungsexperimente sind in Abbildung 61 dargestellt. Im Vergleich zu dem Verlauf der Wachstumsraten, die während der Batch-Kultivierung einer Mischpopulation bestimmt wurden (vergleiche Abb. 35), zeigen sich für die synchronisierten Wachstumsexperimente deutliche Unterschiede.

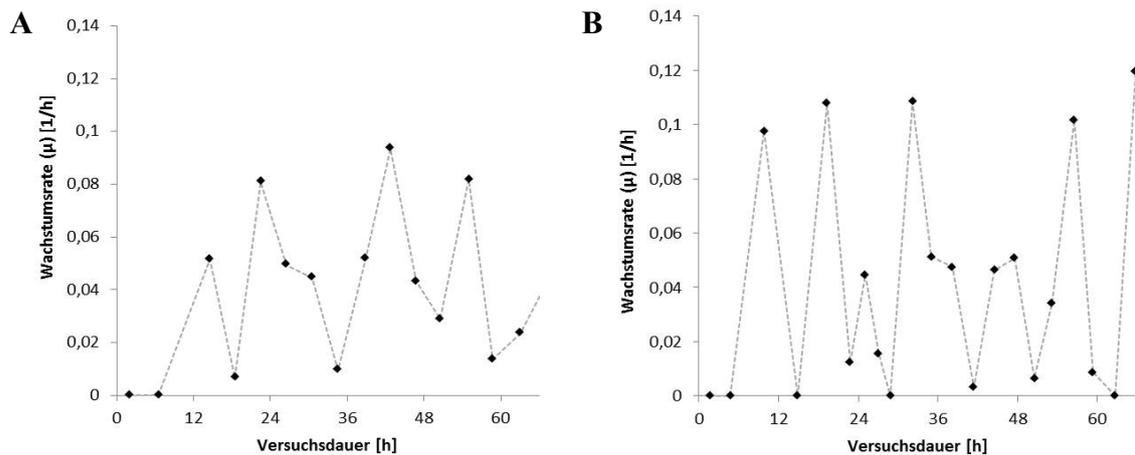


Abb. 61: Bestimmte Wachstumsraten von CHO-K1 Zellen über den Verlauf synchroner Batch-Kultivierungen.

(A) Wachstumsrate über den Kultivierungsverlauf von Zellen, die in der G1-Phase angereichert wurden.

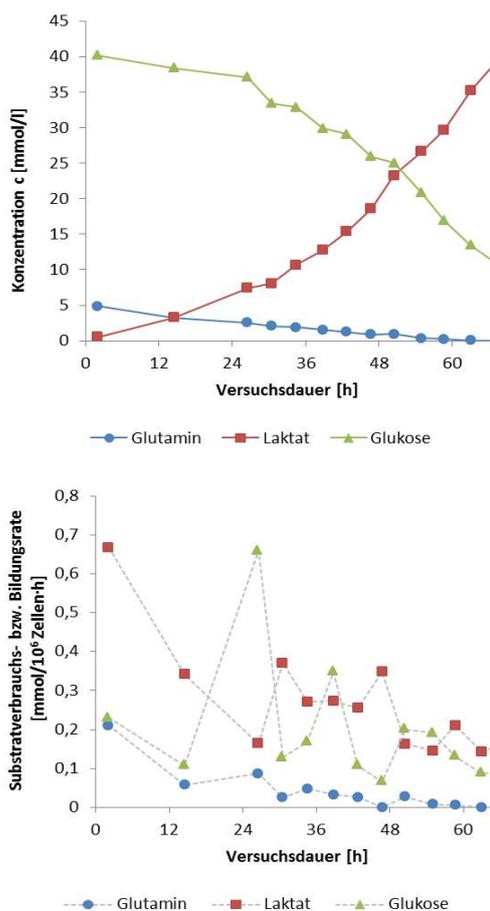
(B) Wachstumsrate über den Kultivierungsverlauf von Zellen, die in der S-Phase angereichert wurden.

Für beide Experimente ist ein stark oszillierender Verlauf der Wachstumsraten während der Kultivierungen zu beobachten (Abb. 61A+B), welcher aus dem sprunghaften Wachstumsverhalten der synchronisierten Zellen resultiert (vergleiche Abb. 58). Die maximalen Wachstumsraten liegen zwischen 0,09 und 0,11 1/h. Diese Werte decken sich mit den maximalen Wachstumsraten, die auch bei unsynchronen Batch-Kultivierungen bestimmt wurden, wohingegen durchschnittliche Werte von $\mu = 0,05 \pm 0,005$ 1/h während des kontinuierlichen Betriebs bestimmt wurden.

4.3.3.5 Substratverbrauch und Produktbildung

Die enzymatisch bestimmten Substratkonzentrationen und die entsprechenden Verbrauchs- bzw. Bildungsraten der synchronen Kultivierungen in Abhängigkeit der Versuchsdauer sind in Abbildung 62 dargestellt. Im Vergleich der Substratprofile, die aus den Batch-Kultivierungen von Mischpopulationen erhalten wurden (siehe Abb. 37), zeigt sich hier für beide synchronen Kultivierungsexperimente eine stufenförmige Abnahme der Glukose- und Glutaminkonzentrationen. Eine deutliche stufenförmige Laktatbildung kann für das zweite Experiment (Abb. 62B) ebenfalls beobachtet werden. Die Bildung von Laktat erfolgt in beiden Experimenten zeitversetzt zu dem Konsum der beiden Substrate, was durch das zeitverzögerte Auftreten der Maxima der Laktatbildungsraten zu erkennen ist.

A G1-Phasen-Synchronisierung



B S-Phasen-Synchronisierung

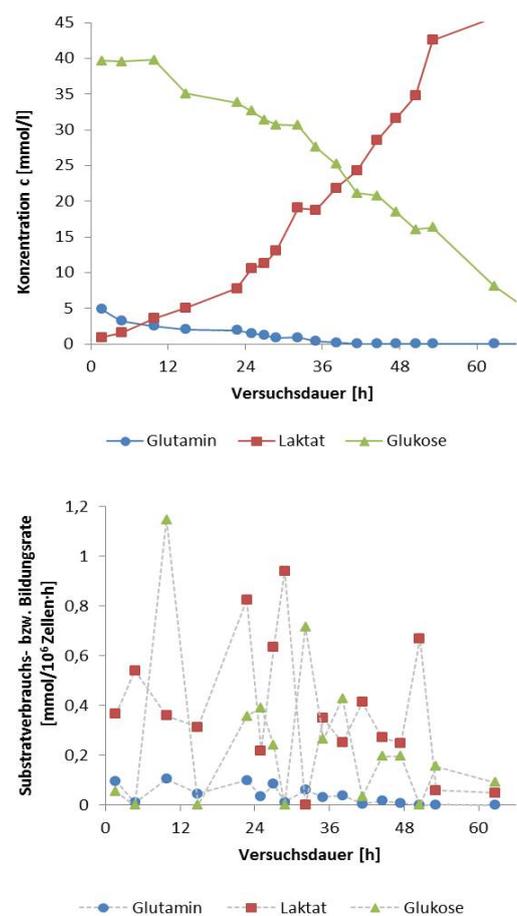


Abb. 62: Bestimmte Konzentrationen von Glukose, Glutamin und Laktat sowie die entsprechenden Verbrauchs- bzw. Bildungsraten von CHO-K1 über den Verlauf synchroner Batch-Kultivierungen.

(A) von Zellen, die in der G1-Phase angereichert wurden; (B) von Zellen, die in der S-Phase angereichert wurden.

Entsprechend der Konzentrationsprofile zeigen die berechneten Substratverbrauchsrate bzw. Laktatbildungsrate einen oszillierenden Verlauf während der synchronen Kultivierungen. Diese Beobachtungen korrelieren mit dem stufenförmigen Wachstumsverlauf, der für beide Experimente aufgezeichnet werden konnte (vergleiche Abb. 58). Aufgrund der unzureichenden Probenahmefrequenz während des ersten Versuchs (G1-Phasen-Synchronisierung) lässt sich für diesen jedoch keine Korrelation des Substratverbrauchs zur Zellzyklusphasenverteilung erkennen. Für das zweite Experiment (S-Phasen-Synchronisierung) kann jedoch eine direkte Abhängigkeit dieser beiden Größen beobachtet werden. Die höchsten Verbrauchsrate von Glukose und Glutamin werde jeweils zu den Zeitpunkten bestimmt, an denen der Anteil der Zellen in der G1- und S-Phase ihre Maxima erreichen, während der Anteil der Zellen der G2/M-Phase am geringsten ist. So ist davon auszugehen, dass der Anstieg in der Verbrauchsrate durch eine erhöhte Biosyntheserate in der G1- bzw. S-Phase (Protein- und DNA-Synthese) ausgelöst wurde.

4.3.3.6 Detaillierte Analyse extrazellulärer Metaboliten mittels HPLC

Für die Stoffwechseluntersuchungen der synchronen Kultivierungsexperimente wurden neben der enzymatischen Bestimmung der Glukose- Glutamin- und Laktatkonzentrationen noch 20 weitere stoffwechselrelevante, extrazelluläre Metaboliten mittels HPLC gemessen. Eine Übersicht der Messergebnisse in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer ist in Abbildung 63 dargestellt. Auch hier zeigt sich innerhalb der ersten 36 h ein stufenförmiger Substratverbrauch bzw. Produktbildung. Allerdings können in diesem Zeitraum Unterschiede im Konzentrationsverlauf einiger Metaboliten beim Vergleich der beiden synchronen Kultivierungsexperimente beobachtet werden. Für die G1-Phase-Synchronisation liegen die Konzentrationen der gemessenen proteinogenen Aminosäuren (mit Ausnahme von Glutamin) durchschnittlich um 5 bis 12 % über den Werten, die in diesem Zeitraum während der S-Phase-Synchronisation bestimmt wurden. Ab einer Kultivierungsdauer von 36 bis 66 h kann für die G1-Phase-Synchronisation ein deutlicher Anstieg der Pyruvatkonzentration um 20 % beobachtet werden. Gleichzeitig ist für die proteinogenen Aminosäuren (mit Ausnahme von Glycin und Serin) zwischen 36 und 48 h eine starke Konzentrationsabnahme um durchschnittlich 10 bis 50 % zu bemerken.

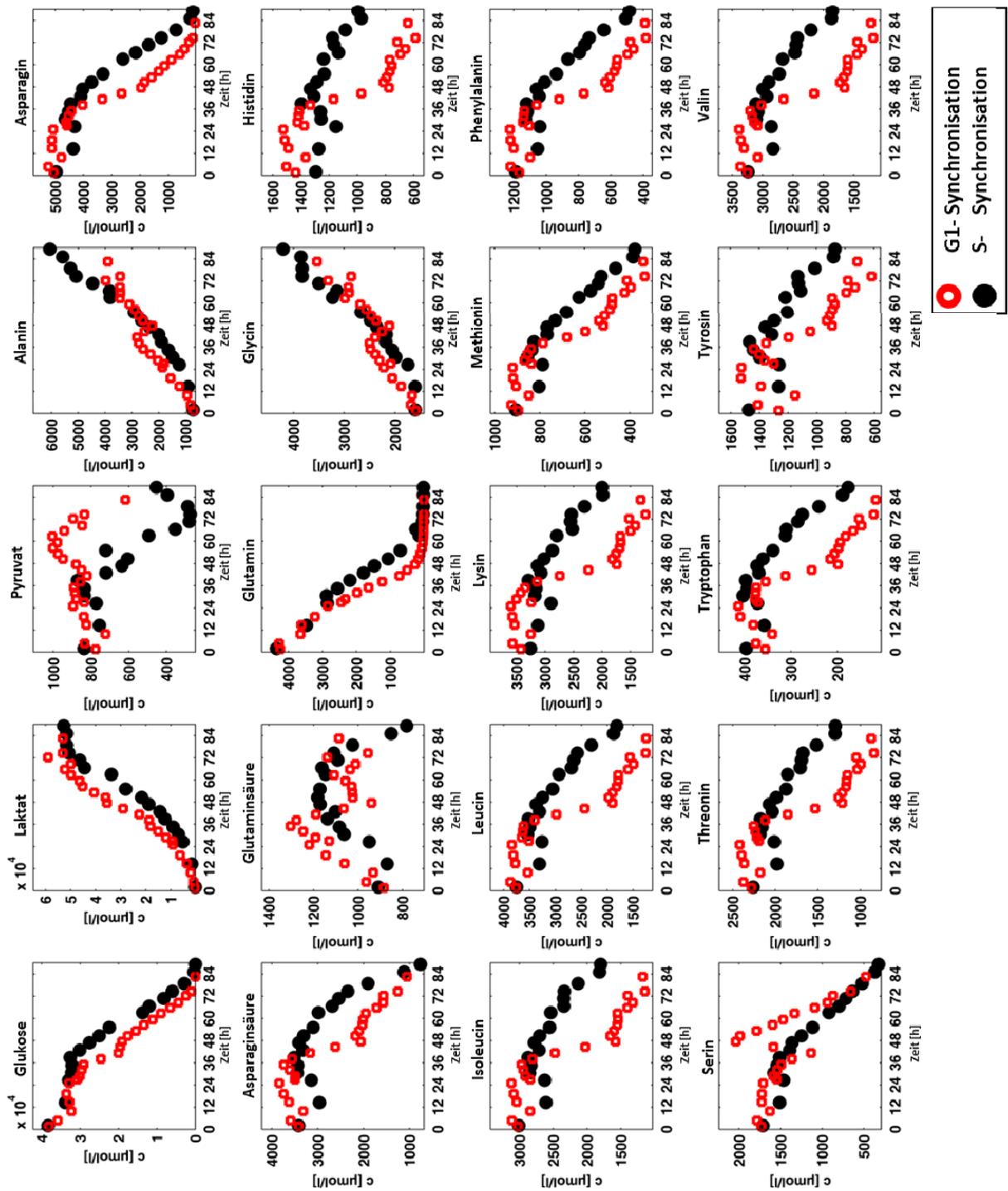


Abb. 63: Metabolitenbestimmung mittels HPLC über den Verlauf der synchronen Kultivierungen von CHO-K1 Zellen.

Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen gegen die Kultivierungsdauer.

Ein deutlich anderes Profil zeigt sich für die S-Phase-Synchronisation. Hier sinkt die Pyruvatkonzentration ab einer Kultivierungsdauer von 36 h innerhalb von 24 h um etwa 50 % vom ursprünglichen Wert (855 $\mu\text{mol/L}$) ab. Parallel dazu ist die Konzentrationsabnahme der proteinogenen Aminosäuren in diesem Zeitraum deutlich verlangsamt, verglichen mit den gemessenen Verläufen während der G1-Phase-Synchronisierung. Die effiziente Verstoffwechslung des Pyruvats (S-Phase-Synchronisierung) führt offenbar dazu, dass der Anspruch an proteinogenen Aminosäuren sinkt. Im umgekehrten Fall (G1-Phase-Synchronisierung) wird die erhöhte Pyruvatbildung und ineffiziente Verstoffwechslung folglich durch einen vermehrten Bedarf der Aminosäuren kompensiert.

Beim Vergleich des Pyruvatprofils, das während der Batch-Kultivierungen von Mischpopulationen bestimmt wurde (vergleiche Abb. 38), zeigt sich ein ähnlicher Verlauf wie für die G1-Phasen-Synchronisation. Dort findet eine kontinuierliche Zunahme der Pyruvatkonzentration innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase statt. Die anschließende Pyruvatverstoffwechslung korreliert mit der Glutaminlimitierung nach 72 h. Diese Korrelation kann auch für die G1-Phase-Synchronisation beobachtet werden. Darüber hinaus haben die Ergebnisse der kontinuierlichen Kultivierung (vergleiche Abb. 48) ebenfalls gezeigt, dass ohne vorliegende Substratlimitierung innerhalb des exponentiellen Wachstumsbereichs eine permanente, übermäßige Pyruvatbildung vorliegt. Diese übermäßige Pyruvatbildung ist ein typisches Merkmal des deregulierten Metabolismus der CHO Zellen und wurde bereits in der Literatur mehrfach beschrieben. Das von diesen Beobachtungen völlig abweichende Profil der Pyruvatkonzentration während der S-Phase-Synchronisierung ist bemerkenswert und deutet auf einen regulierten Metabolismus der Zellen hin. Eine direkte Korrelation des Pyruvat- oder Substratverbrauchs zu den Zellzyklusphasen kann hier jedoch nicht beobachtet werden. Um den Einfluss des synchronen Wachstums auf die Regulation des Metabolismus bestätigen zu können, müsste diese Versuchsreihe wiederholt und fortgeführt werden.

4.3.4 Mitochondriale Analysen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen

Analog zur Untersuchung der Struktur und Verteilung der Mitochondrien und der mitochondrialen Proteine über den Verlauf von Batch- und kontinuierlichen Kultivierungen (siehe Kapitel 4.3.1.5 und 4.3.2.6) wurden ebenfalls Proben von CHO-K1 Zellen analysiert, die mittels Elutriation in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen angereichert wurden. Hierbei wurden drei Fraktionen gewählt, in denen die Zellen in der G1-Phase (92,4 %), in der S-Phase (57,6 %) bzw. in der G2/M-Phase (80,2 %) angereichert wurden (vergleiche Tab. 2). Durch diese Analysen sollten Kenntnisse über den Einfluss der Zellzyklusphasen auf die Dynamik der Mitochondrienmorphologie und mitochondrialer Proteine gewonnen werden.

4.3.4.1 Struktur und Verteilung der Mitochondrien

Die während der G1-, S- und G2/M-Phase auftretenden Strukturen und Verteilungsmuster der Mitochondrien sind in Abbildung 64 veranschaulicht. Hierbei ist für jede Zellzyklusphase jeweils eine repräsentative Bildaufnahme gezeigt. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die Mitochondrien an den Mikrotubuli ausrichten und über diese Ausrichtung Rückschlüsse auf den Zustand der Zelle beziehungsweise ihre Zellzyklusphase gezogen werden können. Die Mitochondrien in den CHO-K1 Zellen, die während der G1-Phase fixiert wurden, zeigen ein sehr ungleichmäßiges Verteilungsmuster (Abb. 64A). Hier liegen die Mitochondrien vorwiegend lokalisiert in einer Hälfte der Zelle vor. Teilweise können Mitochondriencluster beobachtet werden, die aufgrund der starken Fluoreszenzintensität auf eine hohe Mitochondriendichte in diesen Bereichen hindeuten. Diese ungleichmäßige Verteilung der Mitochondrien könnte aus der vorangegangenen Zellteilung resultieren, die bewirkt, dass sich die Zellstrukturen neu orientieren müssen. Grund hierfür könnte sein, dass die Zellen zu Beginn der G1-Phase eine stärkere Vernetzung der Mikrotubuli um das einzelne an einem Pol befindliche Zentrosom aufweisen. Dadurch ließe sich eine dortige Ansammlung der Mitochondrien in der frühen G1-Phase erklären.

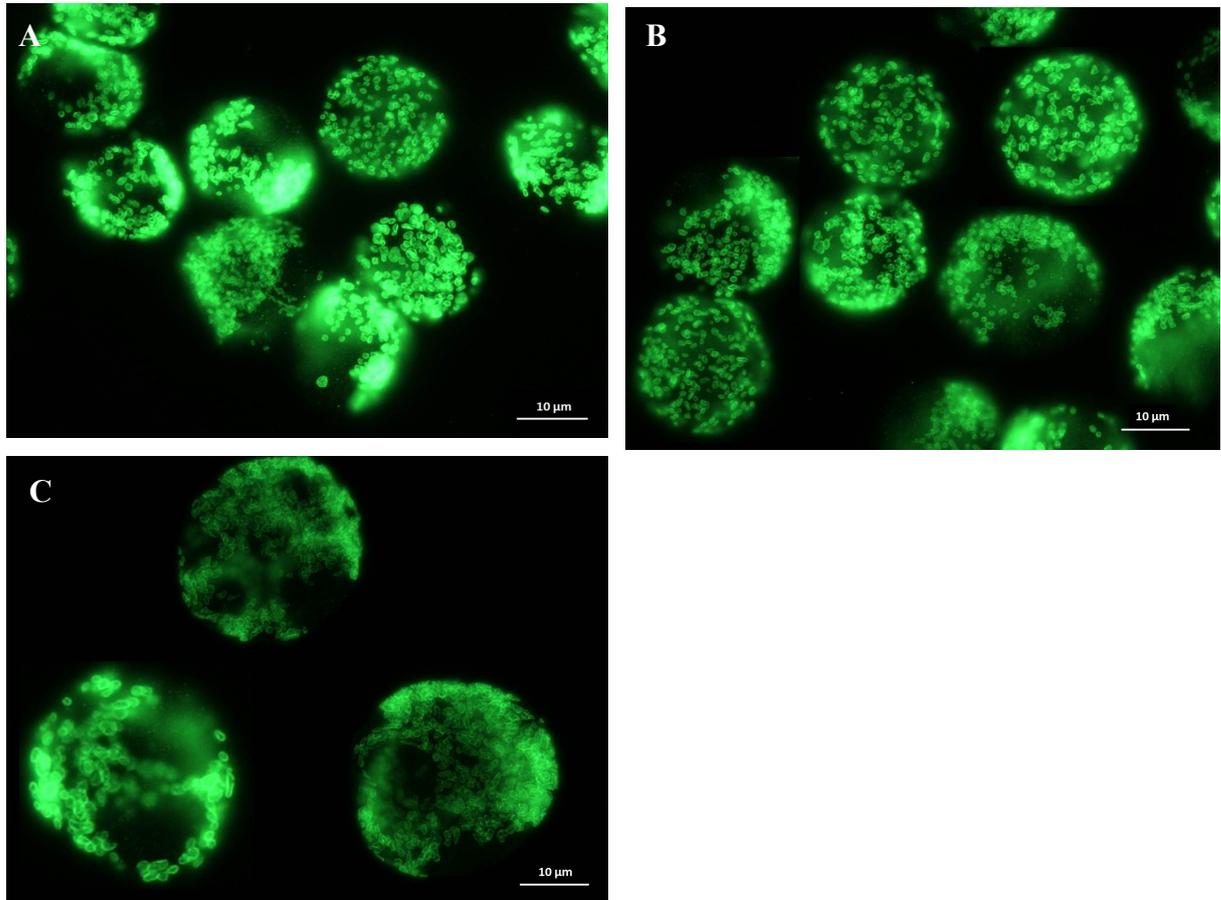


Abb. 64: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Struktur und Verteilung von Mitochondrien in CHO-K1 Zellen abhängig von den Zellzyklusphase.

Anti-Tom20 markiert, 100-fache Vergrößerung; **(A)** G1-Phase (92,4 %), 97 % Viabilität, **(B)** S-Phase (57,6 %), 98 % Viabilität, **(C)** G2/M-Phase (80,2 %), 98 % Viabilität.

Vereinzelt liegen jedoch auch Zellen vor, die eine gleichmäßige Mitochondrienverteilung aufzeigen. Diese gleichmäßige Verteilung kann für die Zellen, die in der S-Phase fixiert wurden, zunehmend beobachtet werden (Abb. 64B). Hier könnte ein Fortschreiten des Zellzyklus und damit eine verstärkte Ausweitung des Mikrotubuli-Netzwerkes die Ursache für die Verteilung der Mitochondrien sein. Sowohl während der G1- als auch während der S-Phase können vorwiegend kreisförmig bis sphärische Formen der Mitochondrien detektiert werden, ohne dass starke Vernetzungen ersichtlich sind. Diese Beobachtungen wurden auch für die Zellen gemacht, die während des exponentiellen Wachstums im Batch- und im kontinuierlichen Betrieb analysiert wurden (vergleiche Abb. 39 und 52). Im Gegensatz dazu zeigen sich für die Zellen, die in der G2/M-Phase fixiert wurden, deutliche Unterschiede (Abb. 64C). Da sich die Zellen in der G2/M-Phase kurz vor der Zellteilung

befinden, können durch die Verteilung der Mitochondrien bereits zwei Zellkerne beobachtet werden, die als runde, nicht fluoreszierende Bereiche innerhalb der Zellen erscheinen. Hier nehmen die Mitochondrien zunehmend langgestreckte, ovale Formen ein, die teilweise miteinander vernetzt zu sein scheinen. Da die Replikation der Mitochondrien vor der Zellteilung ähnlich wie bei Bakterien abläuft [283], lassen sich die langgestreckten Formen durch ihre eigene, bevorstehende Teilung erklären. Die Vernetzung der Mitochondrien könnte aus dem erhöhten Energiebedarf resultieren, der für die Teilung der Zellen benötigt wird. Durch den eingefügten Größenmaßstab in den Abbildungen lässt sich auch die Zunahme der Zellgrößen von der G1-Phase bis hin zur G2/M-Phase verfolgen.

4.3.4.2 Abbildung mitochondrialer Proteine mittels STED-Mikroskopie

Um die Clusterdichte der mitochondrialen Proteine Tom20, PDH und OGDH in den CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen zu untersuchen, wurden diese Proteine durch spezifische Antikörper intrazellulär markiert und mittels STED-Mikroskopie visualisiert. Die Präparationen und Datenanalysen erfolgten entsprechend zu den Zellproben, die während der Batch- und kontinuierlichen Kultivierung untersucht wurden. Details können dem Kapitel 3.15.3 entnommen werden. Repräsentative Aufnahmen der Zellen nach Tom20-Markierung der Mitochondrien sind in der Abbildung 65 gezeigt und bestätigen das Verteilungsmuster, das bereits mittels konfokaler Mikroskopie beobachtet werden konnte (siehe Abb. 64). Hierbei sind jeweils die Übersichten mehrerer Zellen (linke Bildaufnahme) und eine entsprechende Maximalprojektion eines analysierten Bereichs der Mitochondrien (rechte Bildaufnahme) dargestellt.

