

RNAi-vermittelter *knockdown* zur
Identifikation von Zielgenen für die
Verbesserung von Produktionszelllinien

Dissertation

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat)
der
Universität Bielefeld

vorgelegt von

Oliver Krämer, M. Sc.

geboren am 28. Oktober 1983

in Salzkotten

Oktober 2012

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld unter Anleitung von Prof. Dr. Thomas Noll angefertigt.

Gedruckt mit Genehmigung der technischen Fakultät der Universität Bielefeld.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Noll
AG Zellkulturtechnik
Technische Fakultät
Universität Bielefeld

2. Gutachter: PD Dr. Andreas Tauch
Medizinische Mikrobiologie und Genomik
Center for Biotechnology – CeBiTec
Universität Bielefeld

3. Gutachter: Prof. Dr. Kristian Müller
AG Zelluläre und molekulare Biotechnologie
Technische Fakultät
Universität Bielefeld

Tag der Disputation: 04.07.2013

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Konferenz-Beitrag / Posterpräsentation:

Sandra Klausning*, **Oliver Krämer***, Thomas Noll (2011) *Bioreactor cultivation of CHO DP-12 cells under sodium butyrate treatment - comparative transcriptome analysis with CHO cDNA microarrays*. BMC Proc. 2011 Nov 22;5 Suppl 8:P98.; Präsentiert auf der ESACT 2011, Wien (* authors contributed equally)

Veröffentlichung:

Oliver Krämer, Sandra Klausning, Thomas Noll (2010) *Methods in mammalian cell line engineering: from random mutagenesis to sequence-specific approaches*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Sep;88(2): 425-36.

Patentanmeldung:

Method for recombinant protein production in mammalian cells, Application No./Patent No. 13177678.3 - 1403, Date of filing: 23.07.2013

Für meine Eltern und meine Schwester

**„Die Neugier ist die mächtigste Antriebskraft im Universum,
weil sie die beiden größten Bremskräfte im Universum
überwinden kann: die Vernunft und die Angst.“**

(Walter Moers – Die Stadt der Träumenden Bücher)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	3
3	Theorie	5
3.1	Strategien zur Zelllinienentwicklung	6
3.2	RNA-Interferenz	9
3.2.1	RNA-Interferenz - von der <i>Cosuppression</i> bis zu den ARGONAUT-Proteinen	9
3.2.2	RNAi-vermitteltes <i>silencing</i> einer mRNA	11
3.2.3	Richtlinien für effektive siRNA-Sequenzen	14
3.2.4	RNAi als Methode in biotechnologischen Fragestellungen	15
3.3	Zinkfinger-Nukleasen	16
3.3.1	Gezielter <i>knockout</i> mit ZF-Nukleasen unter Verwendung des <i>context-dependent assembly</i> (CoDA)-Systems	21
3.3.2	Verwendung von ZF-Nukleasen in biotechnologischen Fragestellungen	23
3.4	Potentielle Ziel- bzw. Produktgene für die Zelllinienentwicklung	24
3.4.1	<i>SET nuclear oncogene</i> (SET) – ein Inhibitor der Histon-Acetylierung	24
3.4.2	Der pro-apoptische <i>Bcl-2-associated death promoter</i> (BAD)	26
3.4.3	Galectin-1 (LGALS1) – Ein Multifunktionsprotein	29
3.4.4	Das <i>PHD finger protein 3</i> (PHF3)	31
3.4.5	Das <i>Yippee-like 3</i> -Protein (YPEL3)	32
3.4.6	Struktur und Funktion von Erythropoetin und der Glykosylierungsvariante Darbepoetin alfa	34
3.5	Motivation der Arbeit	36
4	Material und Methoden	37
4.1	Mikrobiologische Methoden	37
4.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	37
4.1.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
4.1.3	Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Bakterien	39

4.2	Molekularbiologische Methoden	40
4.2.1	Polymerasekettenreaktion	40
4.2.1.1	PCR mit der <i>proofreading</i> KAPAHiFi TM -DNA-Polymerase	40
4.2.1.2	Kolonie-PCR und analytische PCRs mit der DreamTaq TM -Green-DNA-Polymerase	41
4.2.1.3	PCR-Mutagenese mit dem <i>Change-ITTM Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit</i>	42
4.2.2	Oligonukleotid-Hybridisierung	44
4.2.3	Verwendete Primer, Plasmide und Oligonukleotide	45
4.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	45
4.2.5	Restriktionsspaltung und Dephosphorylierung	46
4.2.6	Ligation	47
4.2.7	Agarosegelelektrophorese	48
4.2.8	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	49
4.2.9	Reinigung von Plasmid-DNA und PCR-Ansätzen zur Entfernung von DNA-Fragmenten oder Abreicherung von Enzymen	49
4.2.10	Plasmidisolierung	50
4.2.11	RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen	51
4.2.12	Herstellung von <i>complementary</i> -DNA durch reverse Transkription	52
4.2.13	Quantitative <i>real-time</i> -PCR (qRT-PCR)	53
4.2.14	Isolierung genomischer DNA aus Zellkultur-Material	56
4.2.15	SURVEYOR [®] -Nuklease-Assay zur Detektion von <i>knockout</i> -Mutationen in genomischer DNA	56
4.2.16	Vorbehandlung von PCR-Amplifikaten zur direkten Sequenzierung	58
4.2.17	DNA-Sequenzierung	59
4.2.18	Sequenzvergleich mit dem BLAST-Algorithmus	59
4.3	Zellkultur-Methoden	59
4.3.1	Zelllinien und Kulturmedien	59
4.3.2	Stammhaltung und Zellpassagierung	61
4.3.3	Automatische Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung mit dem Cedex	63
4.3.4	Kryokonservierung	63
4.3.5	Fed-Batch Kultivierung im Shaker-Maßstab	64
4.3.6	Durchflusszytometrische Analyse von Zellkulturen (FACS)	64
4.3.7	Transfektion durch Nukleofektion	65
4.3.8	Herstellung pseudotypisierter Lentiviren	66
4.3.9	Virusernte und Transduktion von CHO-Zellen	67

4.4	Bioreaktorkultivierung und differentieller Microarray	68
4.4.1	Kultivierung von tierischen Zellen im geregelten Bioreaktor	68
4.4.2	Probenahme während der Bioreaktorkultivierung und Injektion von Natriumbutyrat	69
4.4.3	Differentielle Analyse der Genexpression mit einem <i>custom</i> -cDNA-Microarray	70
4.5	Analytik der Zellkulturprozesse	71
4.5.1	Glukose- / Laktat-Konzentration	71
4.5.2	Aminosäure-Konzentration	72
4.5.3	Antikörperbestimmung durch Protein A-Affinitätschromatographie	72
4.5.4	Bestimmung der EPO/DARBE-Produktkonzentration	72
4.6	Berechnung zellspezifischer Parameter	73
4.6.1	Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ	73
4.6.2	Berechnung der Produkt- und Substratbildungs- bzw. -verbrauchsrate	73
5	Ergebnisse und Diskussion	75
5.1	Etablierung von Methoden für die nachfolgenden RNAi-Experimente	76
5.1.1	Ermittlung geeigneter Nukleofektionsparameter für die Modell-Zelllinie CHO DP-12	76
5.1.2	<i>Kill curve</i> -Experiment zur Ermittlung der einzusetzenden Puromycin-Konzentration zur Selektion in CHO DP-12-Zellen	77
5.1.3	Erzeugung von stabilen pLVX-shRNA1-CHO DP-12-Zellen	80
5.1.4	Verifikation der Spezifität der für die qRT-PCR eingesetzten Primer	81
5.2	RNAi- <i>knockdown</i> von Zielgenen für die Zelllinienentwicklung	83
5.2.1	<i>Knockdown</i> der <i>Set</i> -mRNA in CHO DP-12-Zellen	83
5.2.1.1	Herstellung der lentiviralen shRNA-Expressionsvektoren gegen die <i>Set</i> -mRNA	84
5.2.1.2	Evaluation der <i>knockdown</i> -Effizienz verschiedener shRNA-Sequenzen gegen <i>Set</i>	87
5.2.1.3	Persistenter <i>knockdown</i> von <i>Set</i> durch lentivirale Transduktion eines shRNA-exprimierenden Plasmids	88
5.2.2	<i>Knockdown</i> der <i>Bad</i> -mRNA in CHO DP-12-Zellen	91
5.2.2.1	Herstellung der lentiviralen shRNA-Expressionsvektoren gegen die <i>Bad</i> -mRNA	91
5.2.2.2	Transienter <i>knockdown</i> von <i>Bad</i> zur Beurteilung der <i>silencing</i> -Effizienz der shRNAs	92

5.2.2.3	Etablierung eines stabilen anti- <i>Bad</i> -shRNA-exprimierenden CHO DP-12-Zellpools	94
5.2.3	<i>Knockdown</i> der <i>Lgals1</i> -mRNA in CHO DP-12-Zellen	97
5.2.3.1	Konstruktion lentiviraler Transfervektoren mit shRNA-Sequenzen zum <i>knockdown</i> von <i>Lgals1</i>	98
5.2.3.2	Evaluation des transienten <i>knockdowns</i> von <i>Lgals1</i>	99
5.2.3.3	Erzeugung von stabil anti- <i>Lgals1</i> -shRNA exprimierenden CHO DP-12-Zellen	100
5.2.4	Test der <i>knockdown</i> -Effizienz verschiedener shRNAs gegen die mRNA von <i>Ypel3</i> und <i>Phf3</i>	103
5.2.5	Batch-Kultivierung der CHO DP-12-Parentalzelle, der pLVX-, <i>Set-kd</i> -, <i>Bad-kd</i> - und <i>Lgals1-kd</i> -Zellen	107
5.2.6	Shaker-Fed-Batch-Parallelkultivierung der CHO DP-12-Parentalzelle, des pLVX-, <i>Set-kd</i> -, <i>Bad-kd</i> - und <i>Lgals1-kd</i> -Zellpools	119
5.2.7	Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse aus Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen	127
5.2.8	Stabilitätstests der genetischen Modifikation einer Zelllinie durch lentiviralen Transfer	134
5.3	Alternative Strategie zum <i>knockout</i> eines Gens mittels der ZFN-Technologie	136
5.3.1	Erzeugung der ZFN-Expressionsvektoren	138
5.3.2	Transfektion adhärenter CHO K1-Zellen mit ZFN-Expressionsplasmiden und Evaluation eines möglichen <i>knockouts</i>	139
5.4	Herstellung von Erythropoetin- und Darbepoetin alfa-produzierenden CHO-Zellen	144
5.4.1	Erzeugung des eukaryotischen Expressionsvektors pCMVMIE basierend auf pcDNA TM 3.1(+)	144
5.4.2	Konstruktion von pCMVMIE- <i>Epo</i> und pCMVMIE- <i>Darbe</i>	146
5.4.3	Ermittlung geeigneter Nukleofektionsparameter und <i>kill curve</i> -Experiment mit Geneticin in CHO K1-Zellen	147
5.4.4	Herstellung der stabilen CHO-EPO und CHO-DARBE-Zellpools	150
5.4.5	Batch-Parallelkultivierung der verschiedenen CHO-EPO- und CHO-DARBE-exprimierenden Zellpools	153
6	Ausblick	163
7	Literaturverzeichnis	167

A Anhang	i
A.1 Exemplarische Kolonie-PCR zur Identifikation von Klonen mit shRNA-Insert	i
A.2 Differentieller μ Array zur Identifikation von Zielgenen für die ZLE	ii
A.3 Analytik verschiedener Substrate während der Shaker-Fed-Batch-Kultivierung der <i>Lgals1-kd</i> -Zellen	viii
A.4 Zellzahlen während der Shaker-Fed-Batch-Kultivierung	xi
A.5 Oligonukleotid-Sequenzen zur Generierung der shRNA-Expressionsvektoren, sowie Primer und Plasmide	xii
A.6 Abkürzungsverzeichnis	xviii

1 Zusammenfassung

Die Produktion von Biopharmazeutika hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen. Damit verbunden sind steigende Anforderungen an die Produktionszelllinien, um dem hohen Bedarf an Therapeutika nachkommen zu können. Durch Verbesserungen in der Prozessführung und durch Optimierung der Nährmedien, ist es bis zu einem gewissen Grad möglich, die Produktivität der Zellen zu erhöhen. Eine Steigerung darüber hinaus ist mit diesen Methoden jedoch nicht zu erreichen. Die Zelllinienentwicklung ist ein Teilgebiet der Zelllinienengineering, dem daher eine immer größer werdende Aufmerksamkeit zuteil wird. Durch gezielte genetische Modifikation der Produktionszellen können verschiedene prozessrelevante Parameter, wie die maximale Lebendzellichte, die Produktivität oder die Produktqualität, beeinflusst werden.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Techniken angewandt, um eine Produktionszelllinie zu verbessern. Im Gegensatz zu den klassischen Methoden, die zumeist auf einer Überexpression von Genen beruhen, wurden zwei Techniken genutzt, die eine gezielte Reduktion ausgewählter Gene oder Transkripte hervorrufen können. Es sollte demonstriert werden, dass auch diese Art der genetischen Modifikation für die Zelllinienentwicklung geeignet ist. Mittels der RNA-Interferenz wurde die Transkriptmenge von Genen aus unterschiedlichen Reaktionswegen der Zelle, wie z. B. der Apoptose oder der Histon-Acetylierung, reduziert. Die ausgewählten Ziel-Transkripte waren die des *Set*-, *Bad*- und *Lgals1*-Gens. Nach Evaluation verschiedener shRNA-Sequenzen gegen diese Transkripte und Auswahl der Sequenzen mit dem stärksten *knockdown*, wurden lentiviral-modifizierte Zellen hergestellt, die stabil die *knockdown*-vermittelnden shRNAs exprimierten. Anschließend wurden die neuen Zellen durch Batch- und Fed-Batch-Experimente charakterisiert.

Die Reduktion von *Set* hatte keinerlei Einfluss auf die Produktbildung und das Wachstum verhielt sich ähnlich zu dem der Negativkontrolle. Eine Verringerung der mRNA-Menge von *Bad* konnte die maximale Lebendzellichte im Vergleich zur Negativkontrolle um etwa 40 % erhöhen. Allerdings blieb der Produkttiter davon unbeeinflusst. Die Reduktion der mRNA von *Lgals1* hingegen konnte die viable Zellichte im Vergleich zur Negativkontrolle um knapp 74 % erhöhen. Verglichen mit der Ausgangszelllinie betrug die Steigerung damit etwa 123 %. Zusätzlich war der Produkttiter ca. 92 % höher als der der Negativkontrolle. Dies entsprach einer Zunahme des Produkttiters um 159 % im Vergleich zur Ausgangskul-

tur. Somit konnte gezeigt werden, dass mittels der RNA-Interferenz wirksame Ziele für die Zelllinienentwicklung identifiziert und genutzt werden können.

Weitere Teile dieser Arbeit beschäftigten sich zum einen mit dem Versuch des Gen-*knockouts* mittels Zinkfinger-Nukleasen, zum anderen mit der konventionellen Erzeugung von Produktionszelllinien mit zwei Modellproteinen, Erythropoetin und Darbepoetin alfa. Die Zinkfinger-Nukleasen sollten eingesetzt werden, um das Glutamin-Synthetase-Gen auszuschalten. Dieser *knockout* war jedoch nicht erfolgreich, was letztlich wahrscheinlich auf nicht-funktionsfähige Zinkfinger-Nukleasen zurückgeführt werden konnte. Für die Etablierung der Produktionszelllinien wurde zunächst ein Expressionsvektor mit optimiertem Promotor generiert. Nach stabiler Transfektion und Selektion wurden Batch-Parallelkultivierungen durchgeführt und die Produktbildung analysiert. Der höchste Produkttiter lag bei 49 mg/L, was deutlich höher war als in der publizierten Literatur beschriebene Titer, die etwa 15 mg/L betragen. Diese Zellen können in weiterführenden Arbeiten genutzt werden, um die Übertragbarkeit von RNA-Interferenz *knockdowns* von der Modell-Zelllinie auf eine andere Zelllinie zu testen.

2 Abstract

The production of biopharmaceuticals has increased steadily in recent decades. Associated with this are the rising requirements to the production cell lines in order to meet the high demand for drugs. By improving the process management or by optimising the media it is possible to increase cellular productivity to a certain degree. Nevertheless, this potential is limited. Therefore, cell line engineering, a subdivision of cell line generation, is an area which is given an ever-increasing attention. By targeted genetic modification of production cell lines, a variety of parameters relevant to the process like maximum viable cell density, productivity or product quality can be influenced.

This dissertation describes several techniques which have been used to improve a eukaryotic production cell line. While the classical approaches of cell line engineering often rely on overexpression of genes, new methods like RNA interference or the zincfinger nuclease technology deliberately reduce the expression of the targeted genes. The RNA interference was used to reduce the transcript amount of genes originating in different cellular pathways, like apoptosis or histone acetylation. The transcripts chosen for this purpose were those of *Set*, *Bad* and *Lgals1*. After evaluating shRNA sequences targeting these transcripts, appropriate shRNAs with high knockdown were selected to generate stable shRNA-expressing cell lines by lentiviral infection. The new cell lines were characterised by batch and fed-batch cultivation. The reduction of *Set*-mRNA had no influence on the productivity and the growth behavior was similar to the negative control. By decreasing the *Bad*-mRNA, the maximum viable cell density was increased by approximately 40 % compared to the negative control. However, the product titer remained unaffected. In contrast, the reduction of *Lgals1*-mRNA increased the maximum viable cell density about 74 % compared to the negative control and about 123 % in comparison to the original cell line. There was also an influence on the product titer, which had risen about 92 % and 159 % compared with the negative control and the original cell line, respectively. This dissertation further emphasised the importance and functionality of RNA interference in cell line engineering for identification of suitable targets and for using them to generate optimised production cell lines.

Further parts of this work on one hand look at the issue of zincfinger nuclease technology, which was applied for gene knockout and on the other hand on the classical over-expression for generation of production cell lines. The zincfinger nuclease technique was intended to

be used for the knockout of the glutamine-synthetase gene. Nevertheless, this knockout was not successful, which was most probably due to non-functional zincfinger nucleases. For the creation of the production cell lines, a new expression vector with an optimised promotor sequence was generated to express the Erythropoetin and Darbepoetin alfa sequences. After the stable transfection and the selection phase, batch cultivations were carried out and the product formation was analysed. The highest product titer reached was 49 mg/L. This was noticeably higher than previously published data from other cell lines which generated approximately 15 mg/L of the product. These cells can be used in future experiments to test the transferability of the RNA interference knockdowns from the model cell line to a different cell line.

3 Theorie

Vor etwa drei Jahrzehnten begann die Entwicklung biopharmazeutischer Arzneistoffe, die heute effektive Therapien gegen eine Vielzahl von Erkrankungen ermöglichen. Der kommerzielle Erfolg von Biopharmazeutika, in gentechnisch veränderten Organismen hergestellte Arzneistoffe, startete 1982 mit der Zulassung von rekombinantem Insulin, produziert in *Escherichia coli* (*E. coli*) (Chance & Frank, 1993). Ein Meilenstein für die aus tierischen Zellen gewonnenen Produkte war 1987 erreicht. Die *Food and Drug Administration* (FDA) erteilte dem ersten in rekombinanten tierischen Zellen hergestellten Protein (*Tissue plasminogen activator*, tPA) die Zulassung als Medikament (Jayapal *et al.*, 2007). Seitdem steigt die Anzahl neuer Biopharmazeutika jährlich. Der Industrie stehen dabei eine Reihe von verschiedenen Expressionssystemen zur Verfügung, darunter bakterielle, tierische und pflanzliche Systeme, wie auch Insektenzellen oder transgene Tiere. Trotz dieser hohen Bandbreite an verschiedenen Zellsystemen, reduziert sich die Nutzung der Expressionssysteme für die Herstellung von Biopharmazeutika hauptsächlich auf bakterielle Systeme, wie *E. coli*, und auf tierische Zellsysteme, darunter vorwiegend *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen (Walsh, 2010).

Der steigende Anteil an durch tierische Zellen produzierten Arzneimitteln wird in der genaueren Betrachtung der zugelassenen Medikamente der letzten Jahre deutlich. Zwischen 2006 und 2010 wurden 58 neue biopharmazeutische Produkte zugelassen, 32 davon werden aus tierischen Zellen gewonnen (Walsh, 2010) und für mehr als 70 % der Medikamente werden CHO-Zellen zur Herstellung eingesetzt (Jayapal *et al.*, 2007; Matasci *et al.*, 2008). Obwohl auch andere tierische Expressionssysteme wie *Baby Hamster Kidney* (BHK)-, *Human Embryonic Kidney* (HEK)-, oder die humane PER.C6[®]-Zelllinie zur Verfügung stehen, zeichnen sich CHO-Zellen durch verschiedene Merkmale als geeignetes Wirtssystem aus. Aufgrund der bisherigen FDA-Zulassungen ist es beispielsweise einfacher, neue Produkte aus CHO-Zellen zuzulassen. Zudem erlauben verschiedene Systeme zur Genamplifikation eine einfache Steigerung der zellspezifischen Produktivität (q_p) bzw. des Produkttiters. Weiterhin sind CHO-Zellen in der Lage, die rekombinanten Proteine mit posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, zu versehen, was zu einer besseren Pharmakodynamik oder -kinetik des Medikaments führt (Walsh & Jefferis, 2006). Je nach Protein ist eine posttranslationale Modifikation sogar essentiell, um eine pharma-

kologische Wirkung vermitteln zu können. Aus produktionstechnischer Sicht ist es zudem hilfreich, dass die Zellen serumfrei und in Suspension kultiviert werden können. Dies erlaubt den Einsatz von Bioreaktoren bis 10000 L oder mehr und ermöglicht die notwendigen hohen Ausbeuten (Jayapal *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012). Auch wenn bakterielle Systeme viele Vorteile, wie schnelles Wachstum und hohe Produkttiter, bieten, so zeichnen sich CHO-Zellen durch die aufgezeigten Eigenschaften, die für die Produktion eines Biopharmazeutikums erforderlich sein können, aus.

Durch Verbesserung der Nährmedien und Optimierungen im Bereich der Prozessführung ist es möglich, den erzeugten Produkttiter zu erhöhen. Dennoch werden auf diesem Weg Grenzen erreicht, die nur durch eine Modifikation des Produktionssystems selbst überwunden werden können. Dem als Zelllinienentwicklung (ZLE) bezeichneten Prozess wird daher in den letzten Jahren eine immer größer werdende Aufmerksamkeit zuteil und verschiedene Strategien zur Steigerung von Produktivität, Zellwachstum und Produktqualität wurden erarbeitet (Jayapal *et al.*, 2007; Matasci *et al.*, 2008; Krämer *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012).