Zur Bestimmung der Verteilung der Proteincluster von Tom20, PDH und OGDH in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase wurden die normierten Varianzen aus jeweils 30 analysierten Zellen berechnet. Die Ergebnisse der Datenanalyse zur Bestimmung der Varianzwerte sind in Abbildung 66 dargestellt.

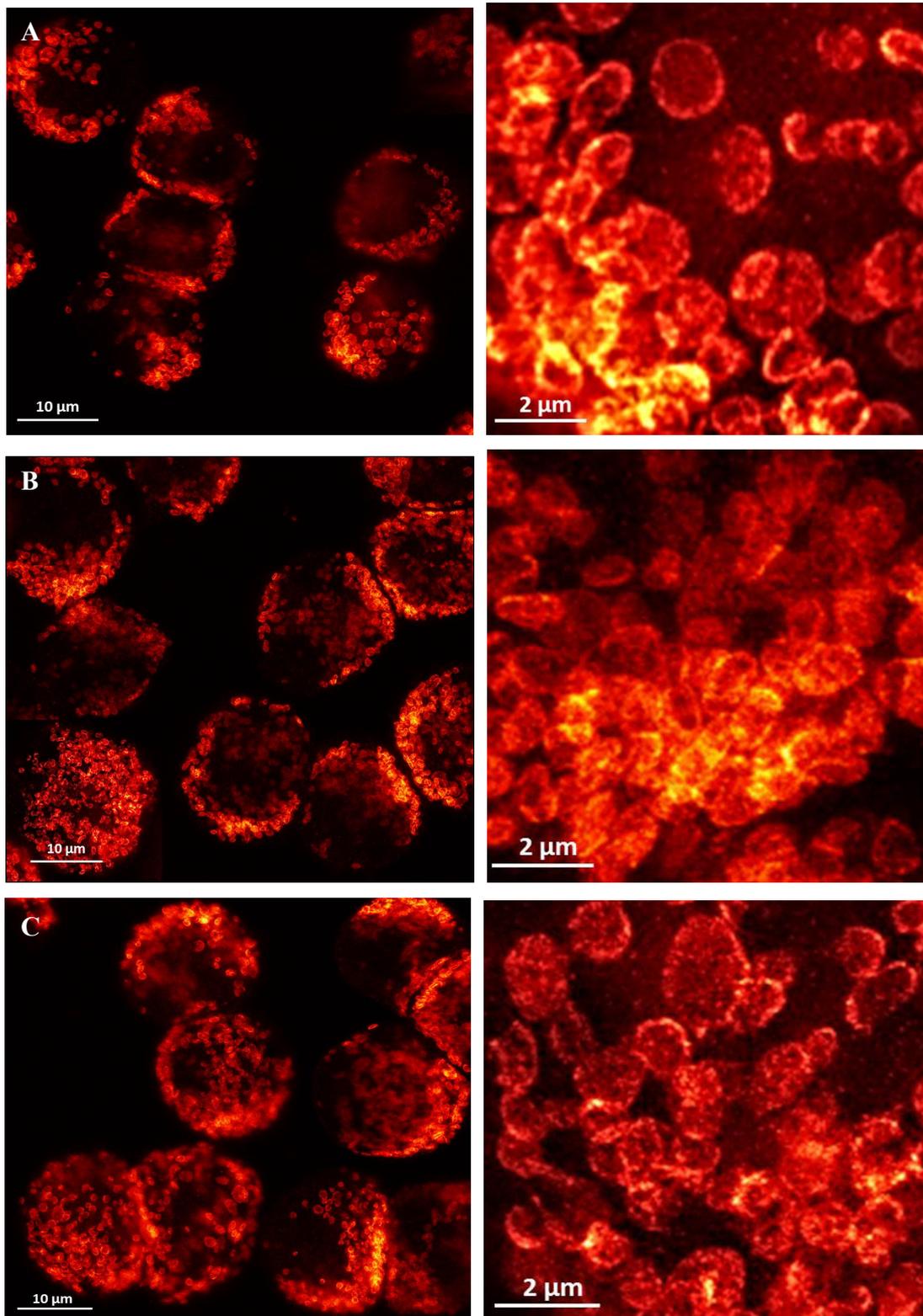


Abb. 65: STED-mikroskopische Aufnahmen Tom20-markierter Mitochondrien in CHO-K1 Zellen zu verschiedenen Zellzyklusphasen.

(A) G1-Phase (92,4 %), 97 % Viabilität, **(B)** S-Phase (57,6 %), 98 % Viabilität, **(C)** G2/M-Phase (80,2 %), 98 % Viabilität.

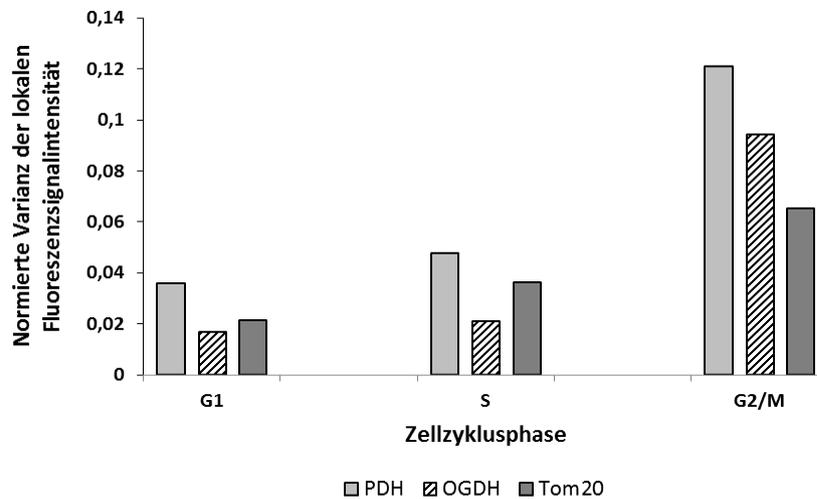


Abb. 66: Bestimmung der Verteilung von PDH-, OGDH- und Tom20-Clustern in CHO-K1 Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen.

Dargestellt ist die normierte Varianz der lokalen Fluoreszenzsignalintensität der Mitochondrien in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase. 30 Zellen pro Protein und Kultivierungszeitpunkt wurden mittels STED-Mikroskopie visualisiert und analysiert.

Die normierten Varianzen der drei untersuchten Proteine zeigen die niedrigsten Werte in Zellen, die während der G1-Phase fixiert wurden (Abb. 66). Hier sind die Varianzwerte für PDH, OGDH und Tom20 um 20 bis 40 % niedriger als in Zellen, die hauptsächlich während der S-Phase fixiert wurden. Die höchsten Werte wurden in den Zellen der G2/M-Phase beobachtet. Diese Werte sind um durchschnittlich 67 % (gilt für Tom20) bis 79 % (gilt für OGDH) höher als die Varianzen, die während der G1-Phase bestimmt wurden. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Dichte der Proteincluster von PDH, OGDH und Tom20 während der G1-Phase am größten ist und innerhalb der G2/M-Phase, während der Vorbereitung auf die Zellteilung, am niedrigsten. Da die hier betrachteten Zellen alle aus der gleichen Mischpopulation während der exponentiellen Wachstumsphase gewonnen wurden, kann für diese Untersuchung der Zellzyklusabhängigkeit der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Proteinverteilung vernachlässigt werden. Als Referenz für die hier bestimmten Varianzwerte können die Ergebnisse mit denen der STED-Analysen der kontinuierlichen Kultivierung (Mischpopulation) verglichen werden (siehe Abb. 55). So lässt sich die geringe Dichte der Proteincluster innerhalb der G2/M-Phase auf die Ausdehnung der Mitochondrien vor der Zellteilung schließen.

Möglicherweise haben die wachsenden Mitochondrien noch nicht den Gehalt der Proteine im gleichen Maße wie ihre Volumenzunahme erhöht. Die sinkende Dichte der Proteincluster von der G1- bis hin zur G2/M-Phase, lässt sich auch bei genauer Betrachtung der entsprechenden STED-Aufnahmen anhand der Fluoreszenzintensitäten erkennen (Abb. 65, rechte Bildreihe). Nach der Zell- und Mitochondrienteilung, innerhalb der G1-Phase, sind die Mitochondrien vorwiegend dicht aneinander an einem Pol der Zelle lokalisiert. Durch die kompakte Anordnung der Mitochondrien wird auch die Dichte der Proteincluster erhöht. Da sich die Mitochondrien während der S-Phase gleichmäßig innerhalb der Zellen verteilen, könnte die beobachtete Abnahme der Proteindichte aus dieser erhöhten Verteilung resultieren.

4.3.4.3 Bestimmung des mitochondrialen Enzymlevels mittels In-Cell ELISA

Analog zu den Zellproben der Batch- und kontinuierlichen Kultivierungen wurde der relative Proteingehalt von PDH und dessen Phosphorylierungsgrad sowie der Gehalt von OGDH innerhalb der CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit des Zellzyklus bestimmt. Hierfür wurden die in den jeweiligen Zellzyklusphasen angereicherten Zellen fixiert und die Enzyme PDH und OGDH mittels spezifischer Immundetektion markiert. Die Ergebnisse der anschließenden In-Cell ELISA Messungen für die Proben der G1-, S- und G2/M-Phase sind in Abbildung 67 und 68 zusammengefasst.

Sowohl für PDH also auch für OGDH ist das relative Proteinlevel in den Zellen, die in der G1-Phase fixiert wurden, am niedrigsten. Eine Erhöhung dieses Proteingehalts um 20 % und 35 % von PDH bzw. OGDH ist in Zellen der S-Phase zu verzeichnen. In der G2/M-Phase liegt der gemessene Wert für beide Proteine um rund 50 % über dem Level, das während der G1-Phase bestimmt wurde. Da die Messergebnisse auf die Zellzahl pro Probe normiert wurden, lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass sich der Proteingehalt im Laufe der Zellzyklusphase verdoppelt. Vor dem Hintergrund, dass der zelluläre Mitochondriengehalt mit zunehmender Zellgröße und somit im Laufe des Zellzyklus ebenfalls steigt [284], erscheint der korrelierende Anstieg des mitochondrialen Proteingehalts als eine logische Konsequenz.

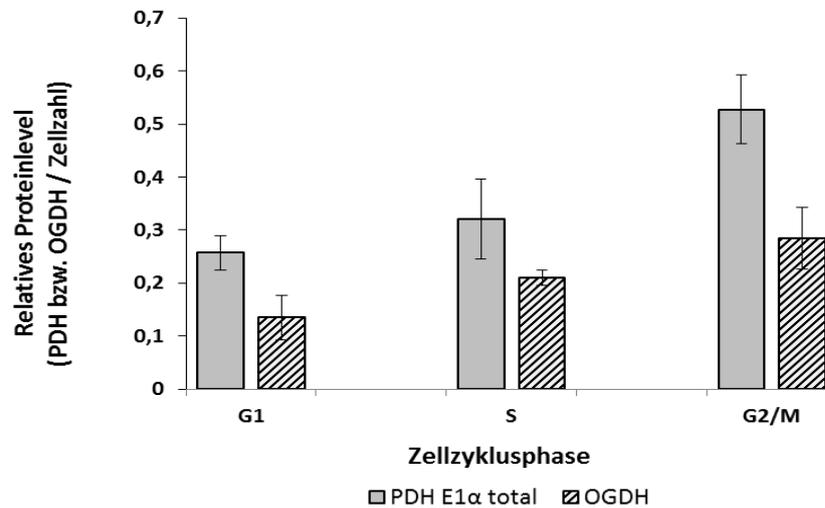


Abb. 67: Bestimmung des Proteinlevels von PDH und OGDH in CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen.

Dargestellt ist das relative Proteinlevel gemessen als das PDH- bzw. OGDH-Signal normiert auf die Zellzahl (Janusgrün) in Zellen, die in der G1-, S- bzw. G2/M-Phase angereichtert wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte (n=3).

Durch den erhöhten Enzymgehalt können die Zellen einerseits den vermehrten Energiebedarf während der Synthese- und Replikationsphase durch eine Steigerung der metabolischen Aktivität begünstigen und andererseits kann so gewährleistet werden, dass die Zellen nach der Zellteilung über eine ausreichende Enzymmenge verfügen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Bestimmung der Proteinclusterdichte (siehe Abb. 66), kann beobachtet werden, dass die Zunahme des Proteinlevels scheinbar mit der Abnahme der Proteinclusterdichte korreliert. Eine Begründung hierfür könnte in der Volumenzunahme der Zellen und der Mitochondrien liegen, die im Laufe des Zellzyklus stattfindet, was eine größere Verteilung der Proteincluster bewirkt.

Bildet man unter Einbeziehung der durchschnittlichen Zellzyklusphasenverteilung einer Mischpopulation (siehe Kapitel 4.3.2.4) Mittelwerte aus den hier bestimmten Proteinniveaus, ergeben sich die relativen Proteinlevel zu 0,33 für PDH und 0,18 für OGDH. Diese Werte liegen dicht bei denen, die während der Batch-Kultivierung von Mischpopulationen in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt wurden ($0,28 \pm 0,035$ für PDH und $0,17 \pm 0,02$ für OGDH; siehe Kapitel 4.3.1.7). Im Vergleich dazu wurden für die relativen Proteinlevel von PDH und OGDH während des kontinuierlichen Betriebs

einer Mischpopulation durchschnittlich doppelt so hohe Werte gemessen (siehe Kapitel 4.3.2.8). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich die Zellen aufgrund des dauerhaft vorliegenden Substratüberschusses während des kontinuierlichen Betriebs durch eine erhöhte Synthese dieser stoffwechselrelevanten Enzyme anpassen.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der Serinreste von PDH zeigen die niedrigsten Werte in Zellen, die in der G2/M-Phase fixiert wurden, was, verglichen mit der G1- und S-Phase, auf die höchste PDH-Aktivität innerhalb dieser Zellzyklusphase hindeutet (Abb. 68).

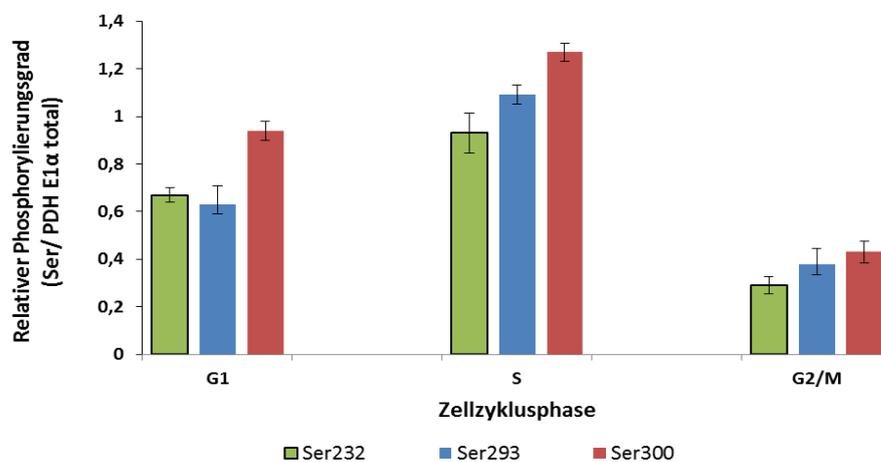


Abb. 68: Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von PDH in CHO-K1 Zellen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2/M-Phase).

Dargestellt ist der relative Phosphorylierungsgrad gemessen als das Signal der Serinreste normiert auf das bestimmte PDH-Level. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte (n=3).

Während der S-Phase wurden die höchsten Werte für die PDH-Phosphorylierung bestimmt. Hier liegt der relative Phosphorylierungsgrad um rund 65 bis 69 % über den Werten der G2/M-Phase. Im Vergleich dazu ist der bestimmte Phosphorylierungsgrad in der G1-Phase zwischen 40 bis 56 % höher als während der G2/M-Phase. Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die PDH-Aktivität in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen reguliert wird. Die Regulation der PDH-Aktivität konnte auch während der Batch-Kultivierung von Mischpopulationen beobachtet werden (vergleiche Abb. 44). Hieran zeigt sich, dass sowohl die Kultivierungsbedingungen und die Substratverfügbarkeit, als auch die jeweiligen Zellzyklusphasen einen maßgeblichen Einfluss auf die metabolische Aktivität und deren Regulation haben.

4.3.4.4 Zusammenfassende Diskussion

Ein Ziel dieser Versuchsreihe bestand in der Kultivierung synchronisierter Zellen. Durch systembiologische Untersuchungen der synchron wachsenden Zellen sollte hierbei der Einfluss der einzelnen Zellzyklusphasen auf das Wachstumsverhalten und den Metabolismus herausgestellt werden. Mit Hilfe der Methode der zentrifugalen Elutriation konnten CHO-K1 Zellfraktionen mit hohem Synchronitätsgrad bis zu 95 % (G1), 57 % (S) und 78 % (G2/M) aus Mischpopulationen separiert werden. Die synchronisierten Zellfraktionen konnten nach der Elutriation erfolgreich weiter kultiviert werden, ohne dass eine Beeinträchtigung der Zellviabilität zu verzeichnen war. Synchrones Zellwachstum konnte für zwei Kultivierungen beobachtet werden, bei denen der Reaktor einerseits mit Zellen angeimpft wurde, die in der G1-Phase angereichert wurden und andererseits mit überwiegend Zellen aus der S-Phase. Hierbei konnte sowohl ein stufenförmiges Wachstumsprofil der Zellpopulation beobachtet werden, als auch eine deutliche Oszillation der Zellzyklusphasen- sowie der Zellgrößenverteilung über einen Kultivierungsverlauf von etwa 50 h. Allerdings konnte die Synchronität nicht über einen längeren Zeitraum aufrecht gehalten werden. Ein Grund dafür liegt in den unkonstanten Kultivierungsbedingungen, die sich im Laufe der Batch-Kultivierung stetig ändern und eine Anpassung der Zellen fordern. Möglicherweise ließe sich ein synchrones Wachstum während eines kontinuierlichen Kultivierungsbetriebes über einen längeren Zeitraum realisieren. Wie bereits während der Batch- und kontinuierlichen Kultivierungen konnte durch die Integration eines *at-line* Mikroskops an den Bioreaktor eine permanente Überwachung der Zellkultur über die Analyse von Bildaufnahmen erfolgen. Eine gleichzeitige computerbasierte Bestimmung des mittleren Zelldurchmessers während der Kultivierung könnte den Einsatz des *at-line* Mikroskops zu einem bedeutenden Werkzeug für die Untersuchung des zellzyklusabhängigen Metabolismus und dessen Populationsdynamiken werden lassen. Durch regelmäßige, manuelle Probenahmen konnten zusätzlich Daten erhalten werden, die einen Rückschluss über die Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität und der Verteilung mitochondrialer Proteine von den jeweiligen Zellzyklusphasen geben können. Hier konnte durch deutlich erhöhte Verbrauchsraten der Hauptsubstrate Glukose und L-Glutamin in der S-Phase und eine versetzt eintretende erhöhte Bildung von Laktat während der G1-Phase, eine Zellzyklusabhängigkeit des Metabolismus gezeigt werden. Die Korrelation des Proliferationsverhaltens und der metabolischen Aktivität der Zellen konnte hier auch durch

den stufenartigen Substratverbrauch gezeigt werden. Zusätzlich konnte eine Abnahme der mitochondrialen Proteinclusterdichte von PDH und OGDH und gleichzeitig eine Zunahme des relativen Proteingehalts im Laufe des Zellzyklus (von G1-, über S-, zur G2/M-Phase) beobachtet werden, was zeigt, dass auch auf Proteinebene eine Zellzyklusabhängigkeit besteht. Für die hier durchgeführten Untersuchungen der Proteinverteilung und des relativen Proteingehalts in Abhängigkeit des Zellzyklus wurden CHO-K1 Zellen eingesetzt, die ausnahmslos mittels zentrifugaler Elutriation aus der gleichen Mischpopulation während der exponentiellen Wachstumsphase in den jeweiligen Zellzyklusphasen angereichert wurden. In fortführenden Untersuchungen sollten ebenfalls Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen und ebenso Zellen, nach Anpassung an den kontinuierlichen Kultivierungsbetrieb entsprechend ihrer Zellzyklusphasen analysiert werden. Darüber hinaus muss bei allen hier durchgeführten Untersuchungen beachtet werden, dass trotz der Anreicherung in den jeweiligen Zellzyklusphasen, keine vollständig homogenen Zellpopulationen vorlagen. Dennoch zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse, dass für systembiologische Untersuchungen die Kultivierung synchronisierter Zellen entscheidende Informationen liefern kann, da hierdurch neben der Abhängigkeit von den herrschenden physiologischen Bedingungen auch der Einfluss des Zellzyklus auf den Metabolismus betrachtet werden kann.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch neue experimentelle Methoden und Technologien die Hindernisse bei der Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus tierischer Zellen überwunden werden. Um dieses Ziel erreichen zu können, sollte durch die Trennung der zytosolischen und mitochondrialen Kompartimente eine separate Bestimmung der Metaboliten ermöglicht werden. Die Isolation und Separation der Mitochondrien wurden zunächst im Labormaßstab durchgeführt. Hierbei wurden vier verschiedene Zellaufschlussmethoden (Dounce-Homogenisation, Ultraschallbehandlung, Elektroporation und Digitonin-Inkubation) getestet und ihr Einfluss auf den Isolationserfolg und die Integrität der Mitochondrien verglichen. Durch den Einsatz von Ultraschall konnte eine Proteinmenge von $14,0 \pm 0,3$ mg in der isolierten Mitochondrienfraktion bestimmt werden, die aus insgesamt 10^8 CHO-K1 Zellen erhalten wurde. Hierbei wurden für die äußeren Mitochondrienmembranen Integritäten von etwa 67 % bestimmt, während sogar rund 94 % der inneren Membranen intakt geblieben waren. Sowohl hinsichtlich der Ausbeute als auch der erhaltenen Mitochondrienintegrität konnten durch die Ultraschall-Methode deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden als durch die Dounce-Homogenisation, dem eigentlichen Standardverfahren für die Isolation von Organellen. Dem gegenüber erwiesen sich der Zellaufschluss durch Elektroporation oder Digitonin als deutlich schonendere Varianten im Vergleich zur Ultraschall- oder Dounce-Homogenisation (≥ 85 % Integrität der äußeren Mitochondrienmembranen). Allerdings waren die Ausbeuten isolierter Mitochondrien hierbei nur sehr gering. Als Ursache hierfür konnte gezeigt werden, dass die Zellen zwar sowohl bei der Elektroporation als auch durch Digitonin vollständig permeabilisiert wurden, die Beschädigungen der Zellmembranen jedoch zu gering waren, um eine effiziente Freisetzung der Mitochondrien zu ermöglichen. Isolierte Mitochondrien werden für zahlreiche Analysen innerhalb der medizinischen Forschung oder für systembiologische Untersuchungen in den Bereichen der Proteomics oder Metabolomics eingesetzt [158, 191, 197, 202]. Da der Zellaufschluss mittels Ultraschall prinzipiell auch auf andere Zelllinien übertragbar ist, könnte sich diese Methode möglicherweise zu einer bevorzugten Zellaufschlussmethode für die Isolation von Mitochondrien oder anderer Organellen im Labormaßstab entwickeln.