3.1 Strategien zur Zelllinienentwicklung

Das Ziel einer ZLE ist eine Verbesserung des Produktionssystems in Bezug auf den Produkttiter. Um dies zu erreichen, können zwei Strategien genutzt werden. Zum einen die Überexpression eines Gens, zum anderen das Ausschalten (*knockdown* bzw. *knockout*, siehe Abschnitte 3.2 und 3.3) der Expression einer Gensequenz (Krämer *et al.*, 2010). Während in der klassischen Zelllinienentwicklung zumeist Gene überexprimiert werden, die direkt oder indirekt eine Erhöhung des Produkttiters verursachen können, wurden in den letzten Jahren alternative Systeme zur gezielten Abschaltung unerwünschter Stoffwechselwege so weit verbessert, dass sie zum Einsatz in der ZLE kommen können (Krämer *et al.*, 2010). Zwei dieser Systeme, die RNA-Interferenz (RNAi) zum *knockdown* einer *messenger*-RNA (mRNA) und die Zinkfinger-Nuklease (ZFN)-Technologie zum *knockout* eines Gens werden in den Abschnitten 3.2 und 3.3 detailliert erläutert. Obgleich die verwendeten Methoden zur genetischen Manipulation eines Expressionssystems kontinuierlich verbessert werden, ist die entscheidendere Frage bei einer ZLE, welche Vorgänge in der Zelle überhaupt verändert werden müssen, um die Zielvorgabe der höheren Produktkonzentration erreichen zu können. Bereits das Design und die Konstruktion des Expressionsvektors beeinflussen den erreichbaren Produkttiter maßgeblich. Die Wahl des Promotors, Enhancer-Elemente zur Transkription, oder auch die Beeinflussung des Integrationsortes an transkriptionell aktiven Stellen ist eine Möglichkeit, die Produktion des rekombinanten Proteins positiv zu beeinflussen (Krämer *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012). Die ZLE kann jedoch auch einen Schritt

darüber hinaus gehen. Eine gezielte Veränderung des Wirts, in den meisten Fällen also einer CHO-Zelle (Abschnitt 3), kann sowohl die Produktivität eines Klons, als auch dessen Wachstum hinsichtlich einer biopharmazeutischen Produkterzeugung verbessern. Es bieten sich zu diesem Zweck verschiedene Reaktionswege in der Zelle an, die potentiell Ziel einer ZLE sein können.

Da nur lebende Zellen ein Produkt bilden, können die Strategien der ZLE beispielsweise zur Verbesserung des Zell-Zeit-Integrals eingesetzt werden. Durch Erhöhung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit, vor allem zu Beginn einer Kultivierung, und durch Reduktion der absterbenden Zellen, hervorgerufen durch Nährstofflimitierungen und Akkumulation toxischer Produkte zum Ende einer Fermentation, kann das Zell-Zeit-Integral verbessert werden. Dazu wurde bereits die Expression vieler Gene aus dem Bereich Apoptose oder der Proliferation moduliert (Fussenegger *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2006; Figueroa *et al.*, 2007). Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods (PZT). Sie wird über die Caspase-Kaskade kontrolliert, deren Mediatoren, die Caspasen, unterteilt werden in Initiator- und Effektor-Caspasen. Zusätzlich sind verschiedene pro- und anti-apoptotische Proteine an der Regulation der Apoptose beteiligt (Adams & Cory, 2001). Ein bisher kaum beachtetes Gebiet ist die Autophagie, der zweite Reaktionsweg des PZT. Derzeit wird davon ausgegangen, dass beide Reaktionswege des PZT miteinander interagieren, bzw. der Wegfall der Apoptose durch die Autophagie kompensiert werden kann (Han *et al.*, 2011). Neben den Modifikationen des Zellwachstums wurden auch Versuche zur direkten Verbesserung der Produktivität durchgeführt. Dabei wurden verschiedene, Produktivitäts-betreffende Stoffwechselwege der Zellen verändert. Eine Überexpression von Chaperonen sollte helfen, mehr Proteine und damit auch mehr Produkt zu falten. Hintergrund dieser Strategie war die Beobachtung, dass trotz mehr Produkt-mRNA nicht mehr Protein von der Zelle erzeugt wurde (Mohan *et al.*, 2008). Die Effekte der Chaperon-Überexpression waren jedoch von Zelle zu Zelle und je nach Zielgen unterschiedlich. Die Erhöhung von q_P schien zudem abhängig vom erzeugten Produkt zu sein. Bei Antikörper-produzierenden CHO-Zellen konnte durch die Überexpression der Protein-Disulfid-Isomerase ein positiver Einfluss auf q_P gemessen werden. Bei anderen Proteinen, wie Thrombopoietin, war dies jedoch nicht der Fall (Borth *et al.*, 2005; Mohan *et al.*, 2007). Neuere, jedoch transient durchgeführte Experimente, konnten zudem auch die Erhöhung von q_P in Antikörper-produzierenden CHO-Zellen widerlegen (Hayes *et al.*, 2010). Dieses Beispiel zeigt, dass die ZLE von vielen unterschiedlichen Faktoren abhängt. Oftmals kann der Effekt einer Modifikation nicht generalisiert werden, sondern ist abhängig von dem produzierten Zielprotein und der Zelllinie.

Eine weitere Möglichkeit, die zellspezifische Produktivität zu erhöhen, sind Modifikationen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die Überexpression der *splicing*-Variante des

X-box binding protein 1 (Xbp-1) führte zu einer Zunahme des ER-Volumens und daraus resultierend zu einer erhöhten Produktivität (Tigges & Fussenegger, 2006; Becker *et al.*, 2008). Allerdings war dies von einer Steigerung der Apoptose begleitet, was sich letztlich negativ auf das Zell-Zeit-Integral auswirkte. Eine Kombination mit anti-apoptotischer ZLE konnte diesen Effekt vermindern und gleichzeitig die Erhöhung von q_P beibehalten (Becker *et al.*, 2010). Diese Beispiele sollten die Vielfältigkeit, aber auch die Komplexität der ZLE aufzeigen. Neben den dargestellten Modifikationen gibt es daher eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten, den Produkttiter zu beeinflussen. Dazu gehören Modifikationen der Sekretionspfade, aber auch die Verbesserung der Aufnahme-, Verbrauchs- und Bildungsraten wichtiger Metabolite wie Glukose, Laktat oder Ammonium (Kim *et al.*, 2012).

Entscheidend für eine ZLE ist die Identifikation eines geeigneten Zielgens zur Modifikation. Die hier vorgestellten Modifikationen beruhen zumeist auf rationalen Überlegungen, also der Identifikation eines Zielgens aufgrund seiner bekannten Eigenschaften und seiner Wirkungsweise. Neben der rationalen ZLE gibt es auch die Möglichkeit, Omics-Techniken zur Identifikation geeigneter Zielgene zu nutzen (Kim *et al.*, 2012). Zu den Omics-Techniken zählen z. B. die Transkriptomics, die Proteomics und die Metabolomics. Dabei werden die Transkripte, also die transkribierten mRNAs, das Proteom oder das Metabolom einer Zelle untersucht. In differenziellen Ansätzen können zwei sich unterscheidende Proben direkt miteinander verglichen werden. So können Unterschiede in der Genexpression oder der Proteinabundanz, gegebenenfalls auch der posttranslationalen Modifikationen, zwischen Hochproduzenten und geringproduzierenden Zellen charakterisiert werden (Klausing *et al.*, 2011; Beckmann, 2012). Der Vorteil dieser zielgerichteten Identifikation von ZLE-geeigneten Genen bzw. Proteinen liegt darin, dass auch solche gefunden werden können, deren Funktion nicht genau bekannt ist, oder die aufgrund ihrer bisher bekannten Funktion durch einen rationalen Ansatz als Zielgen ausgeschlossen worden wären.

Das Potential zur Entwicklung von hochproduzierenden Zelllinien mittels ZLE ist groß. Die zielgerichtete ZLE steht jedoch im Rahmen einer kommerziellen Verwendung derzeit noch am Anfang. Die immer leichter zugänglich werdenden Methoden zur Modifikation einer Zelle, wie die RNA-Interferenz und die Zinkfinger-Nuklease-Technologie, werden es indes ermöglichen, dem stetig wachsenden Bedarf an neuen und großen Mengen Biopharmazeutika nachkommen zu können.

3.2 RNA-Interferenz

3.2.1 RNA-Interferenz - von der *Cosuppression* bis zu den ARGONAUT-Proteinen

Wie bei vielen Erkenntnissen in der Wissenschaft war auch die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) ein Prozess, der sich über mehrere Jahre hinzog. Erste Beschreibungen dieses Phänomens wurden bereits 1990 veröffentlicht. In Pflanzen wurde ein Effekt namens *Cosuppression* beschrieben, der durch Einführung eines Transgens aktiviert wurde (Jorgensen, 1990). Das untersuchte Gen wurde zwar transkribiert, jedoch durch einen *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) genannten Prozess schnell degradiert. Die mRNA akkumulierte nicht, sodass kaum bzw. kein Genprodukt exprimiert wurde (Ingelbrecht *et al.*, 1994; Cogoni & Macino, 2000). Diese Vorgänge ähnelten Beobachtungen, die in mit Viren infizierten Pflanzen gemacht wurden.

Bis zu dem Zeitpunkt war bekannt, dass es möglich war, die Genexpression mit *antisense*-RNA (einzelsträngige, zur mRNA komplementäre RNA) reduzieren zu können (Mol *et al.*, 1990; Goodarzi *et al.*, 1990). Dabei glaubte man, dass sich intrazellulär doppelsträngige-RNA (dsRNA) bildete, die die Translation inhibierte. Erstaunlicherweise war jedoch auch die *sense*-RNA in der Lage, die Expression von Genen herunter zu regulieren (Guo & Kempthues, 1995). Diese unerwartete Beobachtung sorgte dafür, dass die Funktion des *antisense*-Modells neu überdacht werden musste. Zur Klärung dieses Phänomens sollten in einem Experiment mögliche Synergieeffekte bei der Kombination von *sense*- und *antisense*-RNA-Strängen untersucht werden. Dazu wurden dsRNA-Fragmente in eine Gonadenzelle des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) injiziert. Der daraus resultierende *knockdown* des Zielgens durch die dsRNA war etwa hundertfach stärker, als es bei Einzelstrang-RNA der Fall war (Fire *et al.*, 1998).

Die Tatsache, dass die Kombination aus *sense*- und *antisense*-RNA zu einem vielfach stärkeren *knockdown* führte, als nur eine einzelne RNA-Spezies, war zunächst nicht zu erklären. Allerdings gab es die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen der dsRNA und dem PTGS bestehen musste. Weitere Experimente mit *C. elegans* deuteten darauf hin, dass die dsRNA in kleinere, sequenzspezifische Effektor-Moleküle prozessiert wurde (Grishok *et al.*, 2000). Gleichzeitig wurden auf RNA-basierende *silencing*-Wege in einer Vielzahl von Organismen, beispielsweise in Pflanzen (Baulcombe, 1999), in Maus-Oozyten (Svoboda *et al.*, 2000; Wianny & Zernicka-Goetz, 2000) und später auch in Moskitos (Caplen *et al.*, 2002) nachgewiesen. Dies deutete auf einen hochkonservierten Reaktionsmechanismus hin, den eine Vielzahl verschiedener Spezies zu teilen schienen. Mit der Zeit konnten immer weitere, am RNAi-Pfad beteiligte, Komponenten aufgeklärt werden. Zunächst gelang es den Effektor-

Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) zu isolieren (Hammond *et al.*, 2000), der für die Degradierung der mRNA essentiell ist. Weiterhin stellte sich heraus, dass die kleinen RNA-Fragmente mit den Nuklease-aktiven Bereichen des RISC cofraktionierten (Hammond *et al.*, 2000). In *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) gelang es schließlich, die enzymatische Degradierung der dsRNA in *small interfering-RNAs* nachzuweisen (Zamore *et al.*, 2000). So konnte das erste zweiphasige Modell der RNAi aufgestellt werden. Es bestand zunächst aus dem Initiations- und dem Effektor-Schritt. Im Initiations-Schritt wird die dsRNA durch das Enzym DICER, das zur RNase III Familie gehört, unter ATP-Verbrauch in kleinere RNA-Duplices zerlegt (*small-interfering-RNA*, siRNA). Im Effektor-Schritt werden die siRNAs von einem Protein-Komplex, dem RISC, aufgenommen. Danach werden die siRNA-Stränge entwunden, wodurch der RISC aktiviert wird. Dieser aktivierte Effektor-Komplex lokalisiert über Basenpaarung das homologe mRNA-Transkript und spaltet die mRNA. Die Details dieser Mechanismen waren zu dem Zeitpunkt noch nicht hinreichend bekannt.

Obgleich die dsRNA in vielen Modellspezies ein optimaler Initiator für den RNAi-Pfad war, schien ihre Nutzung in Säugerzellen nur eingeschränkt möglich. Grund dafür ist die unspezifische Interferon-Antwort, die bei vielen tierischen Zellen durch dsRNAs, die länger als 30 bp sind, ausgelöst wird (Proud, 1995; Clemens, 1997; García *et al.*, 2006). Dieser Mechanismus wird unter anderem zur Abwehr gegen eine virale Infektion eingesetzt. Aktiviertes Interferon löst eine Degradierung der zellulären mRNA durch Induktion der RNase L aus. Zusätzlich wird die *dsRNA-dependent protein kinase* (PKR) aktiviert, welche den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α phosphoryliert. Dies führt zu einer Inhibierung der zellulären Translation (Stark *et al.*, 1998). Diese Problematik konnte umgangen werden, indem anstelle der dsRNA kürzere, synthetische siRNA verwendet wurde. Sie vermochte den RNAi-Pfad ebenfalls effektiv zu aktivieren (Elbashir *et al.*, 2001a). Damit war die Möglichkeit geschaffen, in praktisch allen eukaryotischen Zellen künstlich RNAi auszulösen.

Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz wurde intensiv an den zugrundeliegenden Prinzipien geforscht und viele der genetischen und biochemischen Grundlagen konnten identifiziert werden. Dazu gehören z. B. die ARGONAUT-Proteine, die für die Restriktion der Ziel-mRNA verantwortlich sind (Rivas *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005), oder auch der *micro-RNA*-Pfad (miRNA-Pfad) in tierischen Zellen (Zhang *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2011). Eine detaillierte Darstellung der einzelnen Schritte der RNA-Interferenz ist in Abbildung 3.1 gegeben. Neben der Funktionsaufklärung konnte auch bestätigt werden, dass verschiedene RNA-Spezies an der Regulation der Transkription, der Genom- und auch der mRNA-Stabilität beteiligt sind.

Die RNA-Interferenz ist durch ihre einfache Handhabung zu einem wichtigen Werkzeug in der Molekularbiologie geworden. Mit ihrer Hilfe kann die Funktion von Genen bzw. Protei-

nen deutlich schneller untersucht werden, als es mit *knockout*-Systemen der Fall ist. Gerade im Bereich der eukaryotischen Zellen war die Erzeugung von *knockout*-Mutanten, sei es zur Genfunktionsanalyse oder zur gezielten Änderung eines Phänotyps, mit erheblichem Aufwand verbunden (Yamane-Ohnuki *et al.*, 2004). Die Reduktion einer mRNA mittels RNA-Interferenz ist in den meisten Fällen ausreichend, um eine Auswirkung auf den Phänotyp beobachten zu können.

3.2.2 RNAi-vermitteltes *silencing* einer mRNA

Die RNA-Interferenz kann im Wesentlichen in drei Hauptpfade unterteilt werden, die der siRNAs, der miRNAs und der PIWI-*interacting* RNAs (piRNA) (Siomi & Siomi, 2009). Trotz eigener Reaktionswege sind die Grenzen zwischen diesen Pfaden oft nicht klar definiert. Der miRNA- und siRNA-Pfad teilen sich viele Reaktionsschritte, unterscheiden sich jedoch sowohl in der Prozessierung dieser Moleküle, als auch in der letztlichen Funktion, wie im Folgenden erläutert wird. Die Rolle der piRNAs ist noch nicht vollends geklärt. Wahrscheinlich übernehmen sie Funktionen zum Schutz des Keimzellen-Genoms (Aravin *et al.*, 2007; Choudhuri, 2009). Da der piRNA-Pfad nicht Inhalt dieser Arbeit ist, wird der Reaktionsweg an dieser Stelle nicht näher erörtert.

Die Aktivierung der unterschiedlichen RNAi-Pfade kann durch verschiedene RNA-Spezies erfolgen. Dazu gehört die lange dsRNA, die siRNA, die miRNA sowie die *short-hairpin*-RNA (shRNA). Der Ursprung dieser Moleküle kann sowohl exogen als auch endogen sein. Die exogene Quelle für diese Moleküle lag ursprünglich in den Viren. Bei der Virusinfektion injiziert der Virus sein Genom in die Zelle. Die Zelle nutzte das virale Genom daraufhin, um aus diesem siRNA-Moleküle zu erzeugen, die spezifisch gegen die Virus-RNA waren, um die Virusinfektion so zu bekämpfen. In der ZLE werden die unterschiedlichen RNA-Spezies mittlerweile häufig künstlich eingebracht. Der natürliche Ursprung für miRNAs ist endogener Natur. Sie werden in den nicht-kodierenden Bereichen der Genome als lange RNA-Primärtranskripte (pri-miRNA) transkribiert und durch das Enzym DROSHA in *hairpin*-*Precursor* (pre-miRNA) gespalten (Lee *et al.*, 2003, 2004). Anschließend erfolgt die weitere Prozessierung im Cytoplasma der Zellen. Lange Zeit war nicht bekannt, dass auch tierische Zellen siRNAs endogen synthetisieren können (Golden *et al.*, 2008; Okamura & Lai, 2008). Die Funktion dieser als *endo*-siRNA bezeichneten Spezies ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings wird vermutet, dass die *endo*-siRNAs an der Regulation der Genexpression durch Modifikation von Chromatinstrukturen beteiligt sind (Burkhart *et al.*, 2011).

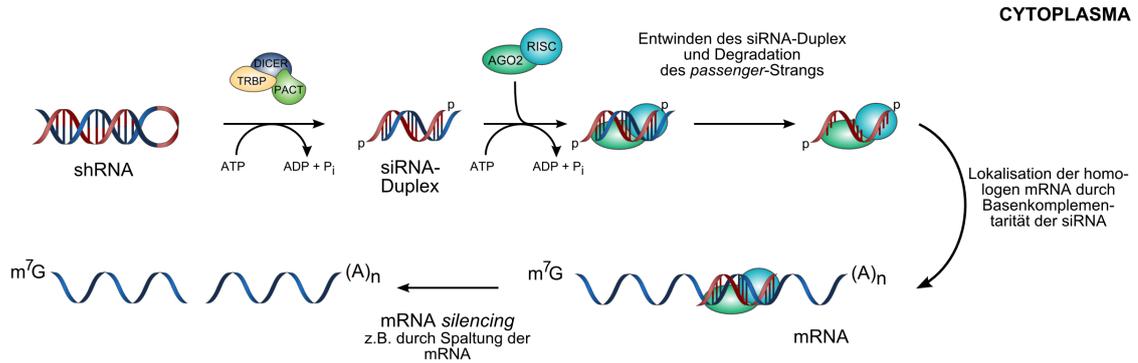


Abbildung 3.1: Verlauf des shRNA-basierten *silencings* im Cytoplasma einer Zelle. Die shRNA wird zunächst durch den DICER-Enzymkomplex prozessiert, wodurch die *loop*-Struktur entfernt wird. Anschließend erfolgt das ATP-abhängige RISC-loading. Die beiden Stränge werden ATP-unabhängig entwunden und der *passenger*-Strang (blau) wird degradiert. Mittels homologer Basenpaarung kann der geladene RISC die Ziel-mRNA lokalisieren und z. B. durch eine Spaltung die mRNA (helleres Blau) inaktivieren. Die Bezeichnung m^7G beschreibt die eukaryotische 5'-Cap-Struktur, $(A)_n$ steht für die 3'-Polyadenylierung. Die Grafik wurde modifiziert nach Krämer *et al.* (2010).

In Abbildung 3.1 ist eine schematische Darstellung des RNAi-Pfades beginnend mit einer shRNA gezeigt. Eine siRNA und eine shRNA werden prinzipiell gleich prozessiert. ShRNA-Moleküle müssen zuvor jedoch gespalten werden, um die *loop*-Struktur zu entfernen. Das Molekül wird daher zunächst durch das Enzym DICER, eine RNase vom Typ III (Bernstein *et al.*, 2001), unter ATP-Verbrauch in einen etwa 19–22 Basenpaare (bp) langen siRNA-Duplex prozessiert. Die 5'-Enden sind danach phosphoryliert und die etwa 2 Nukleotide (nt)-langen 3'-Überhänge sind mit Hydroxylgruppen versehen (Elbashir *et al.*, 2001b; Nykänen *et al.*, 2001). Daraufhin erfolgt die nächste Phase, das RISC-loading (Siomi & Siomi, 2009). Dabei wird die siRNA durch den RISC-loading Komplex (RLC), bestehend aus DICER, dem TAR-RNA-Bindeprotein (TRBP) und dem ARGONAUT-2 (AGO2)-Protein, in das AGO2-Protein inkorporiert (Chendrimada *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2005; Maniataki & Mourelatos, 2005; MacRae *et al.*, 2008). In Kombination mit dem RISC-Komplex erfolgt die zweite Phase, die RISC-activation (Siomi & Siomi, 2009). Der Duplex wird zunächst ohne Verbrauch von ATP entwunden (Yoda *et al.*, 2010) und, basierend auf den thermodynamischen Eigenschaften der beiden siRNA-Stränge, der *sense*- oder *antisense*-Strang degradiert. Es verbleibt fast ausschließlich der Strang im Komplex, der sich durch eine geringere 5'-Stabilität auszeichnet (Schwarz *et al.*, 2003). Dieser Strang wird auch als

guide-Strang bezeichnet, der komplementäre als der *passenger*-Strang. Der *passenger*-Strang wird durch AGO2 gespalten und aus dem RISC freigesetzt (Rand *et al.*, 2005; Okamura & Lai, 2008). Der nun mit dem siRNA-Einzelstrang beladene und aktivierte RISC lokalisiert durch Basenpaarung die zu der siRNA homologe mRNA-Sequenz. Abhängig von der Art des RNAi-vermittelnden Moleküls, der Homologie zur Ziel-mRNA, sowie der Zusammensetzung der RISC-Komponenten, finden unterschiedliche Arten des *silencing* statt (Zeng *et al.*, 2003; Grewal & Rice, 2004; Matzke & Matzke, 2004; Schramke & Allshire, 2004). Handelte es sich ursprünglich um ein dsRNA- oder ein siRNA- bzw. shRNA-Molekül und besteht vollständige Komplementarität zur mRNA, so wird die mRNA durch die endonukleolytische Aktivität von AGO2 10 nt vom 5'-Ende der siRNA gespalten (Elbashir *et al.*, 2001b). Bei unvollständiger Komplementarität oder bei miRNAs sorgt der RISC für eine translationale Inhibition und eine Degradation der mRNA (Eulalio *et al.*, 2007; Filipowicz *et al.*, 2008; Siomi & Siomi, 2009). Zudem finden miRNA-Prozesse in verschiedenen Kompartimenten der Zelle statt. Während siRNA-vermittelte RNAi ausschließlich im Cytoplasma stattfindet (Zeng & Cullen, 2002; Kawasaki & Taira, 2003), reift die miRNA erst durch Prozessierung verschiedener Vorstufen im Nukleus und wird dann in das Cytoplasma exportiert.