Auch wenn der Einsatz von Elektroporation oder Digitonin hingegen nicht für die Untersuchung isolierter Mitochondrienproben geeignet zu sein scheinen, konnte die schonende und selektive Permeabilisierung der Zellmembranen dennoch ein großes Potential für die Realisierung der Analyse des kompartimentierten Metabolismus aufzeigen. Durch die Permeabilisierung mittels Digitonin (0,01 % (w/v)) konnte innerhalb von 10 s ein Austritt des Zytosols aus den Zellen beobachtet werden, während die intakten Mitochondrien gebunden an das Zytoskelett zurück blieben. Auf diese Weise konnte ebenfalls eine Separation des zytosolischen vom mitochondrialen Kompartiment erzielt werden. Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse wurde parallel zu den makroskopischen Methoden als Kooperationsprojekt ein mikrofluidisches System entwickelt, das innerhalb weniger Sekunden eine vollständige Probenverarbeitung, einschließlich Zellaufschluss und Separation der Mitochondrienfraktionen, für metabolische Analysen der zytosolischen und mitochondrialen Kompartimente ermöglichen sollte. Ein Prototyp des konzipierten LoAC wurde innerhalb dieser Arbeit erfolgreich in einen Bioreaktor für tierische Zellkultivierung integriert und über eine Gesamtdauer von 18 h betrieben. Durch das Anlegen eines Überdrucks auf den Bioreaktor konnte hierbei eine pulsationsfreie, definierte, schnelle und kontinuierliche Probenahme realisiert werden. Experimente konnten zeigen, dass intakte CHO-K1 Zellen mit diesem Mikrochipssystem sehr effizient und reproduzierbar von ihrem Kulturmedium in ein neues Medium überführt und so von den extrazellulären Metaboliten separiert werden können. Darüber hinaus konnte der gewählte Versuchsaufbau eine Inkubation der Zellen für zwei verschiedene, definierte Zeiträume (9 s und 18 s) ermöglichen. Diese Funktion konnte für die Durchführung von dynamischen Glukose- und Glutamin-Pulsexperimenten und für die definierte chemische Lyse der Zellen mittels Digitonin erfolgreich getestet werden. Durch eine geeignete Analytik (μ -TAS), die im Idealfall direkt an den Ausgängen des Mikrosystems angeschlossen werden kann, könnten somit auch zeitliche Veränderungen im Metabolom als Folge äußerer Einwirkungen (z.B. Reaktion von Substratpuls auf Substratmangel) kontinuierlich untersuchbar werden. Eine derartige *on-chip* Analyse stellt daher eine ideale Ergänzung des mikrofluidischen Systems für zukünftige Untersuchungen dar, konnte bislang jedoch noch nicht realisiert werden. Im Zuge dieser Arbeit konnte die Anwendung des integrierten LoAC ebenfalls für die selektive Permeabilisierung von CHO Zellen erfolgreich demonstriert werden. Die Zellyse mittels Digitonin und die anschließende Abtrennung des freigesetzten Zytosols von den

verbleibenden zellulären und mitochondrialen Kompartimenten mit Hilfe des integrierten LoaC erwiesen ebenfalls großes Potential, um die Limitierungen der Analyse des kompartimentierten Metabolismus zu überwinden. Aufgrund der direkten Implementierung des Mikrochips in den laufenden Kultivierungsprozess ermöglicht dieses System sowohl Analysen unter physiologischen als auch dynamischen Bedingungen. Gleichzeitig können zeitliche Limitierungen durch das mikrofluidische System überwunden werden, denen die Methoden im herkömmlichen Labormaßstab aufgrund der hohen metabolischen Umsatzraten nicht gerecht werden können. Damit bildet das verwendete Mikrochip-Bioreaktor-System einen Lösungsansatz zur Untersuchung des *in vivo* Zustandes tierischer Suspensionszellen. Allerdings werden der Zustand und die Aktivität einer jeden Zelle maßgeblich von den Kultivierungsbedingungen und dem Zellzyklus beeinflusst, weshalb für vergleichbare und aussagekräftige metabolomische Analysen geregelte, reproduzierbare und homogene Versuchsbedingungen geschaffen werden müssen. Daher sollten im Zuge dieser Arbeit verschiedene Kultivierungsvarianten für die CHO Zellen in einem geregelten Kleinmaßstabbioreaktor getestet werden. Durch systembiologische Untersuchungen der Zellen sollten dabei grundlegende Informationen über das Wachstumsverhalten, den Metabolismus und die Dynamik der mitochondrialen Verteilung während der Kultivierungsverläufe erhalten werden. Neben Batch- und kontinuierlichen Kultivierungen von Mischpopulationen konnten innerhalb dieser Arbeit ebenfalls zwei Kultivierungen Zellzyklusphasen-synchronisierter CHO Zellen erfolgreich durchgeführt werden. Die Synchronisation der Mischpopulation wurde dabei durch Elutriation mittels Gegenstromzentrifugation realisiert und anhand von durchflusszytometrischen Analysen der Zellzyklusphasenverteilung überprüft. Anders als bei den Batch-Kultivierungen von Mischpopulationen zeigten die synchronen Kultivierungen ein stufenförmiges Proliferationsverhalten, stufenförmige Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen sowie damit korrelierend ein oszillierendes Profil der spezifischen Wachstumsrate. Die Morphologie und Verteilung der Mitochondrien wurde innerhalb dieser Arbeit erstmals in CHO Suspensionszellen durch hochauflösende STED-Mikroskopie analysiert. Durch diese Methode konnte die submitochondriale Verteilung des mitochondrialen Transportproteins Tom20 sowie der zentralen Enzyme des Pyruvatmetabolismus PDH und OGDH visualisiert werden. Hierbei wurde einerseits eine Abhängigkeit der Mitochondrienmorphologie und der mitochondrialen Proteine von den verschiedenen Kultivierungs-

phasen beobachtet, was sich unter anderem durch hohe Dichten der Proteincluster während des exponentiellen Wachstums und erniedrigte Proteindichten innerhalb der Absterbephase der Zellen zeigte. Andererseits konnte durch die vorherige Synchronisation der Zellen auch eine deutliche Zellzyklusabhängigkeit der Mitochondrienmorphologie und mitochondrialen Proteinverteilung gezeigt werden, die in einen direkten Zusammenhang mit der Entwicklung der Zelle und den veränderten Energieansprüchen während des Zellzyklus gebracht werden kann. Gleichzeitige Messungen des relativen intrazellulären PDH- und OGDH-Gehalts durch direkte immunochemische Detektion mittels In-Cell ELISA konnten ebenfalls zeigen, dass sich der Enzymgehalt sowohl in Abhängigkeit des Zellzyklus als auch der verschiedenen Wachstumsphasen dynamisch verändert. Interessanterweise konnten beim Vergleich der mitochondrialen Analysen von Mischpopulationen während der kontinuierlichen Kultivierung mit denen, während der exponentiellen Wachstumsphase der Batch-Kultivierung deutliche Unterschiede hinsichtlich des relativen Enzymgehalts festgestellt werden, die möglicherweise durch eine Adaption der Zellen an die quasi konstant bleibenden Kultivierungsbedingungen begründet sein könnten. Dieser Aspekt macht deutlich, wie zahlreich die Faktoren sind, die einen Einfluss auf die Dynamik der Mitochondrien, der in ihnen lokalisierten Proteine und letztendlich auf die metabolische Aktivität haben. Dies zeigt umso mehr, dass für systembiologische Untersuchungen die Kultivierung synchronisierter Zellen entscheidende Informationen liefern kann, da hierdurch neben der Abhängigkeit von den herrschenden physiologischen Bedingungen gleichzeitig der Einfluss des Zellzyklus auf den Metabolismus betrachtet werden kann. In diesem Zusammenhang könnte die gleichzeitige Implementierung des innerhalb dieser Arbeit evaluierten LoaC dynamische Pulsexperimente ermöglichen, so dass die Auswirkungen auf die Stoffflüsse innerhalb verschiedener Zellzyklusphasen untersucht werden könnten. Da das mikrofluidische System das Potential besitzt, einen selektiven Zellaufschluss und die Separation der mitochondrialen und zytosolischen Kompartimente zu erzielen, könnte dessen Einsatz während einer synchronen Kultivierung zukünftig auch eine Untersuchung des kompartimentierten Metabolismus in Abhängigkeit des Zellzyklus ermöglichen. Darüber hinaus könnten die innerhalb dieser Arbeit generierten Daten einen entscheidenden Faktor für die Modellierung des Pyruvatstoffwechsels aber auch für metabolische Flussanalysen bilden.

6 Literaturverzeichnis

1. Bernardi, P.; Scorrano, L.; Colonna, R.; Petronilli, V.; Di Lisa, F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 687–701.
2. Duchen, M.R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* **2004**, *25*, 365–451.
3. Takuma, K.; Yan, S.S.; Stern, D.M.; Yamada, K. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Sci.* **2005**, *97*, 312–316.
4. Skulachev, V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol. Aspects Med.* **1999**, *20*, 139–184.
5. Wallace, D.C. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science* **1999**, *283*, 1482–1488.
6. Irving, B.A.; Sreekumaran Nair, K. Aging and diabetes: Mitochondrial dysfunction. *Curr Diab Rep* **2007**, *7*, 249–251.
7. Groussac, E.; Ortiz, M.; François, J. Improved protocols for quantitative determination of metabolites from biological samples using high performance ionic-exchange chromatography with conductimetric and pulsed amperometric detection. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, *26*, 715–723.
8. Fell, D. Understanding the control of metabolism, 1st ed; *Portland Press; Distributed by Ashgate Pub. Co.* in North America: London, Miami, Brookfield, **1997**.
9. Tsutsui, H.; Ho, C.-M. Cell separation by non-inertial force fields in microfluidic systems. *Mechanics Research Communications* **2009**, *36*, 92–103.
10. Kuntaegowdanahalli, S.S.; Bhagat, A.A.S.; Kumar, G.; Papautsky, I. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab Chip* **2009**, *9*, 2973.
11. Whitesides, G.M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **2006**, *442*, 368–373.
12. Beebe, D.J.; Mensing, G.A.; Walker, G.M. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 261–286.

13. Tabeling, P. Introduction to microfluidics; *Oxford University Press: Oxford, New York*, **2010**.
14. El-Ali, J.; Sorger, P.K.; Jensen, K.F. Cells on chips. *Nature* **2006**, *442*, 403–411.
15. Antranikian, G., Ed. Angewandte Mikrobiologie. *Springer: Berlin*, **2006**.
16. Krämer, I.; Jelkmann, W. Rekombinante Arzneimittel: Medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie. 2nd ed; *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, **2011**.
17. Davis, P.K.; Ho, A.; Dowdy, S.F. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *BioTechniques* **2001**, *30*, 1322-6, 1328, 1330-1.
18. Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* **2010**, *28*, 917–924.
19. Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* **2004**, *22*, 1393–1398.
20. Hossler, P.; Khattak, S.F.; Li, Z.J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* **2009**, *19*, 936–949.
21. Butler, M. Animal cell culture and technology, 2nd ed; *BIOS Scientific Publishers: London, New York*, **2004**.
22. Butler, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 283–291.
23. Kim, J.Y.; Kim, Y.-G.; Lee, G.M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **2012**, *93*, 917–930.
24. Martínez, J.L.; Liu, L.; Petranovic, D.; Nielsen, J. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 965–971.
25. Xie, L.; Zhou, W.; Robinson, D. Protein production by large-scale mammalian cell culture. In: *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Elsevier*, **2003**, pp. 605–623.
26. Zeng, A.-P. Quantitative assessment of cell density effect on the metabolism and antibody production rate of hybridoma cells at high cell density. *Journal of Biotechnology* **1996**, *45*, 243–251.
27. Gellissen, G. Production of recombinant proteins: Novel microbial and eukaryotic expression systems, 1st ed; *Wiley-VCH: Weinheim*, **2005**.

-
28. Ferrer-Miralles, N.; Domingo-Espín, J.; Corchero, J.; Vázquez, E.; Villaverde, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact* **2009**, *8*, 17.
 29. Jenkins, N.; Parekh, R.B.; James, D.C. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* **1996**, *14*, 975–981.
 30. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
 31. Walsh, G.; Jefferis, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 1241–1252.
 32. Cumming, D.A. Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology* **1991**, *1*, 115–130.
 33. Pellicer, A. The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells. *Cell* **1978**, *14*, 133–141.
 34. Puck, T.T. Development of the Chinese hamster ovary (CHO) cell. *Molecular Cell Genetics* **1985**, 37–67.
 35. Jayapal, K.P.; Wlaschin, K.F.; Hu, W.; Yap, M.G.S. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* **2007**, 40–47.
 36. Urlaub, G.; Chasin, L.A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 4216–4220.
 37. Hu, Z.; Guo, D.; Yip, S.S.M.; Zhan, D.; Misaghi, S.; Joly, J.C.; Snedecor, B.R.; Shen, A.Y. Chinese hamster ovary (CHO) K1 host cell enables stable cell line development for antibody molecules which are difficult to express in DUXB11-derived dihydrofolate reductase (DHFR) deficient host cell. *Biotechnol. Prog.* **2013**.
 38. Liu, C.-H.; Chu, I.-M.; Hwang, S.-M. Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for CHO cells. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 314–321.
 39. Pak, S.C.; Hunt, S.M.; Bridges, M.W.; Sleigh, M.J.; Gray, P.P. Super-CHO-A cell line capable of autocrine growth under fully defined protein-free conditions. *Cytotechnology* **1996**, *22*, 139–146.
 40. Ozturk, S.S.; Hu, W.-S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies; *Taylor & Francis: Boca Raton, FL*, **2005**.
 41. Zeng, A.P. A kinetic model for product formation of microbial and mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*, 314–324.

-
42. Mulukutla, B.C.; Khan, S.; Lange, A.; Hu, W.-S. Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 476–484.
43. Altamirano, C.; Berrios, J.; Vergara, M.; Becerra, S. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electron. J. Biotechnol.* **2013**, *16*.
44. Altamirano, C.; Paredes, C.; Cairó, J.J.; Gòdia, F. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 69–75.
45. Ahn, W.S.; Antoniewicz, M.R. Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. *Biotechnology Journal* **2012**, *7*, 61–74.
46. Dietmair, S.; Hodson, M.P.; Quek, L.-E.; Timmins, N.E.; Chrysanthopoulos, P.; Jacob, S.S.; Gray, P.; Nielsen, L.K. Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1404–1414.
47. Bonk, S.; Sandor, M.; Rüdinger, F.; Tscheschke, B.; Prediger, A.; Babitzky, A.; Solle, D.; Beutel, S.; Scheper, T. In-situ microscopy and 2D fluorescence spectroscopy as online methods for monitoring CHO cells during cultivation. *BMC Proc* **2011**, *5 Suppl 8*, P76.
48. Höpfner, T.; Bluma, A.; Rudolph, G.; Lindner, P.; Scheper, T. A review of non-invasive optical-based image analysis systems for continuous bioprocess monitoring. *Bioprocess Biosyst Eng* **2010**, *33*, 247–256.
49. Suhr, H.; Wehnert, G.; Schneider, K.; Bittner, C.; Scholz, T.; Geissler, P.; Jähne, B.; Scheper, T. In situ microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *47*, 106–116.
50. Opitz, B.; Prediger, A.; Lüder, C.; Eckstein, M.; Hilterhaus, L.; Lindner, P.; Beutel, S.; Scheper, T.; Liese, A. In Situ Microscopy for In-line Monitoring of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8121–8126.
51. Párta, L.; Zalai, D.; Borbély, S.; Putics, A. Application of dielectric spectroscopy for monitoring high cell density in monoclonal antibody producing CHO cell cultivations. *Bioprocess Biosyst Eng* **2013**.

-
52. Pascut, F.C.; Kalra, S.; George, V.; Welch, N.; Denning, C.; Notingher, I. Non-invasive label-free monitoring the cardiac differentiation of human embryonic stem cells in-vitro by Raman spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3517–3524.
53. Hantelmann, K.; Kolleyer, M.; Hüll, D.; Hitzmann, B.; Scheper, T. Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a novel approach for controlling fed-batch cultivations. *J. Biotechnol.* **2006**, *121*, 410–417.
54. Joeris, K.; Frerichs, J.-G.; Konstantinov, K.; Scheper, T. In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures. *Cytotechnology* **2002**, *38*, 129–134.
55. Akin, M.; Prediger, A.; Yuksel, M.; Höpfner, T.; Demirkol, D.O.; Beutel, S.; Timur, S.; Scheper, T. A new set up for multi-analyte sensing: at-line bio-process monitoring. *Biosens Bioelectron* **2011**, *26*, 4532–4537.
56. Mark, D.; Haeberle, S.; Roth, G.; Stetten, F. von; Zengerle, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 1153–1182.
57. Haeberle, S.; Zengerle, R. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip* **2007**, *7*, 1094–1110.
58. Auroux, P.-A.; Iossifidis, D.; Reyes, D.R.; Manz, A. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2637–2652.
59. Reyes, D.R.; Iossifidis, D.; Auroux, P.-A.; Manz, A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2623–2636.
60. Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1990**, *1*, 244–248.
61. Harrison, D.J.; Manz, A.; Fan, Z.; Luedi, H.; Widmer, H.M. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1926–1932.
62. Velve-Casquillas, G.; Le Berre, M.; Piel, M.; Tran, P.T. Microfluidic tools for cell biological research. *Nano Today* **2010**, *5*, 28–47.
63. Squires, T.; Quake, S. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 977–1026.

-
64. Stone, H.; Stroock, A.; Ajdari, A. Engineering Flows in small Devices. *Annual Review of Fluid Mechanics* **2004**, *36*, 381–411.
65. Whitesides, G.M. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1161–1165.
66. Wang, Q.-Z.; Wu, C.-Y.; Chen, T.; Chen, X.; Zhao, X.-M. Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 151–161.
67. Wang, J.; Ren, L.; Li, L.; Liu, W.; Zhou, J.; Yu, W.; Tong, D.; Chen, S. Microfluidics: a new cosset for neurobiology. *Lab Chip* **2009**, *9*, 644–652.
68. Vanapalli, S.A.; Duits, M.H.G.; Mugele, F. Microfluidics as a functional tool for cell mechanics. *Biomicrofluidics* **2009**, *3*, 12006.
69. Zhang, Q.; Austin, R.H. Applications of Microfluidics in Stem Cell Biology. *BioNanoSci.* **2012**, *2*, 277–286.
70. Dittrich, P.S.; Manz, A. Single-molecule fluorescence detection in microfluidic channels—the Holy Grail in μ TAS? *Anal Bioanal Chem* **2005**, *382*, 1771–1782.
71. Witters, D.; Knez, K.; Ceysens, F.; Puers, R.; Lammertyn, J. Digital microfluidics-enabled single-molecule detection by printing and sealing single magnetic beads in femtoliter droplets. *Lab Chip* **2013**, *13*, 2047–2054.
72. Kim, S.; Huang, B.; Zare, R.N. Microfluidic separation and capture of analytes for single-molecule spectroscopy. *Lab Chip* **2007**, *7*, 1663.
73. Wurm, M.; Schöpke, B.; Lutz, D.; Müller, J.; Zeng, A.-P. Microtechnology meets systems biology: the small molecules of metabolome as next big targets. *J. Biotechnol.* **2010**, *149*, 33–51.
74. Mao, S.; Gao, D.; Liu, W.; Wei, H.; Lin, J.-M. Imitation of drug metabolism in human liver and cytotoxicity assay using a microfluidic device coupled to mass spectrometric detection. *Lab Chip* **2011**, *12*, 219.
75. Chen, Q.; Wu, J.; Zhang, Y.; Lin, J.-M. Qualitative and Quantitative Analysis of Tumor Cell Metabolism via Stable Isotope Labeling Assisted Microfluidic Chip Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1695–1701.
76. Wurm, M. Development of an integrated microfluidic system for metabolomic analysis of mammalian cells. *mbv, Mensch-und-Buch-Verl.: Berlin*, **2011**.

-
77. Wurm, M.; Zeng, A.-P. Mechanical disruption of mammalian cells in a microfluidic system and its numerical analysis based on computational fluid dynamics. *Lab Chip* **2012**, *12*, 1071–1077.
78. Hayflick, L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry Mosc.* **1997**, *62*, 1180–1190.
79. Hauser, H.; Wagner, R. Mammalian cell biotechnology in protein production. *Walter de Gruyter: Berlin, New York*, **1997**.
80. Ozturk, S.S.; Hu, W.-S. Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. *Taylor & Francis: Boca Raton*, **2005**.
81. Quek, L.-E.; Dietmair, S.; Krömer, J.O.; Nielsen, L.K. Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metab. Eng.* **2010**, *12*, 161–171.
82. Zeng, A.P.; Deckwer, W.D.; Hu, W.S. Determinants and rate laws of growth and death of hybridoma cells in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 642–654.
83. Zeng, A.P.; Hu, W.S.; Deckwer, W.D. Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 434–441.
84. Gibala, M.J.; Young, M.E.; Taegtmeyer, H. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **2000**, *168*, 657–665.
85. Akram, M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**.
86. Stryer, L.; Berg, J.M.; Tymoczko, J.L. Biochemistry. *5th ed*; *W H Freeman: New York*, **2002**
87. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033.
88. Zheng, J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett* **2012**.
89. Lunt, S.Y.; Vander Heiden, M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 441–464.

-
90. Lanks, K.W.; Li, P.W. End products of glucose and glutamine metabolism by cultured cell lines. *J. Cell. Physiol.* **1988**, *135*, 151–155.
 91. Petch, D.; Butler, M. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. *J. Cell. Physiol.* **1994**, *161*, 71–76.
 92. Chen, K.; Liu, Q.; Xie, L.; Sharp, P.A.; Wang, D.I. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *72*, 55–61.
 93. Ozturk, S.S.; Palsson, B.O. Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 989–993.
 94. Lao, M.S.; Toth, D. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*, 688–691.
 95. Warburg, O.; Posener, K.; Negelein, E. Über den Stoffwechsel der Karzinomzelle. *Biochem. Zeitschr.* **1924**, *152*, 309–344.
 96. Kiebish, M.A.; Han, X.; Cheng, H.; Chuang, J.H.; Seyfried, T.N. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *The Journal of Lipid Research* **2008**, *49*, 2545–2556.
 97. Fitzpatrick, L.; Jenkins, H.A.; Butler, M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1993**, *43*, 93–116.
 98. Vriezen, N.; van Dijken, J.P. Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cells grown in chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 28–39.
 99. Neermann, J.; Wagner, R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J. Cell. Physiol.* **1996**, *166*, 152–169.
 100. Macheda, M.L.; Rogers, S.; Best, J.D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *202*, 654–662.
 101. Cruz, H.J.; Moreira, J.L.; Carrondo, M.J. Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *66*, 104–113.

-
102. Tsao, Y.-S.; Cardoso, A.G.; Condon, R.G.G.; Voloch, M.; Lio, P.; Lagos, J.C.; Kearns, B.G.; Liu, Z. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *J. Biotechnol.* **2005**, *118*, 316–327.
103. Luo, J.; Vijayasankaran, N.; Autsen, J.; Santuray, R.; Hudson, T.; Amanullah, A.; Li, F. Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 146–156.
104. Ma, N.; Ellet, J.; Okediadi, C.; Hermes, P.; McCormick, E.; Casnocha, S. A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism. *Biotechnol. Progress* **2009**, *25*, 1353–1363.
105. Zagari, F.; Jordan, M.; Stettler, M.; Broly, H.; Wurm, F.M. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N Biotechnol* **2013**, *30*, 238–245.
106. Bringham, M.P.; Zachar, Z. The Pyruvate Dehydrogenase Complex in Cancer: Implications for the Transformed State and Cancer Chemotherapy. *Dehydrogenases; Canuto, R.A., Ed.: InTech*, **2012**.
107. Modak, J.; Deckwer, W.-D.; Zeng, A.-P. Metabolic control analysis of eucaryotic pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1157–1169.
108. Patel, M.S.; Roche, T.E. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* **1990**, *4*, 3224–3233.
109. Zeng, A.-P.; Modak, J.; Deckwer, W.-D. Nonlinear dynamics of eucaryotic pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: decarboxylation rate, oscillations, and multiplicity. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1265–1276.
110. Patel, M.S.; Korotchkina, L.G. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp. Mol. Med.* **2001**, *33*, 191–197.
111. Patel, M.S.; Korotchkina, L.G. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 217–222.
112. Strumiło, S. Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochim. Pol.* **2005**, *52*, 759–764.

-
113. Reitzer, L.J.; Wice, B.M.; Kennell, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 2669–2676.
 114. Zielke, H.R.; Zielke, C.L.; Ozand, P.T. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed. Proc.* **1984**, *43*, 121–125.
 115. Curthoys, N.P.; Watford, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **1995**, *15*, 133–159.
 116. Heitmann, M. Vergleichende Untersuchung des Wachstums und des Metabolismus von Chinese-Hamster-Ovary-Zellen in Kulturen bei niedrigen und hohen Zelldichten; *Logos-Verl: Berlin*, **2012**.
 117. Eibl, R. Cell and tissue reaction engineering; *Springer: Berlin*, **2009**.
 118. Yang, M.; Butler, M. Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 370–380.
 119. Schneider, M.; Marison, I.W.; Stockar, U. von. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.* **1996**, *46*, 161–185.
 120. Zeng, A.P.; Deckwer, W.D. Mathematical modeling and analysis of glucose and glutamine utilization and regulation in cultures of continuous mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *47*, 334–346.
 121. Lanks, K.W. Glutamine is responsible for stimulating glycolysis by L929 cells. *J. Cell. Physiol.* **1986**, *126*, 319–321.
 122. Le, A.; Lane, A.N.; Hamaker, M.; Bose, S.; Gouw, A.; Barbi, J.; Tsukamoto, T.; Rojas, C.J.; Slusher, B.S.; Zhang, H.; *et al.* Glucose-Independent Glutamine Metabolism via TCA Cycling for Proliferation and Survival in B Cells. *Cell Metabolism* **2012**, *15*, 110–121.
 123. Martinelle, K.; Doverskog, M.; Jacobsson, U.; Chapman, B.E.; Kuchel, P.W.; Häggström, L. Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: evidence from ¹H/¹⁵N NMR. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 508–517.
 124. Oizumi, J.; Ng, W.G.; Donnell, G.N. Pyruvate carboxylase defect: metabolic studies on cultured skin fibroblasts. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1986**, *9*, 120–128.
 125. Marquis, C.P.; Barford, J.P.; Harbour, C.; Fletcher, A. Carbohydrate and amino acid metabolism during batch culture of a human lymphoblastoid cell line, BTSN6. *Cytotechnology* **1996**, *21*, 121–132.