Mittlerweile stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, RNAi in Zellkulturen, aber auch in vollständigen Organismen auszulösen. SiRNAs können synthetisch hergestellt und anschließend transfiziert werden. Eine andere Variante ist die *in vivo* Expression mittels eines Plasmids. Die Wahl der RNAi-auslösenden Methode hängt dabei maßgeblich vom verwendeten Organismus und dem Ziel des Experimentes ab. Pflanzen und Würmer beispielsweise besitzen eine endogene RNA-abhängige RNA-Polymerase zur *in vivo* Amplifikation von siRNA (Dalmay *et al.*, 2000; Sijen *et al.*, 2001). Dort können dementsprechend auch Langzeituntersuchungen eines *knockdowns* nach Transfektion von synthetischer siRNA durchgeführt werden. Tierische Zellen besitzen diese Polymerase jedoch nicht, wodurch der Effekt des *knockdowns* einer siRNA nur für wenige Tage zu beobachten ist. Aus diesem Grund wurden die DNA-basierten Expressionssysteme in Form von Plasmiden entwickelt. Sie nutzen den U6- oder den H1-Promotor, die beide der Klasse der RNA-Polymerase III-Promotoren (Pol III) angehören. Pol III-Promotoren transkribieren für gewöhnlich RNA, die nicht in Proteine translatiert wird, wie z. B. tRNAs oder ribosomale RNA. Die Anforderungen für eine erfolgreiche Transkription mit diesen Promotoren sind gering. Zu Beginn der zu transkribierenden Sequenz sollte eine Purinbase, am besten Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), vorliegen. Die Termination der Transkription erfolgt durch vier oder mehr Desoxythymidintriphosphate (dTTP). Aufgrund dieser geringen Anforderungen an die Struktur der Vektoren, ist deren Konstruktion relativ einfach. Die häufigste Variante einer solchen *in vivo* Transkription ist die Generierung von shRNA.

Meist werden die shRNA-Vektoren mit eukaryotischen Selektionsmarkern wie Puromycin kombiniert. Auf diese Weise können auch in tierischen Zellen Langzeitstudien durchgeführt werden. Eine simultane Expression eines Fluoreszenzmarkers wie dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) erlaubt zudem eine einfache Detektion siRNA-exprimierender Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie. Mittlerweile existieren weitere alternative Systeme zur Expression der siRNAs, wie z. B. lentivirale Vektoren. Diese bringen den Vorteil mit sich, dass sie auch schwer zu transfizierende, sich nicht-teilende Zellen infizieren (Naldini *et al.*, 1996). Zusätzlich integrieren sie in transkriptionell aktive Bereiche des Genoms (Bushman, 2003; Ciuffi, 2008; Desfarges & Ciuffi, 2010; Ciuffi & Barr, 2011), wodurch eine effektive Expression der shRNA ermöglicht wird.

3.2.3 Richtlinien für effektive siRNA-Sequenzen

Bei der Erstellung einer siRNA ist zu beachten, dass nicht jede zur mRNA komplementäre Sequenz auch effektiv ein *silencing* vermitteln kann. Die Eignung einer siRNA zum *knock-down* einer mRNA kann im Vorfeld nur schwer vorhergesagt werden, da sie von verschiedenen Faktoren abhängt. Einige Bereiche einer mRNA können beispielsweise durch Sekundärstrukturen und RNA-bindende Proteine blockiert sein, sodass eine siRNA dort nicht binden kann. Zudem sollten die siRNAs bestimmte Kriterien erfüllen, um RNAi auslösen zu können, wie z. B. die Einhaltung bestimmter Sequenzmotive. Ein simples, aber effektives Motiv für eine siRNA ist AA(N)₁₉UU, wobei N für ein beliebiges Nukleotid steht (Elbashir *et al.*, 2001b). Der GC-Gehalt sollte in einem niedrigen bis moderaten Bereich (36–52 %) liegen. Besonders wichtig ist die Sequenz des *guide*-Stranges. Dessen 5'-Stabilität sollte möglichst gering sein und keine internen Sequenzwiederholungen aufweisen (Wu, 2009), da dieser Strang letztlich im RISC verbleiben soll. Die Kriterien, die eine siRNA erfüllen sollte, um eine möglichst hohe Erfolgschance bezüglich des *silencing* zu haben, wurden empirisch immer weiter verfeinert. Beispiele hierfür sind, dass an Position 9 kein Uracil eingebaut sein sollte, an Position 15 entweder ein Guanin oder ein Cytosin, jedoch kein Uracil lokalisiert sein darf. Der 3'-Überhang sollte aus Adenin bzw. Uracil, nicht aber aus Cytosinen bestehen (Wu, 2009).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, die siRNAs chemisch zu modifizieren, um *off-target*-Effekte zu minimieren (Engels, 2012). Die *off-target*-Effekte können darin bestehen, dass beispielsweise der *passenger*-Strang eingebaut wird und dadurch eine andere mRNA degradiert wird, oder dass die RNAi-Maschinerie gesättigt wird, was eine Prozessierung der endogenen miRNA verhindert (Chang *et al.*, 2009). Chang *et al.* haben daher asymmetrische siRNAs konstruiert die, bei gleichwertig hohem *knockdown* im Vergleich zu normalen siRNAs, deutlich reduzierte *off-target*-Effekte auslösen. Der *passenger*-Strang dieser asym-

metrischen siRNAs ist kürzer als der *guide*-Strang, der die Standardlänge von 19 nt hat. Weitere chemische Modifikationen können die Effektivität von siRNAs beeinflussen. Dan-de *et al.* (2006) haben 4'-Thioribose an bestimmten Positionen der siRNA eingesetzt, was zu einer gleichwertigen bzw. besseren *silencing*-Effektivität im Vergleich zu unveränderter siRNA führte.

3.2.4 RNAi als Methode in biotechnologischen Fragestellungen

Im biotechnologischen Kontext der ZLE sind bereits einige RNAi-vermittelte Strategien zur Optimierung des Wachstums, der Produktivität oder der Produktqualität einer Zelllinie erfolgreich angewendet worden. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über einige der biotechnologisch-relevanten ZLE-Ansätze mittels RNAi. Beispielsweise konnte durch den *knockdown* der α -(1,6)-Fucosyltransferase (*Fut8*) in Verbindung mit dem *knockdown* der GDP-Mannose 4,6-dehydratase (*Gmd*) die Fucosylierung der produzierten Antikörper unterbunden werden (Imai-Nishiya *et al.*, 2007). Nicht-fucosylierte Antikörper weisen eine deutlich höhere *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) auf, was sich direkt auf ihre Wirksamkeit *in vivo* auswirkt. Ein anderes Beispiel für die erfolgreiche Anwendung von RNAi ist der *knockdown* des an der Apoptose beteiligten Proteins REQUIEM. Der *knockdown* dieses Transkriptionsfaktors konnte sowohl in Batch-, als auch in Fed-Batch-Kultivierungen die viable Zelldichte gegenüber einer Negativkontrolle erhöhen, was letztlich zu einem erhöhten Produkttiter geführt hat (Wong *et al.*, 2006).

Tabelle 3.1: Publikationen im Zusammenhang mit RNAi und biotechnologischen Anwendungen.

Reaktionsweg	Zielgen(e)	Effekt	Referenz
Apoptose	<i>Bax, Bak</i>	Verbesserte Viabilität, erhöhte LZD und Produkttiter	Lim <i>et al.</i> (2006)
	Caspase 3 und 7	Verbesserte Viabilität, erhöhte Kulturdauer und Produkttiter	Sung <i>et al.</i> (2007)
	<i>Requiem, Alg-2</i>	Erhöhte LZD und Produkttiter	Wong <i>et al.</i> (2006)
Glykosylierung	<i>Fut8</i>	Erhöhte ADCC	Mori <i>et al.</i> (2004)
	<i>Fut8</i> und <i>Gmd</i>	Erhöhte ADCC	Imai-Nishiya <i>et al.</i> (2007)
	<i>Gmd</i>	Keine fucosylierten Antikörper nach <i>knockdown</i>	Kanda <i>et al.</i> (2007)
	<i>Gft</i>	Anteil von nicht-fucosyliertem AT-III erhöht	Omasa <i>et al.</i> (2008)
	Sialidase	Verhinderte Desialylierung von Glykoproteinen	Ngantung <i>et al.</i> (2006)
	Sialidase (<i>Neu3</i>)	Verbesserte Sialylierung	Zhang <i>et al.</i> (2010)
Metabolismus	<i>LdhA</i>	Reduzierte spezifische Glukoseaufnahme und Laktatproduktion	Kim & Lee (2007)
	<i>LdhA, Pdk</i>	Reduzierte Laktatproduktion und erhöhte Produktivität	Zhou <i>et al.</i> (2011)
Expression	<i>Dhfr</i>	Verbesserte zellspezifische Produktivität und genetische Stabilität	Wu <i>et al.</i> (2008)

3.3 Zinkfinger-Nukleasen

Bevor die RNA-Interferenz als einfache und schnelle Möglichkeit zur Genfunktionsanalyse und zur Manipulation von Phänotypen eingesetzt wurde, konnten Gene durch verschiedene andere Mechanismen ausgeschaltet werden. Unspezifische, nicht-gezielte Methoden, wie der Einsatz von Chemikalien, Strahlung oder Transposons konnten das Leseraster eines Gens zerstören und damit einen *knockout* hervorrufen (Santiago *et al.*, 2008; Rémy *et al.*, 2010). Im Gegensatz zur RNAi ist eine solche Modifikation permanent, da die genomische Information

zerstört wird bzw. verloren geht. Dessen ungeachtet waren diese Methoden wenig effizient und das *screenen* einer Vielzahl von Klonen notwendig, um einen Klon mit der gewünschten *knockout*-Mutation zu finden. Die Möglichkeit, gezielt an einer spezifischen Stelle im Genom eine Mutation hervorzurufen, wurde durch die homologe Rekombination (HR) ermöglicht. Dabei werden homologe Sequenzen einer exogenen DNA mit der entsprechenden genomischen Sequenz rekombiniert. Sofern mRNA von dieser Sequenz transkribiert wird, wird sie über *nonsense-mediated decay* wieder abgebaut, oder das Protein wird nicht vollständig synthetisiert, da ein Stopp-Codon oder eine Leserasterverschiebung frühzeitig die Translation terminiert. Diese Technik eignet sich gut für Hefen und Mäuse, da die beobachtete Rekombinationsfrequenz bei einem Ereignis pro 10^4 untersuchten Zellen liegt (Caroll, 2011). Für tierische Zellkulturen war der Einsatz einer solchen Methode jedoch mit einem größerem Aufwand verbunden. Dort tritt eine HR nur etwa einmal bei 10^5 untersuchten Zellen auf (Vasquez *et al.*, 2001; Durai *et al.*, 2005; Kandavelou *et al.*, 2005). Die Erhöhung der Menge des Donor-Vektors kann dabei sogar kontraproduktiv wirken, da es zu einer Zunahme der nicht-homologen Rekombination mit einer Häufigkeit von einem Ereignis pro 10^2 Zellen auftreten kann (Vasquez *et al.*, 2001; Kandavelou *et al.*, 2005).

Bereits 1981 konnte durch Latt (1981) gezeigt werden, dass die Beschädigung der DNA zu einer erhöhten, lokalen, homologen Rekombination zwischen Schwester-Chromatiden führte. Die Gefahr des Verlustes der genetischen Integrität der Zelle und damit verbunden ein drohender Zelltod, aktiviert verschiedene Reparaturmechanismen, um den Bruch wieder instand zu setzen (Mladenov & Iliakis, 2011). Dieses Phänomen trat ebenfalls bei nur einer einzigen Beschädigung der DNA in Form eines Doppelstrangbruches (DSB) auf (Caroll, 2011). Experimente in Hefen (Rudin *et al.*, 1989; Plessis *et al.*, 1992) und später auch in tierischen Zellen (Rouet *et al.*, 1994; Choulika *et al.*, 1995) zeigten, dass bei einem DSB zwei verschiedene Mechanismen in der Zelle den Defekt reparieren. Zum einen die HR und zum anderen ein Mechanismus, der als *non-homologous end joining* (NHEJ) bezeichnet wird. Beide Wege dienen der Reparatur eines DSBs, beruhen aber auf unterschiedlichen Reparaturprinzipien. Die HR nutzt die Sequenz eines homologen DNA-Abschnittes oder eines Schwester-Chromatids, welches nach einer DNA-Replikation entsteht, um die durch einen DSB verloren gegangenen Informationen wiederherzustellen. Da hauptsächlich die Schwester-Chromatiden für die HR genutzt werden, tritt die HR eher in der G2 bzw. S-Phase der Zellen auf (Mladenov & Iliakis, 2011). Aufgrund der Komplexität der HR sei für die exakten Mechanismen auf entsprechende *Reviews* verwiesen (Krejci *et al.*, 2012). Der zweite Reparaturweg ist das NHEJ, welches letztlich auf einer Ligation der beiden DNA-Enden basiert (Abbildung 3.2). Diese Art der DSB-Reparatur ist jedoch fehleranfällig. Da für die Ligation kompatible Enden nötig sind, werden im Laufe des Prozesses mitunter mehrere Basen entfernt oder hinzugefügt. Auf diese

Weise geht die Sequenzintegrität der DNA an dieser Stelle verloren. Zusätzlich kann bei dem NHEJ nicht sichergestellt werden, dass die beiden ursprünglich zusammengehörigen DNA-Enden miteinander verknüpft werden (Mladenov & Iliakis, 2011). Sobald ein DSB in einem DNA-Molekül vorliegt, bindet das Protein KU an die Enden des DSBs. Dadurch werden die katalytischen Einheiten von DNA-abhängigen Kinasen (DNA-PKc) rekrutiert und bilden zusammen mit den KU-Proteinen und der DNA einen Holoenzymkomplex. Dies wiederum sorgt für die Bindung und Regulation von ARTEMIS, einer Endonuklease, die wahrscheinlich die freien DNA-Enden prozessiert. Anschließend werden die nun kompatiblen DNA-Enden durch einen Enzymkomplex ligiert (Mladenov & Iliakis, 2011).

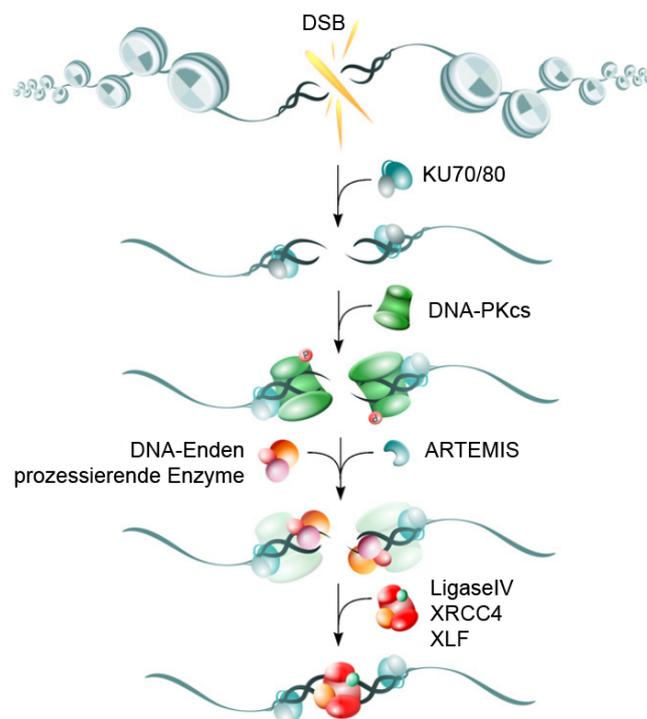


Abbildung 3.2: Ablauf des NHEJ nach Auftreten eines DSB z. B. katalysiert durch eine Zinkfinger-Nuklease. Zunächst binden die KU-Proteine an die freien DNA-Enden und rekrutieren die DNA-PKCs. Anschließend bildet sich ein Enzym-Komplex aus ARTEMIS und weiteren Proteinen, die die DNA-Enden kompatibel machen. Die freien DNA-Enden werden daraufhin wieder ligiert. Die Grafik wurde modifiziert nach Mladenov & Iliakis (2011).

Obgleich die HR aufgrund ihrer Fähigkeit, die genetische Integrität der Zelle zu erhalten, für die Zelle einen sichereren Reparaturweg als das NHEJ darstellt, wird das NHEJ häufiger zur Reparatur eingesetzt. Bei kompatiblen Enden ist das Verhältnis von NHEJ zu HR 6:1,

bei nicht-kompatiblen DNA-Enden 3:1 (Mao *et al.*, 2008). Zudem ist das NHEJ schneller als die HR. Während der Prozess der nicht-homologen Reparatur etwa 30 min dauert, vergehen bis zu einer Reparatur durch HR etwa 7 h (Mao *et al.*, 2008). Für CHO-Zellen konnten andere Verhältnisse zwischen NHEJ und HR ermittelt werden. Dort beträgt das Verhältnis zwischen den beiden Reparaturmechanismen generell etwa 13:9 (Liang *et al.*, 1998).

Wenngleich die Fehlerhäufigkeit des NHEJ zur Aufrechterhaltung der genetischen Integrität ein Nachteil ist, so ist sie hilfreich, wenn es um die gezielte genetische Modifikation einer Zelle geht. So können Nukleasen genutzt werden, die an einer gewünschten Stelle im Genom einen DSB erzeugen. Bei einer Reparatur kann dann der *knockout* erfolgen. Die ersten Enzyme, die dafür genutzt worden sind, waren Meganukleasen und sogenannte *homing*-Endonukleasen. Die Meganuklease *I-SceI* beispielsweise hat eine 18 bp lange DNA-Erkennungssequenz. Der Nachteil dieses Enzyms ist die Notwendigkeit einer entsprechenden Basensequenz in dem zu modifizierenden Gen (Epinat *et al.*, 2003).

Eine Schlüsselkomponente zur Entwicklung eines geeigneten *tools* zur Einführung eines DSB an einer beliebigen Stelle innerhalb eines komplexen Genoms wurde von Li *et al.* (1992) publiziert. Sie untersuchten die unterschiedlichen Domänen des Restriktionsenzym *FokI* auf ihre katalytische und DNA-bindende Aktivität. *FokI* gehört zu den Restriktionsenzymen vom Typ IIS. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die katalysierte Restriktion nicht an ihrer Erkennungssequenz, sondern einige Basen davon entfernt stattfindet (Pingoud & Jeltsch, 2001). Bei der Analyse von *FokI* stellten Li *et al.* fest, dass die DNA-bindende Domäne von der endonukleolytischen Domäne getrennt werden bzw. durch Kombination mit anderen DNA-bindenden Domänen die Erkennungssequenz modifiziert werden kann (Li *et al.*, 1992; Kim & Chandrasegaran, 1994). Weiterhin wurde festgestellt, dass *FokI* dimerisieren muss, um katalytisch aktiv zu sein (Bitinaite *et al.*, 1998).

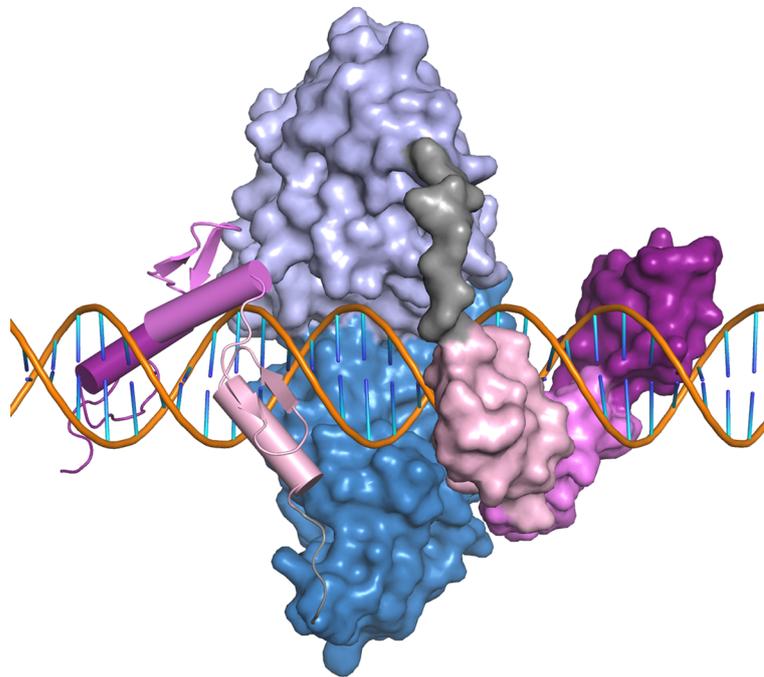


Abbildung 3.3: Modell eines dimerisierten ZFN-Paares, gebunden an eine DNA-Sequenz. Die individuellen ZF sind durch verschiedene Abstufungen von Pink dargestellt. Der „linke“-ZF zeigt schematisch die α -Helix in Form eines Zylinders und die β -Faltblätter in Form von Pfeilen. Die *FokI*-Domänen sind in zwei Blautönen eingefärbt. Die Verbindung zwischen der ZF- und der katalytischen Domäne ist durch eine graue Struktur repräsentiert. Die Darstellungen basieren auf den PDB-Modellen 1MEY und 2FOK (PDB, 2012). Die Grafik wurde mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dana Carroll zur Verfügung gestellt (Carroll, 2011)

Es wurden verschiedene DNA-bindende Domänen in Verbindung mit *FokI* getestet, jedoch besaßen Cys_2His_2 -Zinkfinger (ZF) die besten Eigenschaften (Kim *et al.*, 1996). Diese etwa 30 Aminosäuren-langen Moleküle falten sich zu einer $\beta\beta\alpha$ -Struktur zusammen und koordinieren ein Zink-Ion (Wolfe *et al.*, 2000), wie in Abbildung 3.3 angedeutet. Jeder ZF erkennt dabei drei DNA-Basen, deren Sequenz durch Veränderung der Aminosäurereste im Protein variiert werden kann (Cathomen & Joung, 2008). Durch eine Reihenschaltung von drei oder mehr Zinkfingern kann auf diese Weise eine Erkennungssequenz von 9 bzw. 12 bp konstruiert werden (Bibikova *et al.*, 2002; Urnov *et al.*, 2005). Die Verbindung zwischen der katalytischen *FokI*-Domäne und der DNA-bindenden ZF-Domäne erfolgt über eine Sequenz aus 4 Aminosäuren. Der Abstand zwischen den DNA-bindenden Einheiten ist ein jeweils 5–7 bp langer *spacer* (Carroll, 2011). Die so entstehenden Moleküle nennt man Zinkfinger-

Nukleasen (ZFN). Aufgrund der Notwendigkeit der Dimerisation von zwei *FokI*-Enzymen, ist für eine endonukleolytische Spaltung an einer bestimmten Stelle im Genom stets ein Paar der ZF-Nukleasen erforderlich. Die Struktur einer solchen ZFN-Einheit ist ebenfalls in Abbildung 3.3 dargestellt.