-
126. Wagner, R.; Ryll, T.; Krafft, H.; Lehmann, J. Variation of amino acid concentrations in the medium of HU β -IFN and HU IL-2 producing cell lines. *Cytotechnology* **1988**, *1*, 145–150.
127. Kyriakopoulos, S.; Polizzi, K.M.; Kontoravdi, C. Comparative analysis of amino acid metabolism and transport in CHO variants with different levels of productivity. *J. Biotechnol.* **2013**.
128. Nicolae, A.; Wahrheit, J.; Bahnemann, J.; Zeng, A.-P.; Heinzle, E. Non-stationary ^{13}C metabolic flux analysis of Chinese hamster ovary cells in batch culture using extracellular labeling highlights metabolic reversibility and compartmentation. *BMC Systems Biology* **2014**.
129. Zamboni, N. ^{13}C metabolic flux analysis in complex systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 103–108.
130. Niklas, J.; Sandig, V.; Heinzle, E. Metabolite channeling and compartmentation in the human cell line AGE1.HN determined by ^{13}C labeling experiments and ^{13}C metabolic flux analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *112*, 616–623.
131. van Dien, S.; Schilling, C.H. Bringing metabolomics data into the forefront of systems biology. *Mol Syst Biol* **2006**, *2*.
132. Chuang, H.-Y.; Hofree, M.; Ideker, T. A Decade of Systems Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 721–744.
133. Dietmair, S.; Nielsen, L.K.; Timmins, N.E. Mammalian cells as biopharmaceutical production hosts in the age of omics. *Biotechnology Journal* **2012**, *7*, 75–89.
134. Berlec, A.; Štrukelj, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2013**, *40*, 257–274.
135. Ahn, W.S.; Jeon, J.-J.; Jeong, Y.-R.; Lee, S.J.; Yoon, S.K. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 1234–1244.
136. Yoon, S.K.; Song, J.Y.; Lee, G.M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82*, 289–298.

-
137. Zhu, M.M.; Goyal, A.; Rank, D.L.; Gupta, S.K.; Vanden Boom, T.; Lee, S.S. Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 70–77.
138. Chee Fung Wong, D.; Tin Kam Wong, K.; Tang Goh, L.; Kiat Heng, C.; Gek Sim Yap, M. Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *89*, 164–177.
139. Khattak, S.F.; Xing, Z.; Kenty, B.; Koyrakh, I.; Li, Z.J. Feed development for fed-batch CHO production process by semisteady state analysis. *Biotechnol. Prog.* **2010**, *26*, 797–804.
140. Kim, S.H.; Lee, G.M. Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 659–665.
141. Dorai, H.; Kyung, Y.S.; Ellis, D.; Kinney, C.; Lin, C.; Jan, D.; Moore, G.; Betenbaugh, M.J. Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of Chinese Hamster Ovary cells in culture. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 592–608.
142. Datta, P.; Linhardt, R.J.; Sharfstein, S.T. An 'omics approach towards CHO cell engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 1255–1271.
143. Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Dunn, W.B.; Harrigan, G.G.; Kell, D.B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 245–252.
144. Ryan, D.; Robards, K. Metabolomics: The greatest omics of them all? *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7954–7958.
145. Khoo, S.H.G.; Al-Rubeai, M. Metabolomics as a complementary tool in cell culture. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2007**, *47*, 71–84.
146. Kell, D.B.; Goodacre, R. Metabolomics and systems pharmacology: why and how to model the human metabolic network for drug discovery. *Drug Discovery Today* **2013**.
147. Saks, V.; Beraud, N.; Wallimann, T. Metabolic Compartmentation – A System Level Property of Muscle Cells. *IJMS* **2008**, *9*, 751–767.
148. Buchholz, A.; Hurlebaus, J.; Wandrey, C.; Takors, R. Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol. Eng.* **2002**, *19*, 5–15.

-
149. Boghigian, B.A.; Seth, G.; Kiss, R.; Pfeifer, B.A. Metabolic flux analysis and pharmaceutical production. *Metab. Eng.* **2010**, *12*, 81–95.
 150. Niklas, J.; Schneider, K.; Heinzle, E. Metabolic flux analysis in eukaryotes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 63–69.
 151. Roessner, U.; Bowne, J. What is metabolomics all about? *Biotech.* **2009**, *46*, 363–365.
 152. Ellis, D.I.; Dunn, W.B.; Griffin, J.L.; Allwood, J.W.; Goodacre, R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* **2007**, *8*, 1243–1266.
 153. Villas-Bôas, S.G.; Rasmussen, S.; Lane, G.A. Metabolomics or metabolite profiles? *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 385–386.
 154. Stephanopoulos, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab. Eng.* **1999**, *1*, 1–11.
 155. Koffas, M.; Roberge, C.; Lee, K.; Stephanopoulos, G. Metabolic engineering. *Annu Rev Biomed Eng* **1999**, *1*, 535–557.
 156. Vo, T.D.; Palsson, B.O. Building the power house: recent advances in mitochondrial studies through proteomics and systems biology. *AJP: Cell Physiology* **2006**, *292*, C164.
 157. Scheffler, I.E. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **2001**, *1*, 3–31.
 158. Nagrath, D.; Caneba, C.; Karedath, T.; Bellance, N. Metabolomics for mitochondrial and cancer studies. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1807*, 650–663.
 159. Paschen, S.A.; Neupert, W. Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* **2001**, *52*, 101–112.
 160. Pfanner, N.; Meijer, M. Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Current Biology* **1997**, *7*, R100.
 161. Wurm, C.A.; Neumann, D.; Lauterbach, M.A.; Harke, B.; Egner, A.; Hell, S.W.; Jakobs, S. Nanoscale distribution of mitochondrial import receptor Tom20 is adjusted to cellular conditions and exhibits an inner-cellular gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 13546–13551.
 162. Tyler, D.D. The mitochondrion in health and disease; *VCH: New York*, **1992**.

-
163. Schmiedl, A.; Schnabel, P.A.; Mall, G.; Gebhard, M.M.; Hunneman, D.H.; Richter, J.; Bretschneider, H.J. The surface to volume ratio of mitochondria, a suitable parameter for evaluating mitochondrial swelling. Correlations during the course of myocardial global ischaemia. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **1990**, *416*, 305–315.
164. Quinlan, P.T.; Thomas, A.P.; Armston, A.E.; Halestrap, A.P. Measurement of the intramitochondrial volume in hepatocytes without cell disruption and its elevation by hormones and valinomycin. *Biochem. J.* **1983**, *214*, 395–404.
165. Perkins, G.; Frey, T. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* **2000**, *31*, 97–111.
166. Frey, T.G.; Mannella, C.A. The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, *25*, 319–324.
167. Frey, T.; Renken, C.; Perkins, G. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2002**, *1555*, 196–203.
168. Knowles, M.K. Cytoskeletal-assisted dynamics of the mitochondrial reticulum in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 14772–14777.
169. Jakobs, S. High resolution imaging of live mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 561–575.
170. Legros, F.; Lombès, A.; Frachon, P.; Rojo, M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 4343–4354.
171. Scott, I.; Logan, D.C. Mitochondrial Dynamics. In *Plant Mitochondria*; Kempken, F., Ed.; Springer New York, **2011**, pp. 31–63.
172. Bereiter-Hahn, J.; Vöth, M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* **1994**, *27*, 198–219.
173. Bereiter-Hahn, J.; Vöth, M.; Mai, S.; Jendrach, M. Structural implications of mitochondrial dynamics. *Biotechnol J* **2008**, *3*, 765–780.
174. Chan, D.C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 79–99.

-
175. Chen, H.; Chan, D.C. Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2004**, *59*, 119–144.
176. Devin, A.; Rigoulet, M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *AJP: Cell Physiology* **2006**, *292*, C52.
177. Irrcher, I.; Aleyasin, H.; Seifert, E.L.; Hewitt, S.J.; Chhabra, S.; Phillips, M.; Lutz, A.K.; Rousseaux, M.W.C.; Bevilacqua, L.; Jahani-Asl, A.; *et al.* Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Human Molecular Genetics* **2010**, *19*, 3734–3746.
178. Wang, C.; Youle, R.J. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 95–118.
179. Bernardi, P.; Petronilli, V.; Di Lisa, F.; Forte, M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends in Biochemical Sciences* **2001**, *26*, 112–117.
180. Tsujimoto, Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J. Cell. Physiol.* **2003**, *195*, 158–167.
181. Karbowski, M.; Youle, R.J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* **2003**, *10*, 870–880.
182. Desagher, S.; Martinou, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 369–377.
183. Oldiges, M.; Lütz, S.; Pflug, S.; Schroer, K.; Stein, N.; Wiendahl, C. Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, *76*, 495–511.
184. Wurm, M.; Zeng, A.-P. Mechanical disruption of mammalian cells in a microfluidic system and its numerical analysis based on computational fluid dynamics. *Lab Chip* **2012**, *12*, 1071.
185. Hartwig, S.; Feckler, C.; Lehr, S.; Wallbrecht, K.; Wolgast, H.; Müller-Wieland, D.; Kotzka, J. A critical comparison between two classical and a kit-based method for mitochondria isolation. *Proteomics* **2009**, *9*, 3209–3214.
186. Graham, J.M. Purification of a crude mitochondrial fraction by density-gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol* **2001**, *3*, Unit 3.4.
187. Frezza, C.; Cipolat, S.; Scorrano, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 287–295.

-
188. Wieckowski, M.R.; Giorgi, C.; Lebiedzinska, M.; Duszynski, J.; Pinton, P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* **2009**, *4*, 1582–1590.
189. Lu, H.; Gaudet, S.; Schmidt, M.A.; Jensen, K.F. A microfabricated device for subcellular organelle sorting. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5705–5712.
190. Ovádi, J.; Saks, V. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, *256-257*, 5–12.
191. Rajapakse, N.; Shimizu, K.; Payne, M.; Busija, D. Isolation and characterization of intact mitochondria from neonatal rat brain. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **2001**, *8*, 176–183.
192. Dounce, A.L.; Witter, R.F.; Monty, K.J.; Pate, S.; Cottone, M.A. A method for isolating intact mitochondria and nuclei from the same homogenate, and the influence of mitochondrial destruction on the properties of cell nuclei. *J Biophys Biochem Cytol* **1955**, *1*, 139–153.
193. Hunter, M.; Commerford, S. Pressure homogenization of mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* **1961**, *47*, 580–586.
194. Simpson, R.J. Disruption of Cultured Cells by Nitrogen Cavitation. *Cold Spring Harbor Protocols* **2010**, *2010*, pdb.prot5513.
195. Gottlieb, R.A.; Adachi, S. Nitrogen cavitation for cell disruption to obtain mitochondria from cultured cells. *Meth. Enzymol.* **2000**, *322*, 213–221.
196. Sinisterra, J.V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics* **1992**, *30*, 180–185.
197. Chaiyarit, S.; Thongboonkerd, V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study. *Analytical Biochemistry* **2009**, *394*, 249–258.
198. McGann, L.E.; Yang, H.Y.; Walterson, M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* **1988**, *25*, 178–185.
199. Picard, M.; Taivassalo, T.; Ritchie, D.; Wright, K.J.; Thomas, M.M.; Romestaing, C.; Hepple, R.T.; Polymenis, M. Mitochondrial Structure and Function Are Disrupted by Standard Isolation Methods. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18317.

-
200. Hughes, D.E.; Nyborg, W.L. Cell Disruption by Ultrasound: Streaming and other activity around sonically induced bubbles is a cause of damage to living cells. *Science* **1962**, *138*, 108–114.
201. Pallotti, F.; Lenaz, G. Isolation and Subfractionation of Mitochondria from Animal Cells and Tissue Culture Lines. In *Mitochondria, 2nd Edition: Elsevier*, **2007**, pp. 3–44.
202. Fernández-Vizarra, E. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* **2002**, *26*, 292–297.
203. Niklas, J.; Melnyk, A.; Yuan, Y.; Heinzle, E. Selective permeabilization for the high-throughput measurement of compartmented enzyme activities in mammalian cells. *Analytical Biochemistry* **2011**, *416*, 218–227.
204. Korohoda, W.; Grys, M.; Madeja, Z. Reversible and irreversible electroporation of cell suspensions flowing through a localized DC electric field. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2013**, *18*, 102–119.
205. Qin, Z.; Jiang, J.; Long, G.; Lindgren, B.; Bischof, J.C. Irreversible electroporation: an in vivo study with dorsal skin fold chamber. *Ann Biomed Eng* **2013**, *41*, 619–629.
206. Rubinsky, B. Irreversible electroporation in medicine. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2007**, *6*, 255–260.
207. Ben-Or, A.; Rubinsky, B. Experimental Studies on Irreversible Electroporation of Cells. In *Irreversible Electroporation*; Nagel, J., Rubinsky, B., Eds.: *Springer Berlin Heidelberg*, **2010**, pp. 63–83.
208. Wang, H.-Y.; Lu, C. Electroporation of mammalian cells in a microfluidic channel with geometric variation. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5158–5164.
209. Fox, M.B.; Esveld, D.C.; Valero, A.; Luttge, R.; Mastwijk, H.C.; Bartels, P.V.; van den Berg, A.; Boom, R.M. Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *385*, 474–485.
210. Chmiel, H. Bioprozesstechnik, *3rd ed*; *Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg*, **2011**.
211. Schafer, K.A. The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.* **1998**, *35*, 461–478.

-
212. Vermeulen, K.; van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 131–149.
213. Christen, P. Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten, *1st ed*; Springer: Berlin, **2005**.
214. Fogolín, M.B.; Wagner, R.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J. Biotechnol.* **2004**, *109*, 179–191.
215. Cookson, N.A.; Cookson, S.W.; Tsimring, L.S.; Hasty, J. Cell cycle-dependent variations in protein concentration. *Nucleic Acids Research* **2010**, *38*, 2676–2681.
216. Lee, S.; Kim, S.; Sun, X.; Lee, J.-H.; Cho, H. Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *357*, 111–117.
217. Martínez-Diez, M.; Santamaría, G.; Ortega, Á.D.; Cuezva, J.M.; Bähler, J. Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* **2006**, *1*, e107.
218. Barni, S.; Sciola, L.; Spano, A.; Pippia, P. Static cytofluorometry and fluorescence morphology of mitochondria and DNA in proliferating fibroblasts. *Biotech Histochem* **1996**, *71*, 66–70.
219. Margineantu, D.H.; Gregory Cox, W.; Sundell, L.; Sherwood, S.W.; Beechem, J.M.; Capaldi, R.A. Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* **2002**, *1*, 425–435.
220. Mitra, K.; Wunder, C.; Roysam, B.; Lin, G.; Lippincott-Schwartz, J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 11960–11965.
221. Fox, M.H.; Read, R.A.; Bedford, J.S. Comparison of synchronized Chinese hamster ovary cells obtained by mitotic shake-off, hydroxyurea, aphidicolin, or methotrexate. *Cytometry* **1987**, *8*, 315–320.

-
222. Knehr, M.; Poppe, M.; Enulescu, M.; Eickelbaum, W.; Stoehr, M.; Schroeter, D.; Paweletz, N. A critical appraisal of synchronization methods applied to achieve maximal enrichment of HeLa cells in specific cell cycle phases. *Exp. Cell Res.* **1995**, *217*, 546–553.
223. Darzynkiewicz, Z.; Halicka, H.D.; Zhao, H.; Podhorecka, M. Cell synchronization by inhibitors of DNA replication induces replication stress and DNA damage response: analysis by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *761*, 85–96.
224. Kurose, A.; Tanaka, T.; Huang, X.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z. Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage. *Cell Prolif.* **2006**, *39*, 231–240.
225. Rieder, C.L.; Palazzo, R.E. Colcemid and the mitotic cycle. *J. Cell. Sci.* **1992**, *102 (Pt 3)*, 387–392.
226. Schorl, C.; Sedivy, J.M. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. *Methods* **2007**, *41*, 143–150.
227. Cooper, S. Mammalian cells are not synchronized in G1-phase by starvation or inhibition: considerations of the fundamental concept of G1-phase synchronization. *Cell Prolif.* **1998**, *31*, 9–16.
228. Moore, A.; Mercer, J.; Dutina, G.; Donahue, C.J.; Bauer, K.D.; Mather, J.P.; Etcheverry, T.; Ryll, T. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology* **1997**, *23*, 47–54.
229. Banfalvi, G. Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nat Protoc* **2008**, *3*, 663–673.
230. Platas Barradas, O. Process and Cultivation Strategies for the Human Industrial Cell Line AGE1.HN. *Dissertation, Hamburg*, **2014**
231. Nunez, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* **2001**, *3*, 67–70.
232. Jayat, C.; Ratinaud, M.H. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. *Biol. Cell* **1993**, *78*, 15–25.

-
233. Prediger, A.; Bluma, A.; Höpfner, T.; Lindner, P.; Beutel, S.; J. Müller, J.; Hilterhaus, L.; Liese, A.; Scheper, T. In Situ Microscopy for Online Monitoring of Enzymatic Processes. *Chem. Eng. Technol.* **2011**, *34*, 837–840.
234. Prediger, A. Entwicklung von In-situ- und Durchfluss-Mikroskopen für die Bioprozesstechnik: *Dissertation: Hannover*, **2013**.
235. Rudolph, G. Entwicklung und Einsatz inline-mikroskopischer Verfahren zur Beobachtung biotechnologischer Prozesse: *Dissertation, Hannover*, **2007**.
236. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In *Current Protocols in Immunology*; Coligan, J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W., Eds.: John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, **2001**.
237. Hass, V.C.; Pörtner, R. Praxis der Bioprozesstechnik: *2nd ed; Spektrum: Heidelberg*, **2011**.
238. Jaroszeski, M.J.; Radcliff, G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol. Biotechnol.* **1999**, *11*, 37–53.
239. Rieseberg, M.; Kasper, C.; Reardon, K.F.; Scheper, T. Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, *56*, 350–360.
240. J.M. Chemnitius, H.P.K.H.Z.R. Latent and free citrate synthase activity as enzymatic indicators for respiratory potential of isolated porcine heart mitochondria. *J Appl Cardiol* **1988**, 301–310.
241. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
242. Srere, P.A. Citrate synthase. *Meth. Enzymol.* **1969**, 3–11.
243. Hell, S.W.; Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780.
244. Kukat, C.; Wurm, C.A.; Spahr, H.; Falkenberg, M.; Larsson, N.-G.; Jakobs, S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 13534–13539.
245. Harke, B.; Keller, J.; Ullal, C.K.; Westphal, V.; Schönle, A.; Hell, S.W. Resolution scaling in STED microscopy. *Opt. Express* **2008**, *16*, 4154.

-
246. Wurm, C.A.; Kolmakov, K.; Göttfert, F.; Ta, H.; Bossi, M.; Schill, H.; Berning, S.; Jakobs, S.; Donnert, G.; Belov, V.N.; *et al.* Novel red fluorophores with superior performance in STED microscopy. *Opt Nanoscopy* **2012**, *1*, 7.
247. Rajabi, N.; Bahnemann, J.; Zeng, A.-P.; Müller, J. Mikrofluidischer Split-and-Recombine-Mischer für die (Bio-) chemische Analytik. *Kongress Tagungsband MikroSystemTechnik* **2011**.
248. Rajabi, N.; Bahnemann, J.; Tzeng, T.-N.; Zeng, A.-P.; Müller, J. Microfluidic device for the continuous preparation of eukaryotic cells for metabolic analysis. *IEEE*, **2013**, pp. 259–262.
249. Rajabi, N.; Hoffmann, M.; Bahnemann, J.; Zeng, A.-P.; Schlüter, M.; Müller, J. A Chaotic Advection Enhanced Microfluidic Split-and-Recombine Mixer for the Preparation of Chemical and Biological Probes. *J. Chem. Eng. Japan / JCEJ* **2012**, *45*, 703–707.
250. Bahnemann, J.; Rajabi, N.; Fuge, G.; Barradas, O.; Müller, J.; Pörtner, R.; Zeng, A.-P. A New Integrated Lab-on-a-Chip System for Fast Dynamic Study of Mammalian Cells under Physiological Conditions in Bioreactor. *Cells* **2013**, *2*, 349–360.
251. Stroock, A.D. Chaotic Mixer for Microchannels. *Science* **2002**, *295*, 647–651.
252. Rajabi, N.; Bahnemann, J.; Wahrheit, J.; Heinzle, E.; Zeng, A.-P.; Müller, J. Inertia-based media exchange and quenching of cells for the continuous preparation of cells in a lab-on-a-chip. *Proceedings of the 3rd European Conference on Microfluidics*, **2012**.
253. Di Carlo, D. Inertial microfluidics. *Lab Chip* **2009**, *9*, 3038.
254. Zhou, J.; Papautsky, I. Fundamentals of inertial focusing in microchannels. *Lab Chip* **2013**, *13*, 1121.
255. Bahnemann, J.; Kayo, S.; Wahrheit, J.; Heinzle, E.; Pörtner, R.; Zeng, A.-P. In search of an effective cell disruption method to isolate intact mitochondria from CHO cells. *Eng. Life Sci.* **2013**. DOI: 10.1002/elsc.201200182
256. Rajabi, N.; Bahnemann, J.; Tzeng, T.-N.; Platas Barradas, O.; Zeng, A.-P.; Müller, J. Lab-on-a-Chip for cell perturbation, lysis, and efficient Lab-on-a-Chip for cell perturbation, lysis, and efficient separation of sub-cellular components in a continuous flow mode. *Sensors & Actuators: A. Physical* **2013**.

-
257. Neri, S.; Mariani, E.; Meneghetti, A.; Cattini, L.; Facchini, A. Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants. *Clinical and Vaccine Immunology* **2001**, *8*, 1131–1135.
258. Kayo, S.; Bahnemann, J.; Klauser, M.; Pörtner, R.; Zeng, A.-P. A microfluidic device for immuno-affinity based separation of mitochondria from cell culture. *Lab Chip* **2013**, *13*, 4467–4475
259. Ramsby, M.L.; Makowski, G.S. Differential Detergent Fractionation of Eukaryotic Cells: Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. In *2-D Proteome Analysis Protocols*; Link, A.J., Ed.: Humana Press: New Jersey, **1998**, pp. 53–66.
260. Kotnik, T.; Macek-Lebar, A.; Miklavcic, D.; Mir, L.M. Evaluation of cell membrane electropermeabilization by means of a nonpermeant cytotoxic agent. *BioTechniques* **2000**, *28*, 921–926.
261. Ramsby, M.L.; Makowski, G.S. Differential detergent fractionation of eukaryotic cells. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **1999**, *112*, 53–66.
262. Platas Barradas, O. Process and Cultivation Strategies for the Human Industrial Cell Line AGE1.HN. *Dissertation, Hamburg*, **2014**.
263. Galluzzi, L.; Maiuri, M.C.; Vitale, I.; Zischka, H.; Castedo, M.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1237–1243.
264. Wilkens, C.A.; Altamirano, C.; Gerdtzen, Z.P. Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. *Biotechnol Bioproc E* **2011**, *16*, 714–724.
265. Mannella, C.A. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2006**, *1763*, 542–548.
266. Collins, T.J. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *The EMBO Journal* **2002**, *21*, 1616–1627.
267. Green, D.R.; Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **1998**, *281*, 1309–1312.

-
268. Desagher, S.; Martinou, J.-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* **2000**, *10*, 369–377.
269. Lee, Y.-j. Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* **2004**, *15*, 5001–5011.
270. Jakobs, S.; Stoldt, S.; Neumann, D. Light Microscopic Analysis of Mitochondrial Heterogeneity in Cell Populations and Within Single Cells. *High Resolution Microbial Single Cell Analytics*; Springer Berlin Heidelberg, **2011**, pp. 1–19.
271. Fitzpatrick, L.; Jenkins, H.A.; Butler, M. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl Biochem Biotechnol* **1993**, *43*, 93–116.
272. Rardin, M.J.; Wiley, S.E.; Naviaux, R.K.; Murphy, A.N.; Dixon, J.E. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Analytical Biochemistry* **2009**, *389*, 157–164.
273. Henzler, H.-J. Kontinuierliche Fermentation mit tierischen Zellen. Teil 1. Aspekte der kontinuierlichen Prozessführung. *Chemie Ingenieur Technik* **2012**, *84*, 1469–1481.
274. Sarkar, A. Animal Stem Cells. *Discovery Publishing House Pvt Ltd.* **2009**.
275. Al-Rubeai, M.; Chalder, S.; Bird, R.; Emery, A.N. Cell cycle, cell size and mitochondrial activity of hybridoma cells during batch cultivation. *Cytotechnology* **1991**, *7*, 179–186.
276. Ramirez, O.T.; Mutharasan, R. Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *36*, 839–848.
277. Zeng, A.P. Mathematical modeling and analysis of monoclonal antibody production by hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *50*, 238–247.
278. Cai, L.; Tu, B.P. Driving the Cell Cycle through Metabolism. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2012**, *28*, 59–87.

-
279. Colombo, S.L.; Palacios-Callender, M.; Frakich, N.; Carcamo, S.; Kovacs, I.; Tudzarova, S.; Moncada, S. From the Cover: Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 21069–21074.
280. Duan, S.; Pagano, M. Linking metabolism and cell cycle progression via the APC/CCdh1 and SCF TrCP ubiquitin ligases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 20857–20858.
281. Platas Barradas, O.; Jandt, U.; Becker, M.; Bahnemann, J.; Pörtner, R.; Zeng, A.-P. Synchronized mammalian cell culture: Part I A synchronization strategy with further cultivation under physiological conditions. *Biotechnology Progress* **2014**. (submitted)
282. Jandt, U.; Platas Barradas, O.; Pörtner, R.; Zeng, A.-P. Synchronized mammalian cell culture: Part II Population ensemble modeling and analysis for development of reproducible processes. *Biotechnology Progress* **2014**. (submitted)
283. Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11*, 872–884.
284. Kitami, T.; Logan, D.J.; Negri, J.; Hasaka, T.; Tolliday, N.J.; Carpenter, A.E.; Spiegelman, B.M.; Mootha, V.K.; Bai, Y. A Chemical Screen Probing the Relationship between Mitochondrial Content and Cell Size. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33755.