3.3.1 Gezielter *knockout* mit ZF-Nukleasen unter Verwendung des *context-depnt assembly* (CoDA)-Systems

Die Erzeugung von artifiziellen, endonukleolytischen Enzymkomplexen mit kontrollierbarer DNA-Erkennungssequenz war ein großer Fortschritt im Bereich der funktionellen Genomanalytik, aber auch in der Zelllinienentwicklung. Der erste erfolgreiche Einsatz von *de novo* synthetisierten ZF-Nukleasen erfolgte in *D. melanogaster* (Bibikova *et al.*, 2002). Ein Austausch einer genetischen Sequenz gegen einen anderen DNA-Abschnitt mittels ZF-Nukleasen konnte bereits ein Jahr später demonstriert werden (Bibikova *et al.*, 2003). Zunächst stellte jedoch das Einbringen der ZF-Nukleasen in die Zielzellen ein Hindernis dar. Zu Beginn der ZFN-Technologie wurden entsprechende Expressionsvektoren in das Genom der Zielzellen integriert (Bibikova *et al.*, 2002). Dieser Weg war jedoch umständlich und die Integration der exogenen DNA konnte zudem ungewollte Nebenreaktionen durch *knockouts* weiterer Gene verursachen. Durch die Konstruktion neuer Expressionvektoren ist es möglich geworden, die entsprechenden Plasmide transient zu transfizieren. Sogar die Transfektion der ZF-Nukleasen in Form einer mRNA ist mittlerweile üblich (Carroll, 2011).

Die Herstellung der ZF-Nukleasen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Dabei muss zunächst zwischen den frei-verfügbaren Methoden sowie der proprietären Technologie von Sangamo Biosciences (USA) in Kooperation mit Sigma-Aldrich (USA) unterschieden werden. Sangamos Technik basiert auf dem Zusammenbau der Zinkfinger-Domäne aus kleineren Modulen. Dabei werden zwei ZF-Paare, bestehend aus je zwei ZF, zu einer ZF-Domäne vereinigt (Urnov *et al.*, 2005; Cathomen & Joung, 2008; Cost *et al.*, 2010). Anschließend wird diese Domäne Algorithmus-basiert auf ihre Funktionalität hin evaluiert. Die exakte Vorgehensweise ist dabei nicht öffentlich zugänglich. Bei den frei-verfügbaren Methoden zur Generierung von ZF-Nukleasen muss zwischen einem modularen Einzelaufbau der ZF-Domäne (Bibikova *et al.*, 2002; Kim & Kim, 2011) und dem Kontext-abhängigen Aufbau durch Kombination verschiedener ZF-Elemente, wie es beispielsweise beim *context-dependent assembly* (CoDA)-System verwendet wird (Sander *et al.*, 2011), unterschieden werden. Der modulare Aufbau zeichnet sich, wie der Name bereits andeutet, durch einen sequentiellen Aufbau der ZF-Domäne aus. Dabei wird jeder Finger individuell auf seine Bindefähigkeit an eine Zielsequenz getestet und so die vollständige ZF-Domäne erzeugt. Das CoDA-System arbeitet mit

unterschiedlichen ZF-Paaren. Durch die Analyse vieler funktioneller ZF-Nukleasen wurde festgestellt, dass der mittlere der drei ZF (F2) häufig ähnliche Sequenzen aufweist. Er lässt sich durch 18 individuelle Finger repräsentieren. Für den linken und rechten ZF (F1 und F3) stehen je über 300 verschiedene ZF zur Verfügung, die mit F2 kombiniert werden. Auf diese Weise können Sequenzen im Genom identifiziert werden, bei denen F1 und F3 durch einen gemeinsamen F2 eine funktionierende Einheit ergeben sollten (Sander *et al.*, 2011). Die Notwendigkeit für Systeme zur selbstgemachten Herstellung von ZF-Nukleasen ergibt sich häufig für kleinere Labore oder Firmen. Obwohl die von Sangamo Biosciences produzierten ZF-Nukleasen sehr effizient sind, sind die Kosten für ein ZFN-Paar mit etwa \$25000 nicht unerheblich (persönl. Kommunikation und Segal (2011)).

Trotz der vielen Vorteile besitzt die ZF-Nuklease-Technologie auch Nachteile. Zum Teil sind die erzeugten ZF-Nukleasen cytotoxisch. Dies basiert auf einer bisher nicht zu erklärenden Häufung von *off-target*-Effekten, also der Erzeugung von Brüchen an beliebigen Stellen im Genom, möglicherweise durch Bildung von ZFN-Homodimeren. Dadurch verliert die Zelle ihre genetische Integrität und der programmierte Zelltod wird aktiv (Bibikova *et al.*, 2002; Porteus & Carroll, 2008). Dem wurde zumindest teilweise entgegen gewirkt, indem die *FokI*-Domäne genetisch manipuliert wurde. Durch eine Mutation spaltet sie die DNA nur effizient, wenn sie als Heterodimer dimerisiert. So unterscheiden sich der „linke“ und der „rechte“ ZF nicht nur in der ZF-, sondern auch in der *FokI*-Domäne (Miller *et al.*, 2007). Weiterhin kann manchmal nur der *knockout*, nicht aber die Integration von Fremd-DNA, mit den ZF-Nukleasen katalysiert werden. Dies scheint jedoch ein Zelltyp-spezifisches Charakteristikum zu sein (Carroll, 2011). Auch die Herstellung der ZF-Nukleasen ist komplexer, als es die Theorie vermuten lässt. Ein Großteil der hergestellten ZF-Nukleasen ist nicht in der Lage, einen *knockout* zu katalysieren (Ramirez *et al.*, 2008; Joung *et al.*, 2010). Daher werden auch von Sangamo Biosciences stets mehrere ZF-Nukleasen gegen ein Zielgen hergestellt und getestet. Zudem eliminiert die Verwendung von ZF-Nukleasen nicht die Notwendigkeit des *screenings* nach dem gesuchten Klon. Zwar ist dank dieser Möglichkeit der gezielten Modifikation die Erfolgsquote einer Mutation deutlich höher als bei der HR, dennoch variiert die Mutationsfrequenz je nach Zelltyp und Zielgen zwischen $< 1\%$ und etwa 18% (Sander *et al.*, 2011). Diese Frequenz darf nicht mit der Wahrscheinlichkeit der Erzeugung einer funktionsfähigen ZFN verwechselt werden. Sie wird häufig mit 50% oder höher angegeben (Sander *et al.*, 2011), allerdings zeigen einige Studien, dass die Fehlerrate je nach Methode sogar bei $> 90\%$ liegt (Ramirez *et al.*, 2008; Joung *et al.*, 2010).

3.3.2 Verwendung von ZF-Nukleasen in biotechnologischen Fragestellungen

Ähnlich wie der siRNA-vermittelte *knockdown*, kann auch der *knockout* durch ZF-Nukleasen für einen biotechnologischen Zweck eingesetzt werden. Diese Technik wird immer häufiger für die Zellliniengenerierung oder -modifikation genutzt.

Tabelle 3.2: Beispiele für ZFN-*knockouts* im Zusammenhang mit biotechnologischer Anwendung. Mittlerweile gibt es auch eine Reihe von Publikationen über den Einsatz von ZF-Nukleasen zur Erzeugung transgener Tiere. Da dies kein direkter Fokus der Zellkulturtechnik ist, sind diese Veröffentlichungen hier nicht als Referenz angeführt.

Reaktionsweg	Zielgen(e)	Effekt	Referenz
Apoptose	<i>Bax</i> , <i>Bak</i>	Keine Caspase-Reaktion trotz Stimulus, erhöhter Produkttiter unter limitierenden Bedingungen	Cost <i>et al.</i> (2010)
Expression	<i>Dhfr</i>	Generierung von <i>Dhfr</i> ^{-/-} -Zellen in nur einem Monat	Santiago <i>et al.</i> (2008)
	<i>GluI</i>	Zellen konnten entsprechend des GS-MSX Genamplifikationssystems genutzt werden	Fan <i>et al.</i> (2012)
Glykosylierung	<i>Fut8</i>	Höhere Produktivität, Antikörper vollständig nicht-fucosyliert	Malphettes <i>et al.</i> (2010)
Verschiedene	<i>Dhfr</i> , <i>GluI</i> , <i>Fut8</i>	Schnelle Generierung von Triple- <i>knockouts</i> , Phänotyp entsprechend dem Genaktivitätsverlust	Liu <i>et al.</i> (2010)

Bisher wurden die ZF-Nukleasen verwendet, um in einem *proof-of-concept* bereits etablierte Selektionssysteme für CHO-Zellen mit dieser Methode nachzubauen. Dazu gehört z. B. der *knockout* und die Erzeugung von Dihydrofolatreduktase (*Dhfr*)-negativen Zellen (*Dhfr*^{-/-}) oder von Glutamin-Synthetase (*GluI*, eigentlich Glutamat-Ammonium-Ligase)-negativen CHO-Zellen (*GluI*^{-/-}) (Santiago *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2012). Es konnte auch gezeigt werden, dass der *knockout* der α -(1,6)-Fucosyltransferase zu einem Fucosylierungs-defizienten Phänotyp bei Antikörper-produzierenden CHO-Zellen geführt hat. In Tabelle 3.2 sind bisherige Arbeiten zum funktionalen Gebrauch der ZFN im Zusammenhang mit biotechnologischer Fragestellung aufgelistet. Ein einfacherer Zugang zur

ZFN-Technologie kann in Zukunft dazu beitragen, dass ein *knockout* eines Gens für biotechnologische Zwecke häufiger in Betracht gezogen werden wird.

3.4 Potentielle Ziel- bzw. Produktgene für die Zelllinienentwicklung

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Reduktion der Genexpression durch RNAi-vermittelten *knockdown* verschiedener Zielgene untersucht. Auf diese Weise sollte geprüft werden, wie sich eine Verringerung der mRNA bzw. des Proteins auf das Wachstum oder die Produktivität einer Antikörper-produzierenden Zelllinie auswirkt. Da die Zielgene aus unterschiedlichen zellulären Prozessen stammen, werden sie im Folgenden zunächst charakterisiert und die bereits über die Proteine bekannten Informationen zusammengestellt. Gleiches gilt auch für das Produktgen für Erythropoetin (*Epo*) welches, zusammen mit einer Glykosylierungsvariante, Darbepoetin alfa (*Darbe*), genutzt wurde, um weitere Produktionszellen zu generieren. Die Nomenklatur der Gene bzw. Proteine richtet sich nach den *Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat* (MGI, 2011). Abgekürzte Gen- oder Transkript-Namen sind daher kursiv geschrieben (Beispiel: *Lgals1*), Proteine werden durch Versalien dargestellt (Beispiel: LGALS1).

3.4.1 *SET nuclear oncogene* (SET) – ein Inhibitor der Histon-Acetylierung

Die eukaryotische DNA liegt in einem verpackten Zustand im Zellkern vor. Die erste Stufe dieser Verpackung ist die Windung der doppelsträngigen DNA um Histone. Histone sind basische Proteine, die sich zu Oktameren, bestehend aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4, zusammenlagern. Um diese Struktur winden sich etwa zweimal insgesamt 147 bp DNA und bilden dadurch ein Nukleosom (Peterson & Laniel, 2004), welches in Abbildung 3.4 dargestellt ist.

Das Nukleosom ist die erste Verpackungseinheit der DNA. Aus dieser perlschnurartigen Aneinanderreihung von Nukleosomen werden weitere, größere Einheiten gebildet, die dafür sorgen, dass das komplette Genom organisiert innerhalb des Zellkerns vorliegen kann. Für die Transkription eines Gens ist der Zugang der DNA-abhängigen RNA-Polymerase zu der DNA notwendig. Da nicht permanent Nukleosomen entwunden und wieder zusammengelagert werden können, kann die Zugänglichkeit der DNA durch Histon-Modifikationen reguliert werden. Eine dieser Modifikationen ist die Histon-Acetylierung. Die Acetylierung entsteht durch Übertragung einer Acetylgruppe an ein Lysin am N-Terminus eines Histons.

Dadurch dekondensieren die Nukleosomen und erleichtern der Polymerase den Zugang zur DNA (Mizzen & Allis, 1998; Struhl, 1998; Seo *et al.*, 2001; Eberharter & Becker, 2002).

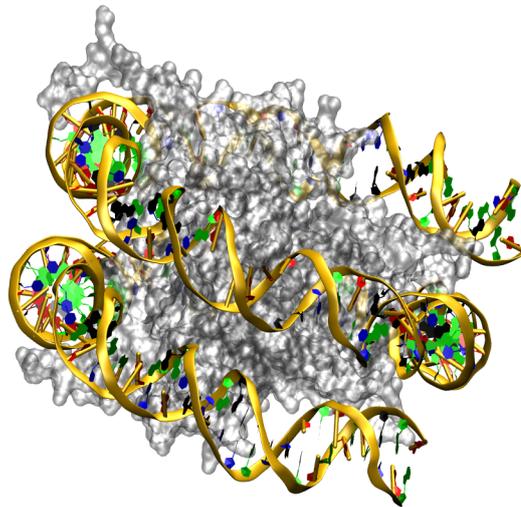


Abbildung 3.4: Modell eines Nukleosoms in Verbindung mit einem 147 bp-langen DNA-Fragment. Die Darstellung basiert auf den Daten der PDB-Datei 1AOI, die durch Röntgendiffraktion erstellt wurden (Luger *et al.*, 1997). Der Histon-Komplex ist lediglich als Oberflächenstruktur im Zentrum der kreisförmig umwundenen DNA dargestellt, um die Übersichtlichkeit der Darstellung zu erhalten. Die Grafik wurde mit VMD erstellt und durch POV-RayTM 3.6 gerendert (VMD, 2012; POV-RayTM, 2012).

Das Protein SET ist in Abbildung 3.5 dargestellt. *In vivo* bilden zwei SET-Monomere ein funktionelles Dimer. Es gehört zu dem *inhibitor of acetyltransferases* (INHAT)-Komplex (Seo *et al.*, 2001; Cervoni *et al.*, 2002). In seiner Struktur wird es als Telefonhörer-ähnlich beschrieben (Muto *et al.*, 2006). Durch diese Struktur kann das Protein sowohl mit den Histonen, als auch der DNA interagieren (Muto *et al.*, 2006). SET maskiert den Zugang zu Lysin 8 im Histon H4 und zu Lysin 14 in Histon H3, wodurch die Acetyltransferasen die entsprechenden Stellen nicht acetylieren können (Seo *et al.*, 2001). Auf diese Weise bleiben die Histone hypoacetyliert. Die Hypoacetylierung kann zusätzlich eine Hypermethylierung unterstützen (Cervoni *et al.*, 2002). Der *knockdown* von *Set* durch RNAi sollte das Transkriptlevel und dadurch die Proteinmenge reduzieren. So sollte durch Vermeidung einer Hypoacetylierung eine generelle Erhöhung der Transkription ermöglicht werden.

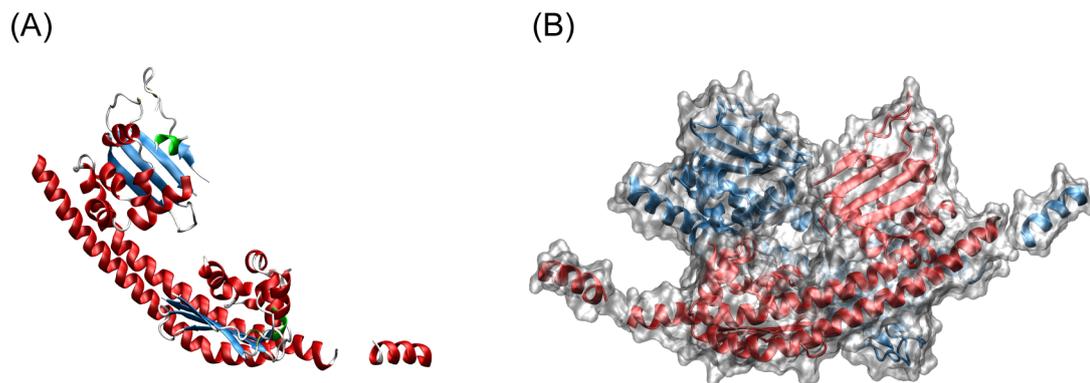


Abbildung 3.5: Grafische Darstellung des SET-Proteins. (A) zeigt die monomere Form von SET. Die α -Helix-Strukturen sind in Rot dargestellt, die β -Faltblatt-Strukturen in Blau. Die 3_{10} -Helices sind grün eingefärbt. In (B) ist die Modellierung der dimeren Struktur abgebildet. Zur besseren Unterscheidung der beiden Monomere wurden sie in Blau bzw. Rot eingefärbt, ohne besondere Kennzeichnung weiterer Sekundärstrukturen. Zusätzlich wurde die Oberflächenstruktur berechnet und transparent der dimerisierten Form hinzugefügt. Die Darstellungen basieren auf der PDB-Datei 2E50, wurden mit VMD erstellt und mit POV-RayTM 3.6 gerendert (VMD, 2012; PDB, 2012; POV-RayTM, 2012). Die Struktur von SET (2E50) wurde durch Röntgendiffraktion bestimmt (Muto *et al.*, 2006).

3.4.2 Der pro-apoptische *Bcl-2-associated death promoter* (BAD)

Die Apoptose ist, neben der Autophagie, einer der beiden möglichen Reaktionswege des programmierten Zelltods. In Organismen dient sie der Entfernung von unerwünschten oder defekten Zellen. Beispiel hierfür sind die Embryonalentwicklung (Brill *et al.*, 1999), oder der PZT von irreparabel-beschädigten Zellen, ausgelöst z. B. durch starke Bestrahlung (Dewey *et al.*, 1995). Aber auch in Zellkulturen führen Apoptose (Al-Rubeai & Singh, 1998; Simpson *et al.*, 1998; Goswami *et al.*, 1999) und auch Autophagie (Hwang & Lee, 2008; Han *et al.*, 2011; Lee & Lee, 2012b) zum Tod der Zellen. Während der Autophagie erst in den letzten Jahren mehr Aufmerksamkeit zuteil wurde, ist die Apoptose eine der am besten untersuchten Todesarten für zelluläre Systeme (Adams & Cory, 2001; Elmore, 2007). Die Apoptose wird durch ein komplexes Netzwerk aus anti- und pro-apoptischen Proteinen geregelt, die in ständiger Konkurrenz zueinander stehen.

Nimmt der Anteil aktiver pro-apoptischer Proteine durch entsprechende Stimuli zu, werden eine Reihe von Caspasen initiiert, die den PZT unwiderruflich auslösen. Caspasen

sind Proteasen, die Peptidbindungen C-terminal eines Aspartats spalten können (Fan *et al.*, 2005). Sie werden in Initiator- und Effektor-Caspasen eingeteilt. Als inaktive Form synthetisiert, liegen bis zu ihrer Aktivierung als Pro-Caspasen im Cytoplasma vor. Werden die Initiator-Caspasen, zu denen z. B. die Caspasen 8 und 9 gehören, aktiviert, spalten sie die Pro-Effektor-Caspasen (z. B. Caspase 3, 6 und 7) in eine aktive Form. Diese wiederum spalten zelleigene Proteine und aktivieren Nukleasen, wodurch die DNA der Zelle zerstört wird und die Zelle letztlich stirbt (Fan *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2012). Die Regulation der Apoptose-Kaskade erfolgt maßgeblich durch die Proteine der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie (Adachi & Imai, 2002; Fan *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2012). Die Proteine dieser Familie können zum einen pro-apoptotische, zum anderen auch anti-apoptotische Wirkungen haben. Der *Bcl-2-associated death promoter* oder verkürzt auch BAD, gehört zu den *BH3-only*-Proteinen der Bcl-2-Familie. Er ist Teil der pro-apoptotischen Proteine und enthält lediglich eine BH3 (*Bcl-2 homology 3*)-Domäne, die notwendig zur Heterodimerisierung mit anti-apoptotischen Proteinen, wie Bcl-XL und Bcl-2, ist (Lomonosova & Chinnadurai, 2008). Diese Domäne besteht aus 9–16 Aminosäuren mit einem zentralen Motiv aus 13 Aminosäuren. Allerdings ist dieses innerhalb der Subfamilie nicht strikt konserviert (Day *et al.*, 2008). Durch die Heterodimerisierung von BAD mit den anti-apoptotischen Proteinen werden diese inhibiert und können ihre Funktion nicht mehr ausüben (Adachi & Imai, 2002; Lomonosova & Chinnadurai, 2008). Eine grafische Darstellung der Proteinstruktur konnte nicht erstellt werden, da bisher keine Strukturanalysen zu BAD vorliegen. Eine Berechnung der theoretischen Struktur schlug ebenfalls fehl, da nicht ausreichend ähnliche Proteine in der Datenbank für einen Strukturvergleich zur Verfügung standen.

Apoptose kann grundsätzlich auf drei verschiedene Arten ausgelöst werden (Elmore, 2007): Über den extrinsischen, den intrinsischen und den Perforin/Granzym-Pfad. Der extrinsische Weg wird durch Bindung eines Todesliganden an einen entsprechenden Rezeptor in der Zellmembran ausgelöst. Daraufhin wird die Caspase 8 aktiv, die die Caspase 3 spaltet und dadurch die Apoptose-Kaskade auslöst. Der Perforin/Granzym-Pfad funktioniert über eine direkte Aktivierung der Caspase 3 durch Granzym B und wird durch T-Zellen ausgelöst. Diese binden an die Zielzellen und öffnen Poren in der Zellmembran mittels Perforin. Anschließend sekretieren sie Granzym-haltige Granula in das Cytoplasma. Das Granzym initiiert dann die Apoptose (Trapani & Smyth, 2002; Elmore, 2007).

Der intrinsische Weg wird durch Schäden an der DNA, Hypoxie oder auch Substratlimitierung ausgelöst. Er sorgt dafür, dass BAX (*BCL2-associated X protein*) und BAK (*BCL2-antagonist/killer*) Poren in der Membran der Mitochondrien, sogenannte *voltage-dependent anion channel* (VDAC) (Tsujimoto & Shimizu, 2000), bilden, die ein Ausströmen verschiedener mitochondrialer Komponenten bewirken. Cytochrom C ist eines der aus den

Mitochondrien freigesetzten Moleküle (Fan *et al.*, 2005; Arden & Betenbaugh, 2006; Elmore, 2007; Martin *et al.*, 2012). Dieses bindet Apaf-1 und die Pro-Caspase 9 wodurch sich das Apoptosom bildet (Elmore, 2007). Letztlich führt dies wiederum zur Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen und dem Durchlaufen des Apoptose-Prozesses. Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL können das Ausströmen des Cytochrom C, wahrscheinlich durch Veränderungen des VDACs, verhindern. Ihre Inaktivierung z. B. durch BAD kann daher Apoptose-fördernd wirken. BAD liegt unter normalen Bedingungen phosphoryliert im Cytoplasma vor (Yang *et al.*, 1995; Zha *et al.*, 1996, 1997; Adams & Cory, 2001; Adachi & Imai, 2002). In diesem Zustand ist es an die 14-3-3-Proteine gebunden und damit inaktiv. Eine Dephosphorylierung kann die Bindung zu den 14-3-3-Proteinen aufheben und die *BH3-only*-Domäne reaktivieren. Anschließend bildet BAD Heterodimere mit den anti-apoptotischen Proteinen aus. Die hauptsächliche Dimer-Bildung und damit die Wirkung von BAD beruht auf der Bindung mit Bcl-XL und weniger auf der Dimerisierung mit Bcl-2. Der Grund dafür liegt in der stärkeren Bindung zu Bcl-XL (Hirai & Wang, 2001). Zudem konnte durch die Phosphorylierung von BAD eine Dissoziation von Bcl-XL, nicht aber von Bcl-2, nachgewiesen werden (Hirai & Wang, 2001; Adachi & Imai, 2002). Durch die Inaktivierung der anti-apoptotischen Proteine wird das Cytochrom C der Mitochondrien freigesetzt und die Apoptose-Kaskade initiiert.

Die Gründe für die Initiierung der Apoptose in Zellkulturen können vielfältig sein. Eine Substratlimitierung ist einer dieser Gründe (Simpson *et al.*, 1998; Hwang & Lee, 2008). Um die Limitierung zu umgehen, kann ein konzentriertes Medium zugeführt werden. Dadurch kann der Zeitpunkt der Induktion der Apoptose zwar hinausgezögert, letztlich jedoch nicht verhindert werden (Han *et al.*, 2011). Weitere Gründe wie Scherstress, Hypoxie oder variierende pH-Werte können ebenfalls apoptotische Prozesse auslösen. Eine Verzögerung der Apoptose kann eine Vergrößerung des Zell-Zeit-Integrals oder ein verbessertes Wachstumsprofil durch Erhöhung der maximalen viablen Zelldichte oder der Viabilität bewirken. Der RNAi-vermittelte *knockdown* der pro-apoptotischen Gene *Bax* und *Bak* konnte eine Verlängerung des Wachstums und eine Erhöhung der Lebendzellichte hervorrufen (Lim *et al.*, 2006). Aber auch andere Beispiele wie der *knockdown* von *Requiem* oder den Caspasen 3 und 7 hatten positive Effekte auf das Wachstum oder den Produkttiter von rekombinanten CHO-Zellen (Wong *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2007). Der gezielte *knockdown* von *Bad* als pro-apoptotischer Faktor sollte ebenso eine Verlängerung der Wachstumsphase bzw. eine Zunahme der maximalen Lebendzellichte während der Kultivierung auslösen.

3.4.3 Galectin-1 (LGALS1) – Ein Multifunktionsprotein

Galectin-1 gehört zu der Familie der Galaktose-bindenden Lektine. Die Proteine dieser Familie wurden zunächst in Extrakten von Vertebraten-Gewebe isoliert (Cooper & Barondes, 1999), sie liegen aber in einer Vielzahl von tierischen Zellen konserviert vor (Liu *et al.*, 2012). Die formale Definition der Galectin-Familie erfolgte 1994 (Barondes *et al.*, 1994). Ihnen allen gemein ist eine etwa 130 Aminosäuren-lange Sequenz, die das Strukturmotiv der *carbohydrate recognition domain* (CRD) enthält, sowie die Fähigkeit, Galaktose zu binden (Cooper & Barondes, 1999; Liu *et al.*, 2012). Die CRD befindet sich in den meisten Fällen zwischen den Aminosäuren 30 und 90 und wird durch nur ein Exon kodiert (Cooper & Barondes, 1999). Interessanterweise besitzt keines der Galectine ein Signalpeptid, nichtsdestoweniger sind sie sowohl cytosolisch, als auch extrazellulär lokalisiert. Der Haupt-Sekretionsweg für die Galectine konnte bislang nicht identifiziert werden. Allerdings werden verschiedene unkonventionelle Pfade, wie ein aktiver Transport, Exozytose, Autophagy oder vesikulärer Transport in Betracht gezogen (Hughes, 1999). Es scheint zudem, dass die Galectine über mehrere dieser Wege sekretiert werden können und dass es eventuell Unterschiede im Sekretionsverhalten zwischen verschiedenen Zelltypen gibt. Die 15 bisher identifizierten Galectine werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt (Liu *et al.*, 2012). Die erste Klasse bilden die Prototyp-Galectine. Zu ihnen gehören Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 und -14. Sie bestehen aus zwei Homodimeren und können Liganden auf der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix binden. Zu der zweiten Klasse, den chimären-Galectinen, gehört bislang lediglich Galectin-3. Es besteht C-terminal aus einer CRD und N-terminal aus einem Tyrosin-reichen Ende. Die letzte Klasse bilden die *tandem-repeat*-Galectine. Zu ihnen zählen die Galectine-4, -6, -8, -9 und -12. Sie besitzen zwei CR-Domänen.

Galectin-1 ist ein 14 kDa schweres Polypeptid. Es kann sowohl als nicht-kovalent gebundenes Homodimer (Cho & Cummings, 1995a; Yang & Liu, 2003; Liu *et al.*, 2012), wie auch in monomerer Form vorliegen (Cho & Cummings, 1995a). Die Kristallstruktur des Proteins ist die erste der Galectin-Familie, die genauer untersucht wurde. LGALS1 faltet sich in eine 6- und eine 5-strängige, antiparallele β -Faltblatt-Struktur, wie in Abbildung 3.6 dargestellt (Liao *et al.*, 1994). *In vivo* wird es in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wobei sich das Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung durch Methylierung des Gens verändert (Yang & Liu, 2003; Camby *et al.*, 2006).

Wie bereits zuvor erwähnt, liegt LGALS1 sowohl cytosolisch, als auch extrazellulär vor. Neben der ungeklärten Frage des Sekretionsweges, wirft diese Tatsache weitere Fragen auf, da gezeigt werden konnte, dass LGALS1 ohne die reduzierenden Bedingungen des Cytoplasmas schnell inaktiviert wird. Mithilfe weiterer Analysen wurde festgestellt, dass LGALS1

durch Bindung eines Liganden sofort stabilisiert wird und auf diese Weise auch extrazellulär vorliegen kann (Cho & Cummings, 1995b). Weiterhin wurde eine Konzentrationsabhängigkeit im Wechsel zwischen monomerer und dimerer Form nachgewiesen, sowie ein reversibles Monomer/Homodimer Gleichgewicht (Cho & Cummings, 1995b).

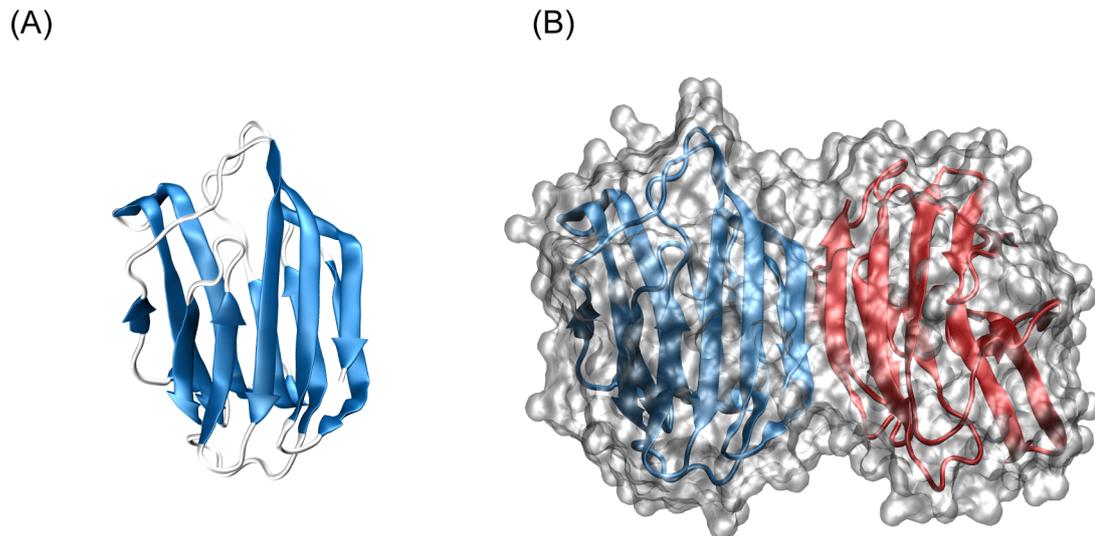


Abbildung 3.6: Modellierung der Tertiärstruktur von Galectin-1. Die Abbildungen basieren auf der PDB-Datei 1GZW, die aus einer Röntgendiffraktion erstellt wurde (López-Lucendo *et al.*, 2004). (A) zeigt die monomere Form von Galectin-1. Die β -Faltblatt-Strukturen sind blau eingefärbt. Die 5-strängigen Faltblätter liegen im Vordergrund, während die 6-strängigen antiparallelen Strukturen im Hintergrund sind. (B) zeigt die Darstellung der dimerisierten Form von Galectin-1. Dabei wurden die Monomere zur besseren Unterscheidung blau bzw. rot eingefärbt. Die Proteinoberfläche wurde ebenfalls berechnet und transparent hinzugefügt. Die Erstellung der Grafiken erfolgte mittels VMD und POV-RayTM 3.6 (VMD, 2012; POV-RayTM, 2012).

Die veröffentlichte Literatur ist in Bezug auf die Funktion und den Wirkungsmechanismus von LGALS1 nicht einheitlich. Es wurden sowohl Proliferations-fördernde, als auch Apoptose-induzierende Eigenschaften berichtet (Yang & Liu, 2003; Camby *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012). Beispielsweise wurde in embryonalen Maus-Fibroblasten durch Zugabe von LGALS1 ein Zellzyklusarrest in der G2-Phase bewirkt (Wells & Mallucci, 1991). In anderen Zellen (Fibroblasten der Ratte und BALB 3T3 Fibroblasten der Maus) konnte hingegen eine wachstumsstimulierende Wirkung festgestellt werden (Yamaoka *et al.*, 1991; Paz *et al.*, 2001). Rekombinantes LGALS1 hatte auf humane Fibroblasten eine konzentrationsabhängige

ge Wirkung. In geringen Mengen konnte es die Proliferation der Zellen stimulieren, allerdings konnte es durch Laktose inhibiert werden. In höheren Mengen wirkte es als Wachstumsinhibitor und war durch Laktose nicht zu blockieren (Adams *et al.*, 1996). Der exakte Mechanismus, durch den das zelluläre Wachstum beeinflusst wird, ist jedoch unklar. Allerdings konnte gezeigt werden, dass intrazelluläres LGALS1 mit dem aktivierten membrangebunden RAS-Protein interagieren kann (Paz *et al.*, 2001), wodurch das Wachstum tierischer Zellen angeregt wurde. Das RAS-Protein ist ein wichtiger Mediator in dem RAS-RAF-MAPK-Signaltransduktionspfad (Molina & Adjei, 2006), der das Zellwachstum, die Apoptose, aber auch translatorische Prozesse und die Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren reguliert. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Galectin-1 im pre-mRNA-*splicing*-Prozess involviert ist (Vyakarnam *et al.*, 1997).

Obgleich die bisherigen Effekte von LGALS1 widersprüchlich erscheinen, können sie auch Beispiele für die vielfältigen zellulären Prozesse sein, in denen LGALS1 eine mehr oder minder wichtige Funktion zu übernehmen scheint. Es wäre also möglich, dass der von LGALS1 ausgelöste Effekt abhängig von verschiedenen Bedingungen ist. Dazu können der Zelltyp aber auch die Kulturbedingungen zählen. Die Ergebnisse eines *knockdowns* von *Lgals1* in einer CHO-Zelle waren somit nicht exakt vorhersehbar, da der *knockdown* entweder Proliferations- oder Apoptose-induzierend wirken könnte. In einer differentiellen Proteomanalyse zwischen Hochproduzenten und wenig produzierenden CHO-Zellen konnte in den Hochproduzenten eine reduzierte LGALS1-Menge detektiert werden (Carlage *et al.*, 2009). Dies könnte ein Hinweis auf eine möglicherweise für eine Produktionszelle positive Eigenschaft sein. Daher sollte durch den RNAi-vermittelten *knockdown* von *Lgals1* in CHO-Zellen untersucht werden, ob Galectin-1 eine Auswirkung auf das zelluläre Wachstum oder die Produktivität der Zellen hat.

3.4.4 Das *PHD finger protein 3* (PHF3)

Über PHF3 ist derzeit nur sehr wenig bekannt. Es wurde im Rahmen einer Analyse von Glioblastom-Tumoren genauer charakterisiert (Fischer *et al.*, 2001). PHF3 verfügt über drei Strukturmodule, die typisch für Transkriptionsfaktoren sind. Dazu gehören die *plant homeodomain* (PHD), die *Spn paralog and ortholog C-terminal* (SPOC)-Domäne und die Domäne der zentralen Region von Transkriptionselongationsfaktor S-II (TFS2M). Die PHD ist eine etwa 51 Aminosäure-lange Sequenz, die zumeist durch ein Cys₄-His-Cys₃-Motiv charakterisiert ist (Aasland *et al.*, 1995; Pascual *et al.*, 2000). Diese Struktur koordiniert zwei Zn²⁺-Ionen und gleicht damit den Zinkfinger-Proteinen, die mit der DNA interagieren können. Vergleiche mit anderen PHD-enthaltenden Proteinen zeigten, dass sie alle in

der Transkription beteiligt sind (Pascual *et al.*, 2000). Die genaue Funktion der SPOC-Domäne ist derzeit noch unklar. Allerdings wurde sie in vielen Proteinen nachgewiesen, die die Expression wichtiger Transkriptions-Effektoren (wie Transkriptionsrepressoren oder -aktivatoren) kontrollieren (Ariyoshi & Schwabe, 2003; Sánchez-Pulido *et al.*, 2004). Dazu gehören unter anderem auch Effektoren, die die Apoptose regulieren. Der Transkriptions-elongationsfaktor S-II ermöglicht der RNA-Polymerase II die Transkription langer mRNAs und die Korrektur fehlerhaft eingebauter Basen durch Stimulation der Nuklease-Aktivität der Polymerase. Das Vorhandensein dieser Domäne deutet auf eine ähnliche Funktion von PHF3 hin. Zusammengenommen kann aus diesen Informationen geschlossen werden, dass PHF3 wahrscheinlich eine Art Transkriptionsfaktor ist, der die Transkription einiger Elemente der zellulären Signalwege reguliert. Aufgrund unzureichender Daten und fehlender Strukturanalysen, konnte keine Abbildung von PHF3 erstellt werden.

In einem Microarray-Experiment mit dem Ziel, differentiell exprimierte Gene bei Induktion einer Zellkultur mit Natriumbutyrat zu identifizieren (Abschnitt A.2), wurde eine Reduktion des *Phf3*-Transkriptlevels unter Natriumbutyrat-Induktion festgestellt. Durch eine artifizielle Reduktion der *Phf3*-mRNA sollten mögliche Auswirkungen dieser Reduktion in einer Modellzelllinie evaluiert werden.

3.4.5 Das *Yippee-like 3*-Protein (YPEL3)

Ypel3 gehört zu einer neuen, kürzlich entdeckten Genfamilie. Zu der Familie der *Ypel*-Gene gehören fünf, wahrscheinlich paraloge Gene (*Ypel1–5*), die eine hohe Orthologie zu den *Yippee*-Genen von *D. melanogaster* aufweisen (Hosono *et al.*, 2004; Kelley *et al.*, 2010). Sie enthalten eine putative Zinkfinger-Domäne, die stark konserviert vorliegt (Roxström-Lindquist & Faye, 2001).

In murinen Zellen wurde das Protein zuvor als *small unstable apoptotic protein* (SUAP) bezeichnet, bevor es der *Ypel*-Familie zugeordnet und dadurch reklassifiziert wurde (Baker, 2003). Baker konnte feststellen, dass YPEL3 eine Proliferations-inhibierende Wirkung hat und zugleich Apoptose fördert. In humanen Zellen wurde gezeigt, dass die Proliferations-inhibierende Wirkung wahrscheinlich auf dem Auslösen zellulärer Seneszenz beruht (Kelley *et al.*, 2010). In Tumoren, die ein unkontrolliertes Wachstum zeigen, ist die Expression von YPEL3 häufig reduziert, was auf Methylierungen des Promotors zurückzuführen ist (Kelley *et al.*, 2010). Abbildung 3.7 zeigt eine grafische Darstellung von YPEL3.

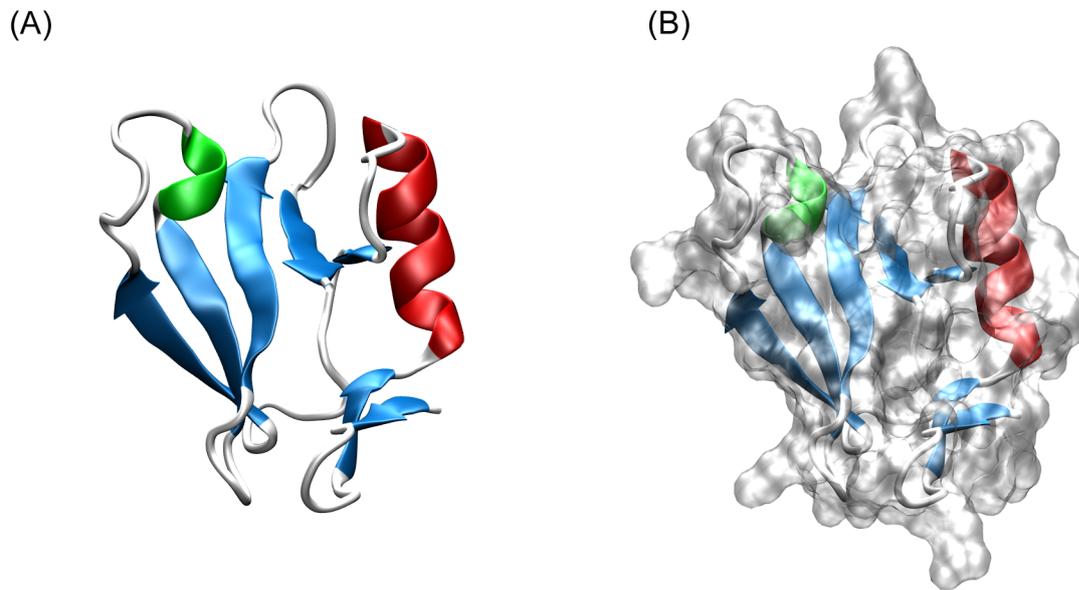


Abbildung 3.7: Theoretisch berechnete Tertiärstruktur von YPEL3. Da bisher keine Strukturanalysen zu diesem Protein vorliegen, wurde die dargestellte Konformation mit Hilfe von Phyre2 berechnet (Phyre2, 2012). 65 % der Struktur wurde dabei mit einer Konfidenz von 93,5 % basierend auf der Struktur der Methionin-R-Sulfoxid Reduktase (3CEZ) modelliert. In Rot ist die α -Helix gezeigt, in Grün eine 3_{10} -Helix. Die verschiedenen β -Faltblatt-Strukturen sind blau eingefärbt. (A) stellt die reine Tertiärstruktur dar, während in (B) zusätzlich die berechnete Proteinoberfläche modelliert wurde. Die Grafiken wurden mit VMD erstellt und mit POV-RayTM 3.6 gerendert (VMD, 2012; POV-RayTM, 2012).

Durch das oben bereits beschriebene Microarray-Experiment (Abschnitt 3.4.4), konnte eine Erhöhung des *Ypel3*-Transkriptlevels detektiert werden. In Übereinstimmung mit den zuvor für die Wirkungsweise von YPEL3 gemachten Erkenntnissen, könnte eine Reduktion der Genexpression bzw. der Transkriptmenge zu einer Verminderung apoptotischer Prozesse während einer Kultivierung führen. Zusätzlich könnte das Zellwachstum verbessert werden, da Proliferations-inhibierende Effekte verringert werden würden. Auf diese Weise wäre eine Erhöhung des Zell-Zeit-Integrals und dadurch wahrscheinlich auch eine Steigerung der Produktkonzentration möglich.

3.4.6 Struktur und Funktion von Erythropoetin und der Glykosylierungsvariante Darbepoetin alfa

Erythropoetin (EPO) ist ein ca. 30,6 kDa schweres Glykoprotein, das die Erythropoese, die Bildung roter Blutkörperchen, beeinflusst. Dabei fördert EPO durch Stimulation der Proliferation von erythroiden Vorläuferzellen, speziell den *colony-forming units – erythroid*, die Bildung der Erythrozyten (Fisher, 2003). Die Bildung des Hormons findet bei adulten Menschen hauptsächlich in den Nieren statt. Die Transkription der *Epo*-mRNA wird durch einen 50 bp langen Hypoxie-sensitiven *Enhancer* reguliert (Fisher, 2003). Auf diese Weise kann die Konzentration von EPO bei Sauerstoffarmut deutlich erhöht werden, was zu einer größeren Menge an Erythrozyten führt. Es wird daher als Therapeutikum bei Anämien, die z. B. durch eine Dialyse oder ein Nierenversagen verursacht werden können, verabreicht. 2006 erreichte EPO einen Verkaufswert von \$6,024 Milliarden (Lee *et al.*, 2012). Obwohl der Umsatz jährlich sinkt, ist es noch immer ein verkaufstarkes Biopharmazeutikum (Walsh, 2010).

EPO wurde erstmals 1977 aus dem Urin anämischer Patienten isoliert (Miyake *et al.*, 1977) und einige Jahre später rekombinant hergestellt (Jacobs *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985). Es besteht aus einer einzigen, 165 Aminosäure-langen Polypeptidkette. Das Protein ist an vier Stellen glykosyliert. An Serin 126 befindet sich die einzige O-Glykosylierung. Die restlichen Glykostrukturen bestehen aus N-Glykosylierungen an den Asparaginresten 24, 38 und 83. Der durchschnittliche Anteil der Zuckerstrukturen am Molekulargewicht beträgt etwa 35–40 %, wodurch die tatsächliche Masse des Proteins zwischen 34 und 36 kDa liegt (Lai *et al.*, 1986; Takeuchi *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2012). Rekombinantes EPO wird fast ausschließlich von CHO-Zellen produziert, da die Glykosylierungsstrukturen den nativen, humanen am ähnlichsten sind (Sasaki *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 2012). Allerdings gibt es auch aktuelle Ansätze, in denen humanisierte Hefen zur Expression verwendet werden (Nett *et al.*, 2012). Die Pharmakokinetik und -dynamik des so produzierten EPOs soll in Tiertests vergleichbar zu denen von Aranesp[®] sein. Aranesp[®] ist der Handelsname des in CHO-Zellen produzierten Darbepoetin alfa (DARBE). Es wurde 1988 in der EU zugelassen und gehört zu den 10 kommerziell erfolgreichsten Biopharmazeutika 2009 (Walsh, 2010).

Die Glykostruktur hat einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit eines Proteins (Egrie & Browne, 2001). Dabei ist vor allem die terminale Sialylierung entscheidend für die *in vivo*-Aktivität und Serumhalbwertszeit (Egrie & Browne, 2001; Ngantung *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden verschiedene Strategien angewandt, um den Sialylierungsgrad des EPOs zu erhöhen. Dazu gehören Modifikationen in der Prozessführung, wie z. B. die Reduktion der Kultivierungstemperatur auf 32 °C (Yoon *et al.*, 2003), aber auch Verände-

rungen der Produktionszelle. Bork *et al.* (2007) konnten durch eine Überexpression der UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin kinase (GNE) den Sialylierungsgrad erhöhen. Neben der Veränderung des Prozesses oder der Produktionszelle, ist aber auch eine Modifikation des EPOs selbst möglich. Aranesp[®] bzw. Darbepoetin alfa ist eine dieser Hyperglykosylierungsvarianten. DARBE unterscheidet sich von EPO durch zwei weitere N-Glykane, die durch eine Mutation von fünf Aminosäuren (Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp88Asn, Pro90Thr) eingeführt werden konnten (Egrie & Browne, 2002). Auf diese Weise wurde der Anteil der Zuckerstrukturen von etwa 40 % auf ca. 52 % angehoben, was zu einer dreimal höheren Plasma-Halbwertszeit und einer besseren *in vivo*-Aktivität im Vergleich zu EPO führt (Powell & Gurk-Turner, 2002).

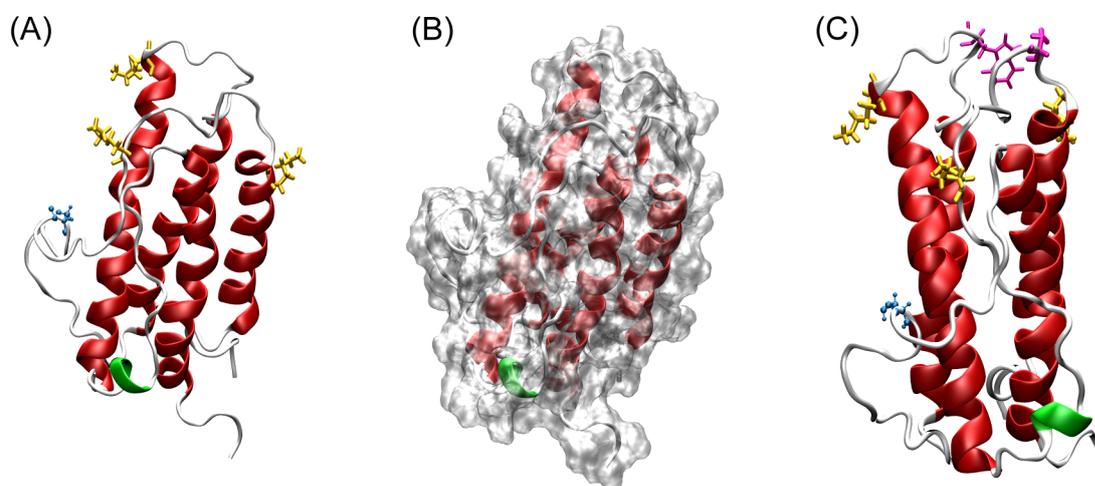


Abbildung 3.8: Tertiärstrukturen von humanem EPO und DARBE mit Positionen der Glykosylierungen. Die Modelle basieren auf der PDB-Datei 1BUY, die durch NMR-Spektroskopie erzeugt wurde (Cheetham *et al.*, 1998). (A) zeigt eine modellierte Tertiärstruktur, deren α -Helices in Rot und die 3_{10} -Helix in Grün gefärbt wurden. Die gelb-orangen Strukturen sollen die Positionen der N-Glykosylierungen markieren. Die blaue Struktur ist eine Representation der O-Glykosylierung. Bei den Zuckerstrukturen handelt es sich lediglich um eine grafische Darstellung und nicht um korrekte Abbildungen der Glykostrukturen. In (B) ist neben der Tertiärstruktur noch die transparente, berechnete Oberfläche dargestellt. (C) zeigt die ungefähre Konformation von DARBE. Die neu eingeführten N-Glykosylierungen sind durch magentafarbene Strukturen symbolisiert. Die Grafiken wurden mit VMD erstellt und mit POV-RayTM 3.6 gerendert (VMD, 2012; POV-RayTM, 2012).

In dieser Arbeit wurden EPO und DARBE als Modellproteine für die Generierung stabiler CHO-Produktionszellen genutzt. Die so erzeugten Zellen sollten die Basis für fortführende Arbeiten am RNAi-basierten *knockdown* bilden, mit deren Hilfe die Übertragbarkeit der hier gewonnenen Erkenntnisse getestet werden kann. Die Tertiärstrukturen von EPO und DARBE sind in der Abbildung 3.8 dargestellt.

3.5 Motivation der Arbeit

Der steigende Bedarf an Biopharmazeutika geht einher mit einer wachsenden Nachfrage an hochproduzierenden Zelllinien. Verschiedene Ansätze konnten bereits zeigen, dass eine Überexpression bestimmter Gene Verbesserungen in Bezug auf das Wachstum oder die Produktivität von tierischen Zellen ermöglichen. Dagegen ist die gezielte Reduktion der nativen Genexpression eine im Bereich der Zelllinienentwicklung noch immer unter-repräsentierte Methode, um die genannten Ziele zu erreichen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden drei verschiedene Techniken zur gezielten Modifikation von Zelllinien eingesetzt. Zwei davon, die RNA-Interferenz und die Zinkfinger-Nuklease-Technologie basieren auf der Reduktion der Genexpression durch Degradierung der mRNA oder Mutation der genomischen DNA. Die dritte Methode ist die klassische Überexpression zur Erzeugung von neuen Produktionszelllinien.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der RNA-Interferenz. Durch die Reduktion der Transkriptmengen verschiedener Zielgene sollte ein potentieller Effekt für das Produktionsverhalten tierischer Zellen evaluiert werden. Die Zielgene entstammten dabei unterschiedlichen zellulären Reaktionswegen, wie z. B. der Apoptose oder der Histon-Acetylierung. Auf diese Weise sollte der Produkttiter direkt durch Erhöhung der zellspezifischen Produktivität, oder indirekt über das Zell-Zeit-Integral, erhöht werden. Zur Identifikation der Zielgene wurden sowohl rationale Überlegungen, als auch zielgerichtete Identifikationen potentiell geeigneter Gene mittels eines Microarray-Experimentes durchgeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine neue Technologie zur schnellen und effizienten Genmutation in tierischen Zellen getestet. Mithilfe der Zinkfinger-Nuklease-Technologie sollte die Glutamin-Synthetase ausgeschaltet werden. Auf diese Weise würde ein oft genutztes Selektions- und Amplifikationssystem nachgestellt werden, mit dessen Hilfe auf einfache Weise Produktionszellen generiert werden können.

Der letzte Teil der Arbeit beschreibt die Erzeugung verschiedener Produktionszellen. Sie wurden durch ungerichtete Integration von Plasmid-Vektoren gewonnen und können z. B. für weitere RNA-Interferenz-Experimente genutzt werden.

4 Material und Methoden

Alle im nachfolgenden angegebenen Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser (abgekürzt als dH₂O) aus einer Milli[®]-Q-Anlage (Fa. Millipore, USA) hergestellt. Für Arbeiten mit RNA wurden zertifizierte DNase-, RNase- und pyrogenfreie Pipettenspitzen verwendet. Die Arbeitsfläche wurde zuvor mit RNase AWAY[®] (Fa. Molecular BioProducts, USA) dekontaminiert. RNase-freies Wasser wurde durch eine Behandlung von dH₂O mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) erzeugt. Dazu wurde eine 0,1 %ige DEPC-Lösung in dH₂O angesetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Wasser autoklaviert, wodurch restliche DEPC-Bestandteile zu CO₂ und Ethanol zerfielen (Sambrook & Russell, 2001). Sämtliche Glasgeräte wurden sowohl für mikrobiologische Arbeiten, als auch für Zellkultur-Methoden durch Autoklavieren sterilisiert.

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte in LB (*lysogeny broth*)-Medium (Bertani, 2004), welches bei Bedarf mit einem Antibiotikum supplementiert wurde. Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurde der *E. coli* Stamm TOP10 (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Die Inkubation der Bakterien erfolgte auf Festmedium oder in flüssiger Schüttelkultur als Vorbereitung für eine Plasmid Mini- oder Maxi-Präparation (Abschnitt 4.2.10). Die Agarplatten wurden nach dem Beimpfen mit Bakterien für 12–16 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (Function Line, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Für eine Plasmid Mini-Präparation wurden 5 mL LB-Medium in einem Kultivierungsröhrchen vorgelegt, welches mit einer Kapsenberg-Kappe (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt) verschlossen werden konnte. Mittels einer sterilen Pipettenspitze wurde eine einzelne Kolonie einer Agarplatte in das Medium überführt. Anschließend wurden die Kulturröhrchen schüttelnd bei 37 °C und 200 rpm zwischen 12 und 16 h inkubiert (CERTOMAT[®] MO II, 25 mm Auslenkung, Fa. Sartorius AG, Göttingen; CERTOMAT[®] H, Fa. B|Braun, Melsungen). Die Anzucht von Bakterien für eine Plasmid Maxi-Präparation wurde in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt, welcher mit einem luftdurchlässigen Silikonschwamm (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt) verschlossen werden konnte. Für eine Plasmid

Maxi-Präparation wurden 150–300 mL LB-Medium verwendet, wobei das Inokulum ebenfalls eine einzelne Kolonie einer Agarplatte war. Die Kultivierungsbedingungen waren analog zu denen der Mini-Präparation.

Das LB-Medium wurde mit dH₂O hergestellt. Für die Herstellung von Agarplatten wurde der LB-Agar nach dem Autoklavieren auf ca. 40 °C abgekühlt und gegebenenfalls ein Antibiotikum hinzugefügt. Die verwendeten Medien, die mit Chemikalien der Firma Roth (Karlsruhe) hergestellt wurden, sowie der Genotyp des TOP10-Stammes sind in Tabelle 4.1 dokumentiert.

Tabelle 4.1: Genotyp des verwendeten Bakterienstammes sowie Auflistung der für die mikrobiologischen Arbeiten genutzten Medien und deren Zusammensetzung.

Bakterienstamm und Medien	Zusammensetzung / Genotyp
TOP10 <i>E. coli</i>	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) θ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> λ-
LB-Medium	1,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl
LB-Agar	1,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 1,2 % (w/v) Agar (Agar-Agar-KobeI)
SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2,0 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 2 mM Glukose

4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Sambrook & Russell, 2001). Dazu wurden 100 mL LB-Medium in einem 1 L Erlenmeyerkolben mit 50 µL Bakteriensuspension angeimpft und unter Schütteln bei 250 rpm und 37 °C (CERTOMAT[®] MO II, 25 mm Auslenkung, Fa. Sartorius AG, Göttingen;

CERTOMAT[®] H, Fa. B|Braun, Melsungen) etwa 3 h inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde in regelmäßigen Abständen durch Probenahme und photometrische Ermittlung der optischen Dichte (OD₆₀₀) kontrolliert. Erreichte diese einen Wert von 0,35 AU (*absorption unit*), wurde die Suspension in vorgekühlte 50 mL Zentrifugenröhrchen (Fa. Corning B.V. Life Sciences, Niederlande) überführt und die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien durch zehnminütige Zentrifugation bei 4 °C und 2700 g pelletiert (Rotina 420R, Fa. Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 mL eiskalter MgCl₂-CaCl₂-Lösung (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂) aufgenommen. Die Zentrifugation bei 4 °C und 2700 g wurde wiederholt und der Überstand verworfen. In einem letzten Schritt wurde das Pellet in 2 mL 100 mM CaCl₂, 15 % Glycerin (v/v) pro 50 mL ursprünglicher Kultur aufgenommen, in Aliquote je 50 µL aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

4.1.3 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen wurde ein 50 µL Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 1–50 ng Plasmid-DNA oder 5 µL eines Ligationsansatzes (Abschnitt 4.2.6) gegeben und das Gemisch 10 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock für 50 s bei 42 °C sorgt für eine Freisetzung von Lipiden aus der äußeren Membran. Dies führt zur Bildung von Poren, die den Eintritt der DNA in die Zelle ermöglichen. Weiterhin senkt der Temperaturanstieg das Membranpotential, was der DNA das Passieren der inneren Membran erleichtert (Panja *et al.*, 2008). Nach dem Hitzeschock wurde die Suspension 10 min auf Eis gekühlt. Der Suspension wurden 800 µL SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)-Medium (Tabelle 4.1), hinzugefügt und die Zellen wurden 30 min bei 950 rpm und 37 °C geschüttelt (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf AG, Hamburg). Diese Phase ermöglichte die Etablierung der Antibiotikaresistenz. Die Bakterien wurden durch 2-minütige Zentrifugation bei 8000 g pelletiert (MiniSpin[®], Fa. Eppendorf AG, Hamburg) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde im Rücklauf aufgenommen und die Suspension auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausgestrichen. Die Agarplatten wurden 12–16 h bei 37 °C im Brutschrank (Function Line, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte) inkubiert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird zur *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten eingesetzt (Saiki *et al.*, 1985). Durch eine zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation kann eine fast exponentielle Anreicherung einer DNA-Sequenz erzielt werden. Die dazu verwendeten Polymerasen und PCR-Programme wurden entsprechend des Zwecks der jeweiligen PCR ausgewählt. Reaktionen, in denen die Sequenzintegrität eines PCR-Amplifikats entscheidend war, wurden mit der KAPAHiFiTM-Polymerase (Fa. PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Diese gentechnisch veränderte Polymerase zeichnet sich durch eine hohe Prozessivität (1000 Basen / 30 s) und optimierte *proofreading*-Aktivität aus. Die KAPAHiFiTM-DNA-Polymerase erzeugt *blunt-end* Fragmente.

Für analytische PCRs oder Kolonie-PCRs wurde die DreamTaqTM-Green-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) mit dem farblosen Standard-Puffer oder dem DreamTaqTM-Green-Puffer verwendet. Dieser spezielle Puffer erlaubt das direkte Auftragen einer PCR-Reaktion auf ein Agarosegel (Abschnitt 4.2.7) und eliminiert die Notwendigkeit, nach der PCR der Reaktion Ladepuffer hinzuzufügen. Die mit der DreamTaqTM-DNA-Polymerase erzeugten PCR-Amplifikate besitzen 3'-Adenin-Überhänge. Alle PCR-Ansätze wurden mit dem Mastercycler[®] pro S (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt.

4.2.1.1 PCR mit der *proofreading* KAPAHiFiTM-DNA-Polymerase

Damit die Integrität einer Sequenz bei einer Vervielfältigung durch eine PCR gewährleistet werden konnte, wurde die KAPAHiFiTM-DNA-Polymerase (Fa. PeqLab, Erlangen) verwendet. Ein Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 25 μ L. Die Zusammensetzung einer solchen Reaktion ist in Tabelle 4.2 dargestellt, das verwendete Programm in Tabelle 4.3. Aufgrund der im Vergleich zu anderen Polymerase-Puffern höheren Salzkonzentration wird das Schmelzverhalten der DNA-Stränge beeinflusst (PeqLab, 2012). Daher ist die Denaturierungstemperatur (98 °C) 3 °C höher als üblich (vgl. Abschnitt 4.2.1.2).

Tabelle 4.2: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit der KAPAHiFiTM-DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen [μL]	Finale Konzentration
10 \times Puffer	5	1 \times
dNTP-Mix	0,75	0,3 mM
<i>forward</i> Primer (10 μM)	1	0,3 μM
<i>reversed</i> Primer (10 μM)	1	0,3 μM
<i>template</i> DNA	variabel	≤ 50 ng genom. DNA; ≤ 5 ng Plasmid
KAPAHiFi TM (1 U/ μL)	0,5	0,02 U/ μL
dH ₂ O	ad 25	-

Tabelle 4.3: PCR-Programm zur Verwendung mit der KAPAHiFiTM-DNA-Polymerase.

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Schritt
1	3 min	95	Anfangsdenaturierung
	20 s	98	Denaturierung
25–30	15 s	$T_M \pm 10$ $^{\circ}\text{C}$	<i>Annealing</i>
	30 s/kb	72	Elongation
1	3 min	72	finale Elongation
1	∞	4	Lagerung

4.2.1.2 Kolonie-PCR und analytische PCRs mit der DreamTaqTM-Green-DNA-Polymerase

Für die Kolonie-PCR oder für analytische PCRs war die Nutzung einer Standard-Taq-DNA-Polymerase ausreichend. Zu diesem Zweck wurde die DreamTaqTM-Green-DNA-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Das Reaktionsvolumen wurde variabel zwischen 20 und 50 μL eingesetzt. Die Anteile der Reaktionskomponenten wurden dementsprechend angepasst. Tabelle 4.4 zeigt die eingesetzten Volumina für einen 20 μL Ansatz, Tabelle 4.5 das dazugehörige PCR-Programm. Von dem Ansatz wurden 12 μL für eine Agarosegelelektrophorese verwendet (Abschnitt 4.2.7).

Tabelle 4.4: Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit der DreamTaqTM-Green-DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen [μL]	Finale Konzentration
10 \times DreamTaq TM -Puffer	2	1 \times
dNTP-Mix, 2 mM je dNTP	2	0,2 mM
<i>forward</i> Primer (10 μM)	1	0,5 μM
<i>reversed</i> Primer (10 μM)	1	0,5 μM
<i>template</i> DNA	variabel	10 pg - 5 ng Plasmid-DNA
DreamTaq TM -DNA-Polymerase (5 U/ μL)	0,1	0,025 U/ μL
dH ₂ O	ad 20	-

Tabelle 4.5: PCR-Programm zur Verwendung mit der DreamTaqTM-Green-DNA-Polymerase.

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Schritt
1	5 min	95	Anfangsdenaturierung
	30 s	95	Denaturierung
30	30 s	$T_M \pm 10^{\circ}\text{C}$	<i>Annealing</i>
	1 min/kb	72	Elongation
1	3 min	72	finale Elongation
1	∞	4	Lagerung

4.2.1.3 PCR-Mutagenese mit dem *Change-ITTM Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit*

Die PCR-Mutagenese ist eine Methode, mit deren Hilfe DNA-Sequenzen gezielt verändert werden können. Das Prinzip beruht zumeist darauf, dass ein Primer verwendet wird, dessen Sequenz die einzufügende Mutation enthält und der folglich keine vollständige Komplementarität zur *template*-DNA besitzt. Durch die Amplifikation in den PCR-Zyklen wird ein Überschuss der mutierten DNA-erzeugt. In einigen Fällen kann die nicht mutierte Original-

DNA zusätzlich abgebaut werden, um die Ausbeute an Ziel-DNA und den Erfolg einer nachfolgenden Klonierung oder einer Transformation zu erhöhen.

In dieser Arbeit wurde das *Change-ITTM Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit* (Fa. Affymetrix, USA) verwendet. Es eignete sich für die geplanten Modifikationen, da es in der Lage ist, mehrere Modifikationen in einem Schritt durchzuführen. Als *template* wurde Plasmid-DNA verwendet. Die Modifikation beruht auf dem Einsatz zweier diametral angeordneter Primer, die beide Mutationen in Bezug auf die *template*-DNA enthalten können und an dem *sense*- bzw. *antisense*-Strang binden. Weiterhin müssen die Primer an den 5'-Enden phosphoryliert sein, da die PCR-Reaktion den kompletten *sense*- bzw. *antisense*-Strang amplifiziert und durch den Einsatz einer thermostabilen Ligase ein Ringschluss katalysiert wird. Auf diese Weise entsteht in jedem Zyklus zirkuläre, doppelsträngige DNA. Eine anschließende Behandlung mit dem Restriktionsenzym *DpnI* baut die *template*-DNA ab. *DpnI* ist methylierungssensitiv und baut nur die methylierte *template*-DNA ab. Die Ausbeute an mutierten Plasmiden, die nach dieser Behandlung direkt transformiert werden können, beträgt 70–90 % (Affymetrix, 2012).

Für einen Mutagenese-Ansatz wurden die phosphorylierten Primer (Nr. 31 und 32, s. Anhang, Tabelle A.2) auf eine Konzentration von 5 μM eingestellt. Anschließend wurde der Reaktionsmix gemäß Tabelle 4.6 zusammengestellt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 4.7 dargestellt. Nach der PCR wurden 10 μL des Ansatzes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 μL *DpnI* versetzt. Das Gemisch wurde 120 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Hitzeschocktransformation (Abschnitt 4.1.3) mit 5 μL des *DpnI*-verdauten PCR-Produktes. Die transformierten Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Abschnitt 4.1.1).

Tabelle 4.6: Reaktionsansatz für eine PCR-Mutagenese. Die verwendeten Primer sind an den 5'-Enden phosphoryliert.

Komponente	Volumen [μL]	Finale Konzentration
10× Change-IT TM -Puffer	2	1×
<i>forward</i> Primer (5 μM)	1	0,25 μM
<i>reversed</i> Primer (5 μM)	1	0,25 μM
Plasmid-DNA	variabel	15 ng
Change-IT TM -Enzymmix	0,8	-
dH ₂ O	ad 20	-

Tabelle 4.7: PCR-Mutagenese-Programm zur Einführung von Mutationen in DNA-Sequenzen. Die Elongationsphase ist länger als üblich, da in diesem Schritt auch die Ligation katalysiert wird.

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur [°C]	Schritt
1	2 min	95	Anfangsdenaturierung
30	30 s	95	Denaturierung
	30 s	60	<i>Annealing</i>
	20 min	68	Elongation & Ligation
1	10 min	68	finale Elongation & Ligation
1	∞	4	Lagerung

4.2.2 Oligonukleotid-Hybridisierung

Die Klonierung einer shRNA-Sequenz in einen siRNA-vermittelnden Vektor erfolgt meist über die Ligation zweier speziell konstruierter Oligonukleotidstränge. Die zwei Einzelstränge, die als *top*- und *bottom*-Strang bezeichnet werden, werden einzeln synthetisiert und müssen daher vor der Ligation aneinander gelagert werden, damit ein doppelsträngiges DNA-Fragment entsteht. Alle shRNA-Einzelstränge wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit dH₂O auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 46 µL Annealingpuffer (100 mM K-Acetat, 30 mM HEPES-KOH, 2 mM Mg-Acetat, pH 7,4) vorgelegt und 2 µL der *top*- sowie 2 µL der *bottom*-Oligonukleotide hinzugefügt. Das Gemisch wurde im Thermocycler 3 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Temperatur sukzessive reduziert. Zuerst erfolgte eine 2-minütige Inkubation bei 72 °C. Dann wurde die Lösung mit einer Kühlrate von etwa 0,05 °C/s auf 37 °C abgekühlt und die Temperatur 30 s gehalten. Die Lösung wurde noch einmal für 2 min bei 25 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C herunter gekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden auf Eis gelagert. Bei korrekter Anlagerung der beiden Stränge entstand an der 5'-Seite ein zu einer *Bam*HI-Schnittstelle komplementärer Überhang und an der 3'-Seite ein komplementärer Überhang zu einer *Eco*RI-Schnittstelle. Für die Ligation (Abschnitt 4.2.6) wurden die hybridisierten Oligonukleotide 1:100 mit dH₂O verdünnt eingesetzt.

4.2.3 Verwendete Primer, Plasmide und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Sequenzierung, Klonierung oder qRT-PCR, sowie die Sequenzen der Oligonukleotide zur Erzeugung der shRNA-Expressionsvektoren sind im Anhang in den Tabellen A.2, A.3 und A.4 aufgeführt. Die verwendeten Plasmide sind ebenfalls im Anhang aufgeführt (Tabelle A.1). Von drei der für diese Arbeit wichtigsten Plasmide sind die Plasmidkarten in Abbildung 4.1 abgebildet.

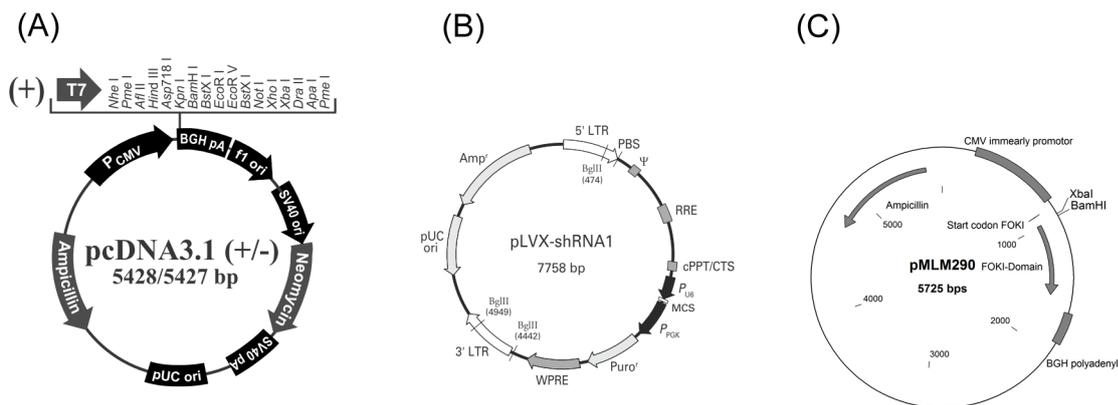


Abbildung 4.1: Drei wichtige Basisplasmide dieser Arbeit. Einige Details zu den Plasmiden sind im Anhang, Tabelle A.1 verzeichnet. Der pcDNATM 3.1(+)-Vektor (Fa. Life Technologies, Darmstadt) war das Basisplasmid zur Erzeugung von verbesserten Expressionsplasmiden. pLVX-shRNA1 war der lentivirale Transfervektor, der sowohl transient, als auch zur Erzeugung der Lentiviren genutzt wurde (Fa. Clontech, Frankreich). Er erlaubt die *in vivo*-Expression von shRNAs. pMLM290 ist eine selbsterstellte Grafik, die die Struktur der ZFN-Expressionsplasmide aufzeigen soll. Der Vektor für die „rechten“ ZFN ist zu dem hier abgebildeten identisch und enthält lediglich zwei Mutationen in der *FokI*-Domäne, die eine Heterodimerbildung begünstigen (Miller *et al.*, 2007). Details zu den Vektoren sind den entsprechenden Handbüchern zu entnehmen (Life Technologies, 2010a; Clontech, 2010; Miller *et al.*, 2007).

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte photometrisch mithilfe eines NanoPhotometers[®] (Fa. Implen, München). Das eingesetzte Probenvolumen variierte zwischen 1 und 3 μ L, je nach verwendetem Küvettendeckel, der die Verdünnung und damit den erfassbaren Konzentrationsbereich definiert. Aus dem Absorptionswert bei 260 nm wird,

mithilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes, die Konzentration berechnet (Gleichung 4.1). Die Absorption in AU entspricht A, die Konzentration in $\text{ng} \cdot (\mu\text{L})^{-1}$ wird durch c dargestellt. Der molare Extinktionskoeffizient in $\text{ng} \cdot \text{cm} \cdot (\mu\text{L})^{-1}$ wird in der Gleichung durch ϵ repräsentiert. Die letzte Variable ist b, die Weglänge des Lichts in cm.

Eine OD_{260} von 1 AU entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ einzelsträngiger RNA (Sambrook & Russell, 2001). Dies gilt für Nukleinsäuren bei pH 7,0. Zusätzlich werden die Extinktionswerte bei 280 nm erfasst. Der Quotient $\text{OD}_{260}/280$ liefert Informationen über Verunreinigungen der Probe durch Proteine oder Alkohole. Das Verhältnis liegt bei reinen DNA-Lösungen oberhalb von 1,8 AU, bei reinen RNA-Lösungen oberhalb von 2,0 AU (Sambrook & Russell, 2001). Der Quotient $\text{OD}_{230}/260$ sollte idealerweise einen Wert um 0,45 haben. Er beschreibt die Verunreinigung mit Polysacchariden.

$$c = \frac{A \cdot \epsilon}{b} \quad (4.1)$$

4.2.5 Restriktionsspaltung und Dephosphorylierung

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Klasse II von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) durchgeführt. Sämtliche Enzyme entstammten der *FastDigest*[®]-Serie. Diese zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass alle Enzyme in einem einzigen Puffersystem vollständig aktiv sind. So können problemlos Doppel- oder Dreifachspaltungen in demselben Puffer durchgeführt werden. Weiterhin liegt die optimale Reaktionstemperatur bei allen verwendeten Enzymen bei 37 °C und durch Optimierung der Enzyme konnte ihre Reaktionsgeschwindigkeit erheblich gesteigert werden. Standardmäßig kann 1 μg Plasmid-DNA in 5 bis maximal 30 min vollständig geschnitten werden. Alle Restriktionsspaltungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers für das spezifische Enzym durchgeführt. Für präparative Ansätze wurde die Restriktionszeit jedoch verdoppelt, um sicherzustellen, dass keinerlei Reste ungeschnittener Plasmids in der Reaktion vorlagen. Damit die Wahrscheinlichkeit einer Rezyklarisierung eines Vektors minimiert werden konnte, wurde bei Bedarf thermosensitive Alkaline Phosphatase (*FastAP*[™], Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) der Reaktion beigemischt. Dabei handelt es sich um eine Phosphatase, die die Phosphatreste an 5'- und 3'-Enden von DNA, RNA oder Nukleotiden entfernt. Die Reaktion ist bei einer Plasmidmenge von 1 μg nach 10 min Inkubation bei 37 °C abgeschlossen und kann parallel zur Restriktion durchgeführt werden. Die *FastAP*[™] wurde nach Angaben des Herstellers verwendet (Fermentas, 2011b).

Tabelle 4.8: Auflistung der verwendeten Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenz und die Restriktionsmuster. Die Schnittstelle wird durch einen Pfeil (\downarrow) symbolisiert.

Enzym	Erkennungssequenz
<i>Apa</i> I	5' ...GGGCC \downarrow C... 3' 3' ...C \downarrow CCGGG... 5'
<i>Bam</i> HI	5' ...G \downarrow GATCC... 3' 3' ...CCTAG \downarrow G... 5'
<i>Eco</i> RI	5' ...G \downarrow AATTC... 3' 3' ...CTTAA \downarrow G... 5'
<i>Hind</i> III	5' ...A \downarrow AGCTT... 3' 3' ...TTCGA \downarrow A... 5'
<i>Not</i> I	5' ...GC \downarrow GGCCGC... 3' 3' ...CGCCGG \downarrow CG... 5'
<i>Nru</i> I	5' ...TCG \downarrow CGA... 3' 3' ...AGC \downarrow GCT... 5'
<i>Xba</i> I	5' ...T \downarrow CTAGA... 3' 3' ...AGATC \downarrow T... 5'
<i>Xho</i> I	5' ...C \downarrow TCGAG... 3' 3' ...GAGCT \downarrow C... 5'

Je nach Ziel der Restriktion wurde das geschnittene Produkt entweder durch das *GeneJETTM PCR Purification Kit* (Abschnitt 4.2.9) aufgereinigt, oder in einem Agarosegel zur Separation einzelner DNA-Abschnitte aufgetragen (Abschnitt 4.2.7). Bei Bedarf konnten die einzelnen DNA-Fragmente dann aus dem Gel aufgereinigt werden (Abschnitt 4.2.8). Alle verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

4.2.6 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Es wurden 50 ng geschnittener Vektor mit dem zu integrierenden DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 vermischt. Nach Zugabe von Wasser, Ligationspuffer und 1 Unit (U) T4 DNA Ligase wurde der Reaktionsansatz zwischen 10 und

120 min bei 22 °C inkubiert (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf AG, Hamburg). Das Enzym wurde anschließend 5 min bei 70 °C thermisch inaktiviert.

4.2.7 Agarosegelelektrophorese

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese lassen sich Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld auftrennen. Durch das negativ geladene Phosphodiesterückgrat wandern die Moleküle in Richtung der Anode. Dabei ist die elektrophoretische Mobilität linearer DNA-Fragmente umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts (Green & Sambrook, 2012). Alle in der Gelelektrophorese verwendeten Lösungen und Reagenzien sind in Tabelle 4.9 aufgelistet.

Tabelle 4.9: Puffer und Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese.

Puffer/Reagenz	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris 40 mM Natriumacetat 1 mM EDTA, pH 8
6× DNA-Ladepuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 30 % (v/v) Glycerin in dH ₂ O
GelRed TM -Lösung	45 mL dH ₂ O 15 µL GelRed TM 5 mL 0,1 M NaCl
DNA-Längenstandard	Generuler TM 1 kb DNA-Leiter Generuler TM 100 bp DNA-Leiter

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte, je nach Größe, in 1–3 %igen (w/v) Agarosegelen (SeaKem LE-Agarose, Fa. Lonza, Schweiz). Die Gele wurden mit 1× Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE-Puffer) hergestellt. Nachdem sie in der Gelkammer auspolymerisiert waren, wurden sie mit 1× TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden, falls erforderlich (vgl. Abschnitt 4.2.1), mit 6× DNA-Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen geladen. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurden die DNA-Fragmente dann bei 5 V/cm für ca. 30 min aufgetrennt. Das fertige Gel wurde kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und 10 min in einer GelRedTM-Lösung (Fa. Biotium, USA)

gefärbt. Anschließend erfolgte die Detektion und Dokumentation mithilfe eines Transilluminators (312 nm) in Verbindung mit dem Fusion FX-7 Systems (Fa. Vilber-Lourmat, Eberhardzell).

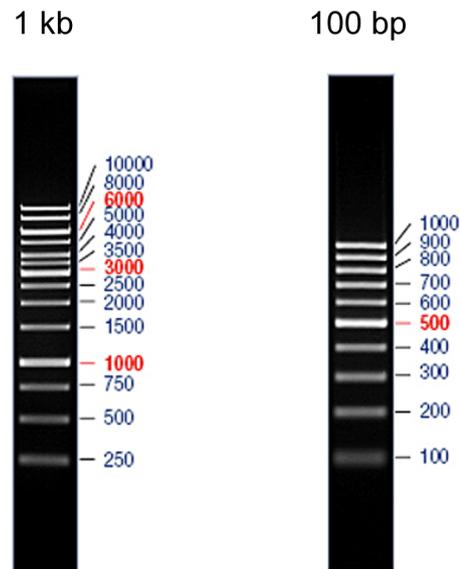


Abbildung 4.2: Verwendete DNA-Längenstandards mit Kennzeichnung der Bandengrößen. Die DNA-Marker wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

4.2.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *GeneJETTM Gel Extraction Kit* (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Dabei unterstützt das chaotrope Salz Guanidiniumisothiocyanat das Auflösen der Agarose und entzieht der DNA gleichzeitig die Hydrathülle. Die DNA fällt dadurch aus und kann an die Silikagel-Membran der Spin-Röhrchen binden. Die Gel-Extraktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt (Fermentas, 2012). Für die Elution wurden 30 μ L 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, verwendet.

4.2.9 Reinigung von Plasmid-DNA und PCR-Ansätzen zur Entfernung von DNA-Fragmenten oder Abreicherung von Enzymen

Bei einer Restriktion fallen gelegentlich kleine DNA-Fragmente (< 25 bp) an, die in nachfolgenden Reaktionen, z. B. bei einer Ligation, kompetitiv zum eigentlichen Insert wirken

können. Diese Fragmente können zum einen durch eine Agarosegelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung aus dem Gel (Abschnitte 4.2.7 und 4.2.8), oder aber durch Verwendung von Silikagel-Membran Spin-Röhrchen entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde das *GeneJETTM PCR Purification Kit* (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die zu reinigende Lösung wurde 1:1 mit dem Bindepuffer gemischt, an eine Silikagel-Säule gebunden, gewaschen und schließlich in Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert (Fermentas, 2011d). Diese Methode wurde ebenfalls angewendet, wenn Enzyme aus einer Lösung entfernt, oder die DNA in einem anderen Puffer gelöst werden musste.

4.2.10 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde für analytische Zwecke und molekularbiologische Arbeiten das *GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit* (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Präparative Plasmid-Isolierungen, in denen höhere Konzentrationen, Reinheiten oder Gesamt-Plasmid Mengen erforderlich waren, wurden mit dem *peqGOLD XChange Plasmid Maxi Kit* (Fa. PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Beide Kit-Systeme basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979), unterscheiden sich jedoch sowohl in der Menge der einsetzbaren Bakterienkultur, als auch in der darauffolgenden Aufreinigung der Plasmid-DNA.

Für die Mini-Präparation wurden 5 mL einer Übernachtskultur verwendet, für die Maxi-Präparation 150–300 mL (Abschnitt 4.1.1). Die Bakterien wurden pelletiert und anschließend lysiert. Durch Alkalisierung der Suspension fielen bakterielles Debris und SDS-Präzipitate aus, die durch Zentrifugation bei der Mini-Präparation bzw. durch einen Filter bei der Maxi-Präparation von der Plasmid-haltigen Lösung abgetrennt wurden. Im Fall der Mini-Präparation wurde die DNA nun an eine Silikagel-Membran gebunden, während die DNA in der Maxi-Präparation über eine Anionenaustauscher-Säule aufgereinigt wurde. Nach der Bindung der DNA wurde diese noch mehrfach gewaschen und anschließend eluiert. Für die Elution wurde dH₂O oder Tris-HCl-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) verwendet. Die exakte Durchführung der Extraktionen erfolgte nach Angabe der Hersteller sowohl für die Mini-Präparation (Fermentas, 2011e), als auch für die Maxi-Präparation (PeqLab, 2011). Für die Maxi-Präparation wurden die Zentrifugationsschritte zeitlich verdoppelt, da die erreichbare maximale *g*-Zahl der Zentrifuge (Rotina 420R, Fa. Hettich, Tuttlingen) geringer war, als im Protokoll angegeben.

4.2.11 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

In der Evaluierung von RNAi-vermitteltem *knockdown* ist die Analyse des mRNA-Transkriptlevels eine Möglichkeit, um eine Aussage über die Effektivität einer siRNA-Sequenz zu erhalten. Zu diesem Zweck muss die RNA zunächst isoliert werden. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Die eine davon nutzte eine Silikagel-basierte Technologie mit Spin-Säulen, in der anderen Methode wurde das TRIzol[®]-Reagenz (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Der Grund für die Verwendung der beiden unterschiedlichen Technologien lag in der Prozessierung und Generierung der Proben. Nach der Nukleofektion von shRNA-Sequenzen (Abschnitt 4.3.7) konnten die Zellen für die Gewinnung der RNA am nächsten Tag simultan geerntet und verarbeitet werden. Dazu wurde das Spin-Säulen Kit *NucleoSpin[®] RNA II* (Fa. Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren (Macherey-Nagel, 2011). Wie auch in der Anleitung empfohlen, wurde ein DNase-Verdau direkt auf der Membran mittels rekombinanter DNase (rDNase) durchgeführt. Die RNA wurde nach Zellyse, Bindung an die Silikamembran, rDNase-Verdau und Waschschritten in 40 µL nukleasefreiem Wasser eluiert.

Das TRIzol[®]-Reagenz wurde verwendet, wenn die RNA aus einer Probe nicht sofort isoliert wurde. Dies trat z. B. während eines Kultivierungsverlaufes oder einer Langzeitkultivierung zur Stabilitätsüberprüfung auf. Die zusammengehörigen Proben konnten dann nach Abschluss des Experimentes gemeinsam verarbeitet werden. Die Extraktion mittels TRIzol[®] beruht auf der Einschritt-Methode von Chomczynski & Sacchi (1987). Das Reagenz enthält unter anderem Phenol und Guanidiniumthiocyanat, welches Proteine denaturiert, RNasen inhibiert und die Zellen effektiv lysiert. Das Phenol in dem Gemisch bildet in Verbindung mit Chloroform ein Zwei-Phasen-System, in dem sich die DNA, die RNA und die Proteine verteilen. Die DNA sammelt sich in der Interphase, Proteine befinden sich in der unteren Chloroformphase und die RNA ist in der oberen wässrigen Phase gelöst. Die wässrige Phase kann dementsprechend mit Isopropanol oder Ethanol gefällt, die RNA gewaschen und letztlich in RNase-freiem Wasser gelöst werden.

Für eine TRIzol[®]-basierte Isolierung von RNA wurden 5×10^6 Zellen bei 200 g 5 min abzentrifugiert und das Medium entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 1 mL TRIzol[®]-Reagenz aufgenommen und 15 s intensiv gevortext. Die Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 15 s gevortext. An dieser Stelle konnte die Probe bei -80 °C für längere Zeit gelagert werden. Nach dem Auftauen wurden 0,2 mL Chloroform zur Mischung hinzugegeben und diese für 15 s gevortext. Das Reaktionsgemisch wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert (Biofuge *fresco*, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte), um die Bildung

des Zwei-Phasen-Systems zu unterstützen. Die wässrige Phase wurde in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und zur Verbesserung der Reinheit der Probe erneut 0,5 mL TRIzol[®]-Reagenz hinzugegeben, die Substanzen durch Schütteln durchmischt und 0,2 mL Chloroform hinzugefügt. Es wurde erneut 15 s gevortext, gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde diese zweite Extraktion ebenfalls 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Lösung wurden 0,5 mL Isopropanol hinzugegeben und durch invertieren des Gefäßes durchmischt. Nun wurde die Lösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 12000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das entstandene RNA-Pellet mit 1 mL 75 %igem Ethanol durch vorsichtiges vortexen gewaschen. Die RNA konnte wiederum durch Zentrifugation für 5 min bei 7500 g und 4 °C pelletiert werden. Das Ethanol wurde vollständig mit einer RNase-freien Pipette entfernt und das Pellet für ca. 10 min getrocknet. Anschließend wurde es in 40 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen und 10 min bei 55 °C gelöst. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde mittels NanoPhotometer[®] bestimmt (Abschnitt 4.2.4). Anschließend wurde die RNA bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Für eine Konversion in cDNA (Abschnitt 4.2.12) wurde auch bei den mit TRIzol[®]-isolierten RNA-Proben ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde 1 µg RNA in einem Reaktionsvolumen von 10 µL mit DNaseI verdaut (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren (Fermentas, 2011a).

4.2.12 Herstellung von *complementary*-DNA durch reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient der Umwandlung von RNA in *complementary*-DNA (cDNA) mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Zu diesem Zweck wurde das *RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet (Fermentas, 2011f). Die in diesem Kit enthaltene rekombinante *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) Reverse Transkriptase besitzt eine reduzierte RNase H Aktivität, um RNA-Degradationen während der cDNA-Synthese zu minimieren. Für die Synthese der cDNA wurden Oligo(dT)₁₈-Primer eingesetzt. Sie hybridisieren spezifisch an den 3'-Poly(A)-Schwanz der eukaryotischen mRNA und bewirken eine gezielte Amplifikation der meisten mRNA-Spezies.

Pro Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA (Abschnitt 4.2.11) eingesetzt. Nach Zugabe der Primer und Einstellen des Reaktionsvolumens mit nukleasefreiem Wasser auf 12 µL wurde die Lösung 5 min bei 65 °C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Anschließend wurden die benötigten Volumina Reaktionspuffer, RiboLockTM RNase

Inhibitor, dNTP-Mix sowie die Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die cDNA-Synthese erfolgte daraufhin für 60 min bei 42 °C und die Enzyme wurden anschließend durch fünfminütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA konnte direkt eingesetzt oder bei -80 °C für etwa eine Woche stabil gelagert werden.

4.2.13 Quantitative *real-time*-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative *real-time*-PCR (qRT-PCR) unterscheidet sich von einer herkömmlichen PCR in der Möglichkeit, die Amplifikation des PCR-Produktes während der Reaktion *online* zu messen. Dies ermöglicht es, Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Menge *template*-DNA zu ziehen. Es existieren verschiedene Verfahren zur Detektion der akkumulierenden PCR-Fragmente. Die klassische Variante ist die Detektion mittels SYBR Green I, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA, aber auch einzelsträngige RNA-Moleküle interkaliert (Zipper *et al.*, 2004). Der entstehende DNA-Farbstoff-Komplex emittiert bei Anregung mit blauem Licht ($\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$) grünes Licht ($\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$), welches durch eine entsprechende Optik detektiert werden kann. Eine Zunahme der PCR-Produkte führt damit zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität. Ein Vorteil dieser Methode ist die hohe Flexibilität, da SYBR Green für jedes beliebige PCR-Produkt eingesetzt werden kann. Der daraus folgende Nachteil ist die Detektion unspezifischer Amplifikate, wie z. B. Primer-Dimere.

Die zweite Variante zur Detektion der PCR-Produkte sind TaqMan-Hydrolyse-Sonden. Dabei handelt es sich um 20–25 Nukleotide (nt) lange Sonden, an die sowohl am 5' als auch am 3'-Ende kovalent Fluorophore gebunden sind, der Reporter und der Quencher. Durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) wird das emittierte Licht des Reporters vom Quencher absorbiert. Während der PCR entfernt die 5'→3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase den Reporter bzw. Quencher, wodurch kein FRET mehr stattfindet und die emittierte Strahlung des Reporters messbar wird. Die Sonden sind deutlich spezifischer als eine Quantifizierung mit einem interkalierenden Farbstoff. Allerdings sind diese Sonden nur spezifisch für ein PCR-Produkt einsetzbar und es kann zeitaufwendig sein, die PCR zu optimieren.

Die von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) vertriebene *Universal Probe Library* (UPL) stellt eine neue und einfache Sonden-basierte Quantifizierung dar, in der das gesamte Transkriptom eines Organismus durch 8–9 nt lange Sonden abgedeckt werden kann. Auf diese Weise entfallen größtenteils die aufwendige PCR-Optimierung und die Beschränkung auf einen spezifischen cDNA-Abschnitt.

Für die qRT-PCRs wurde der LightCycler[®] 480 (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) in Kombination mit dem *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG Kit* (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Grundsätzlich wurde nach Anweisungen des Herstellers verfahren (Life Technologies, 2010b), allerdings wurde das Reaktionsvolumen der Ansätze von den angegebenen 50 μL auf 30 μL reduziert. Zunächst wurde die RNA von Proben isoliert (Abschnitt 4.2.11), die miteinander verglichen werden sollten, und anschließend daraus cDNA synthetisiert (Abschnitt 4.2.12). Dann konnte die cDNA als *template* in der qRT-PCR verwendet werden. Die Zusammensetzung einer qRT-PCR-Reaktion ist in Tabelle 4.10 gezeigt, das verwendete qRT-PCR-Programm ist in Tabelle 4.11 dargestellt. Die Daten wurden durch die Roche LightCycler[®] Software (Version 1.5) erfasst und verarbeitet.

Alle Reaktionen wurden in drei technischen Replikaten gemessen. Es wurden, je nach Experiment, zwei bis drei *housekeeping*-Transkripte zur Normalisierung verwendet. Dieser Schritt sollte abweichende Zellzahlen, unterschiedliche RNA-Mengen oder variierende cDNA-Konversionseffizienzen ausgleichen. Als *housekeeping*-Gene wurden β -Aktin (*Aktb*), Vezatin (*Vezt*) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) verwendet. Die Primer für diese Transkripte (s. Anhang, Tabelle A.2) wurden so erstellt, dass sie eine Exon-Exon-Verbindung überspannten, um sicherzustellen, dass lediglich cDNA und nicht verbliebene genomische DNA detektiert wurde. Der Referenzgenindex (Kombination verschiedener *housekeeping*-Gene) wurde verwendet, um eine höhere Zuverlässigkeit der ermittelten Daten gewährleisten zu können.

Tabelle 4.10: Eingesetzte Volumina pro qRT-PCR-Ansatz. Das Gesamtvolumen betrug 30 μL .

Komponente	Volumen [μL]	Finale Konzentration
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix-UDG	15	1 \times
<i>forward</i> Primer (10 μM)	0,6	0,2 μM
<i>reversed</i> Primer (10 μM)	0,6	0,2 μM
cDNA	1	\approx 15 ng
dH ₂ O	12,8	-

Tabelle 4.11: Verwendetes Programm für die qRT-PCR im LightCycler[®] 480.

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur [°C]	Schritt
1	2 min	50	UDG-Inkubation
1	2 min	95	Anfangsdenaturierung
40–50	15 s	95	Denaturierung
	30 s	60	<i>Annealing</i> & Elongation
1	-	45–95	Schmelzkurvenanalytik
1	∞	4	Lagerung

Neben der Verifikation der Spezifität der verwendeten qRT-PCR-Primer durch eine vorherige PCR (Abschnitt 4.2.1.2) mit anschließender Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 4.2.7), wurde im Anschluss jeder qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalytik aller Reaktionen durchgeführt, um mögliche unspezifische Reaktionen zu identifizieren. Eine solche qRT-PCR wäre dann nicht mehr auswertbar, da das Fluoreszenzsignal verfälscht wäre. Für die Schmelzkurvenanalytik wurde die Temperatur des Heizblocks kontinuierlich von 45 °C bis auf 95 °C erhöht, während fortlaufend das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet wurde. Jedes doppelsträngige DNA-Fragment ist durch eine definierte Schmelztemperatur (T_M) charakterisiert. Diese ergibt sich aus der Basenkomposition und der Länge des Fragments. Die Fluoreszenz verbleibt bis kurz vor Erreichen der T_M auf etwa dem gleichen Niveau. Steigt die Temperatur des Heizblocks bzw. des Reaktionsgemisches auf die spezifische T_M eines darin enthaltenen Fragments an, so dissoziieren etwa 50 % der doppelsträngigen Amplifikate zu einzelsträngigen DNA-Stücken (SantaLucia, 1998). Dadurch nimmt die gemessene Fluoreszenz sprunghaft ab, da sie nur bei Interkalation von SYBR Green in doppelsträngige DNA-Fragmente entsteht. Wird die Temperatur weiter erhöht, trennen sich auch die restlichen Fragmente, was zu einer Reduktion der Fluoreszenz bis auf die Basisfluoreszenz der Probe führt. Da die Schmelztemperatur für jedes Amplifikat individuell ist, kann auf diese Weise die Spezifität einer PCR-Reaktion überprüft werden. Bei mehreren Fragmenten oder Primer-Dimeren sind dementsprechend mehr Veränderungen in der Fluoreszenz bei unterschiedlichen Temperaturen zu beobachten.

Die LightCycler[®] Software erlaubte die Berechnung verschiedener Parameter der qRT-PCR-Reaktionen. Der *crossing point* (C_P) einer Amplifikationsreaktion wurde mittels der *second derivative maximum* Methode unter Berücksichtigung der Effizienz-Korrektur (E-Methode) ermittelt (Pfaffl, 2004). Die Normalisierung erfolgte über den Referenzgenindex

(*pairing rule: all to mean, high confidence*). Anschließend wurde die relative mRNA-Menge durch Bezugnahme auf eine Kalibrator-Probe berechnet. Die Sequenzen aller für die qRT-PCR verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle A.2 aufgeführt.

4.2.14 Isolierung genomischer DNA aus Zellkultur-Material

Für eine Mutationsanalyse von genomischer DNA mit dem SURVEYOR[®]-Nuklease-Assay (Abschnitt 4.2.15) musste zunächst die DNA der Zellen isoliert werden. Die Isolation erfolgte mit dem auf einer Silikagel-Membran-Technologie basierenden *GeneJETTM Genomic DNA Purification Kit* (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Nachdem bis zu 5×10^6 Zellen mit *phosphat buffered saline* (PBS, Tabelle 4.15) gewaschen wurden, um Medienreste zu entfernen, wurden die Zellen in Gegenwart von Proteinase K bei 56 °C lysiert. Die vorhandene RNA wurde durch Zugabe von RNase A degradiert. Die DNA wurde an die Silikagel-Membran gebunden und gewaschen. Schließlich wurde die gereinigte DNA mit 100 µL Elutionspuffer eluiert. Die Isolierung der genomischen DNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Fermentas, 2011c).

4.2.15 SURVEYOR[®]-Nuklease-Assay zur Detektion von *knockout*-Mutationen in genomischer DNA

Die Detektion von Mutationen in genomischer DNA von modifizierten Zellen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Eine Möglichkeit, eine solche Mutation zu erfassen, ist die Sequenzierung. Diese ist allerdings nur praktikabel, wenn die gleiche Mutation in allen Zellen einer Population vorliegt. Ist das nicht der Fall, führt dies zu Ungenauigkeiten und Sequenzierfehlern und damit zur Nicht-Interpretierbarkeit der Sequenzen. Aus diesem Grund kann eine einfachere Methode zunächst klären, ob Mutationen in dem untersuchten Zellpool vorliegen. Nach einer anschließenden Einzelzellklonierung können dann individuelle Klone identifiziert werden, deren mutierte Regionen sequenziert werden können. Für die Ermittlung von Mutationen in genomischer DNA wurde das *SURVEYOR[®] Mutation Detection Kit for Standard Gel Electrophoresis* (Fa. Transgenomic, England) verwendet. Durch Mischen einer Wildtyp-DNA ohne Mutation und mutierter DNA entstehen Heteroduplexe mit Basenfehlpaarungen, hervorgerufenen durch die Mutation. Die SURVEYOR[®]-Nuklease kann die DNA im Bereich der Fehlpaarung spalten und die Spaltprodukte können anschließend im Agarosegel visualisiert werden (Abschnitt 4.2.7).

Für die Mutationsanalyse wurde genomische DNA von Wildtyp CHO K1-Zellen und von mit Zinkfinger-Nukleasen transfizierten CHO K1-Zellen isoliert (Abschnitt 4.2.14). Es wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt, die den zu analysierenden DNA-Bereich, das Exon 5

der Glutamin-Synthetase (Abschnitt 5.3), amplifizieren sollten. Um größtmögliche Kompatibilität der PCR-Reaktion mit der SURVEYOR[®]-Nuklease zu ermöglichen, wurde zu diesem Zweck die *Optimase[®]-Polymerase* (Fa. Transgenomic, England) verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion und das verwendete Programm sind in den Tabellen 4.12 und 4.13 dargestellt.

Da die durch Zinkfinger-Nukleasen erzeugten Mutationen nie die gesamte analysierte Zellpopulation betreffen, ist die Hybridisierung des PCR-Produktes der Mutanten mit denen des Wildtyps nicht zwingend erforderlich. Dennoch wurden für den Assay drei Ansätze erstellt, in denen verschiedene Kombinationen aus Wildtyp-PCR-Amplifikaten mit Mutations-PCR-Amplifikaten angesetzt wurden. Dazu wurden in einer Reaktion 30 µL des Wildtyp-PCR-Produkts (Negativkontrolle) eingesetzt. Die zweite Reaktion enthielt 30 µL PCR-Reaktionsgemisch der mit den Zinkfinger-Nukleasen behandelten Zellen (behandelte Kontrolle). In der dritten Reaktion wurden 15 µL des Wildtyp-PCR-Reaktionsansatzes mit 15 µL des Mutations-PCR-Reaktionsansatzes gemischt (Probe). Die drei Reaktionen wurden im Thermocycler hybridisiert (Mastercycler[®] pro S, Fa. Eppendorf AG, Hamburg). Das dafür verwendete Temperaturprofil ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

$$95 \xrightarrow{-2,0} 85 \xrightarrow{-0,3} 75 \xrightarrow{-0,3} 65 \xrightarrow{-0,3} 55 \xrightarrow{-0,3} 45 \xrightarrow{-0,3} 35 \xrightarrow{-0,3} 25 \xrightarrow{-0,3} 4$$

Abbildung 4.3: Temperaturprofil in °C zur Hybridisierung der PCR-Amplifikate für eine nachfolgende SURVEYOR[®]-Nuklease Mutationsdetektion. Die initiale Denaturierung bei 95 °C wurde 10 min durchgeführt. Alle weiteren Temperaturen wurden 1 min gehalten, bis die Temperatur weiter reduziert wurde. Final wurden die hybridisierten Fragmente bei 4 °C gelagert. Über den Pfeilen ist die Kühlrate des Thermocyclers in °C/s angegeben.

Nach der Hybridisierung wurden 3 µL 0,15 M MgCl₂-Lösung zu den Reaktionen gegeben, um die für die Nuklease benötigten Reaktionsbedingungen einzustellen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µL Enhancer S und 1 µL Nuklease S. Die Lösungen wurden 60 min bei 42 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Nuklease durch Zugabe von 3,5 µL Abstopplösung inaktiviert. Die Reaktionen konnten anschließend in einem 2 %igen Agarosegel analysiert werden (Abschnitt 4.2.7).

Tabelle 4.12: Komponenten einer PCR-Reaktion der OptimaseTM-Polymerase.

Komponente	Volumen [μL]	Finale Konzentration
10 \times Optimase TM -Polymerase-Puffer	5	1 \times
dNTP-Mix, 25 mM	4	0,2 mM
<i>forward</i> Primer (10 μM)	1	0,2 μM
<i>reversed</i> Primer (10 μM)	1	0,2 μM
genomische DNA	variabel	100 ng
Optimase TM -Polymerase (2,5 U/ μL)	1	2,5 U/ μL
dH ₂ O	ad 50	-

Tabelle 4.13: Programm für PCR-Reaktionen mit der OptimaseTM-Polymerase.

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Schritt
1	2 min	95	Anfangsdenaturierung
	30 s	95	Denaturierung
30	30 s	65	<i>Annealing</i>
	30 s/250 bp	72	Elongation
1	5 min	72	finale Elongation
1	∞	4	Lagerung

4.2.16 Vorbehandlung von PCR-Amplifikaten zur direkten Sequenzierung

Mithilfe des *ExoSap-IT*[®] Verfahrens (Fa. Affymetrix, USA) ist es möglich, eine PCR-Reaktion so vorzubehandeln, dass eine sofortige Sequenzierung (Abschnitt 4.2.17) des Amplifikats möglich ist. Das ist nützlich, wenn beispielsweise eine Kolonie-PCR eine Bande der richtigen Größe liefert und die Sequenz dieses DNA-Fragments verifiziert werden soll. Ein enzymatischer Verdau degradiert überschüssige Primer und Nukleotide zu Nukleosiden und Phosphaten. Der Abbau verhindert, dass die Ursprungskomponenten in der Sequenzierungsreaktion interferieren können.

Für die Vorbereitung der PCR-Amplifikate zur Sequenzierung wurden 5 μL der PCR-Reaktion mit 2 μL *ExoSap-IT*[®] gemischt und 15 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert (Thermomixer

comfort, Fa. Eppendorf AG, Hamburg). Die anschließende Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte für 15 min bei 80 °C (Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf AG, Hamburg). Die Lösung konnte danach direkt zur Sequenzierung (Abschnitt 4.2.17) übergeben werden.

4.2.17 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden oder durch *ExoSap-IT*[®] vorbehandelte PCR-Produkte (Abschnitt 4.2.16), erfolgte durch die *Sequencing Core Facility* (SCF) der AG Genomforschung, CeBiTec, Uni Bielefeld. Die dazu verwendeten Primer sind in Tabelle A.2 im Anhang aufgeführt. Nach der Sequenzierung wurden die theoretischen Sequenzen mit den durch den Phred *base-calling* Algorithmus (Ewing *et al.*, 1998) ermittelten Sequenzen mit der Software ClustalW2 verglichen (Larkin *et al.*, 2007). Dies geschah zusätzlich unter Zuhilfenahme des Pherogramms.

4.2.18 Sequenzvergleich mit dem BLAST-Algorithmus

Mithilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) können Sequenzen bzw. Sequenzabschnitte miteinander verglichen werden (Altschul *et al.*, 1990). Dabei ist es möglich, eine einzelne Sequenz gegen eine komplette Datenbank, wie z. B. die Transkriptdatenbank von *Mus musculus*, abzugleichen. Auf diese Weise konnte die Spezifität der generierten siRNAs oder von Primern verifiziert werden. Auch innerhalb der CHO cDNA-Daten konnte mit einem integrierten BLAST-Algorithmus eine Sequenzsuche durchgeführt werden.

4.3 Zellkultur-Methoden

4.3.1 Zelllinien und Kulturmedien

Ein Überblick über alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Kultivierungsmedien ist in Tabelle 4.14 aufgeführt. Für die durchgeführten RNAi-Experimente diente die anti-Interleukin-8-Antikörper-produzierende (anti-IL-8) CHO DP-12-Zelllinie (ATCC CRL-12445) als Modell. Sie wurde ausgewählt, da es sich um eine Produktionszelllinie handelt und nur so mögliche Einflüsse einer siRNA auf die Produktivität beobachtet werden können. Die Modell-Zelllinie sollte, soweit möglich, alle Eigenschaften einer Standard-Produktionszelllinie aufweisen, da die *knockdown*-Effekte in späteren Ansätzen auf diese übertragen werden könnten. Die CHO DP-12-Zelllinie (US-Patent: US #6133426, Europäisches Patent: EP1415998) wurde erzeugt, indem CHO-Zellen mit dem Vektor p6G4V11-N35E.choSD.10 transfiziert und anschließend mit Methotrexat (MTX) selektioniert wurden (Hsei *et al.*, 2004). Der Expressionsvektor war so konstruiert, dass die variablen Regionen

der leichten und schweren Region des monoklonalen, murinen 6G4.2.5 Antikörpers (ATCC-HB-11722) in Verbindung mit der murinen Dihydrofolatreduktase (*Dhfr*) cDNA exprimiert werden. Die *Dhfr*-Sequenz und die schwere Kette teilten sich einen *SV40 early* Promotor, hatten jedoch individuelle Stopp-Codons. Die leichte Kette besaß einen eigenen *SV40 early* Promotor und Terminator. Die Expression der schweren Kette basierte auf dem Mechanismus des unvollständigen *splicen* (Lucas *et al.*, 1996). Dabei wird die *Dhfr* und die schwere Kette als eine dicistronische mRNA transkribiert. Da die *Dhfr*-Sequenz in ein Intron kloniert wurde, können zwei *splicing*-Produkte entstehen, zum einen die *Dhfr*-mRNA und zum anderen die mRNA der schweren-Kette. Die *splice*-Donor und -Akzeptor-Sequenz ist so gewählt, dass zu einem großen Teil die schwere Kette anstelle der *Dhfr*-Sequenz gebildet wird (Lucas *et al.*, 1996). Dadurch wird der Selektionsdruck zusätzlich erhöht.

Die CHO K1-Zelllinie ist ein Subklon der ursprünglich isolierten CHO-Zelle von T. T. Puck aus dem Jahr 1957 (Kao & Puck, 1967, 1968; Kao *et al.*, 1969). Sie ist die Ursprungszelllinie aus der alle weiteren CHO-Zelllinien, wie z. B. die CHO DXB11 oder auch die CHO DG44 Zellen, hervorgegangen sind. Die CHO K1-Zelllinie wurde in dieser Arbeit sowohl als adhärenzte Kultur (DSMZ-Nr.: ACC-110), als auch als Suspensionskultur (ursprünglich: ATCC-Nr.: CCL-61) verwendet.

Bei den HEK293FT-Zellen handelt es sich um eine modifizierte humane Zelllinie. Die ursprüngliche HEK293-Zelllinie wurde aus embryonalen Nierenzellen gewonnen, die mit mechanisch gescherter Adenovirus 5-DNA transfiziert wurde (Graham *et al.*, 1977; Harrison *et al.*, 1977). Die Zellen exprimieren das Adenovirusgen E1A, welches an der Transaktivierung verschiedener viraler Promotoren beteiligt ist. Aus der HEK293-Zelllinie wurde durch Transfektion mit dem Plasmid pCMVSPORT6TAg.neo die HEK293T-Zelllinie gewonnen (Rio *et al.*, 1985). Das Plasmid kodiert für das große T-Antigen des SV40 Virus, das eine episomale Amplifikation von Plasmiden mit SV40 Replikationsursprung ermöglicht. Durch die episomale Replikation der Plasmide kann ein höherer Virustiter erreicht werden als mit normalen HEK293 Zellen. Die HEK293FT-Zellen sind eine Variante der HEK293T Zellen, die von der Firma Life Technologies (Darmstadt) vertrieben werden und sich durch eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit als die Ursprungszellen auszeichnen.

Tabelle 4.14: Überblick über die verschiedenen Kultivierungsmedien und deren Zusätze. Das TC 42-Medium stammte von der Firma TeutoCell (Bielefeld), das DMEM ebenso wie Ham's F12 Nutrient Mixture stammten von Life Technologies (Darmstadt). Das *fetal calf serum* (FCS), die nicht-essentiellen Aminosäuren und der Streptomycin / Penicillin-Mix wurden von der Firma PAA (Cölbe) geliefert. Der *Insuline-like growth factor* (IGF), das MTX und das Glutamin stammten von Applichem (Darmstadt). Das Geneticin (G418) wurde von der Firma InvivoGen (USA) bezogen. Für eine Kryokonservierung wurden dem normalen Kultivierungsmedium 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Roth, Karlsruhe) hinzugefügt.

Zelllinie	Medium	Supplemente
CHO DP-12	TC 42	5 mM Glutamin 200 nM MTX 100 ng/L IGF
CHO K1 (Suspension)	TC 42	5 mM Glutamin
CHO K1 (Adhärent)	Ham's F12 Nutrient Mixture	10 % FCS 4 mM Glutamin
HEK293FT	DMEM	10 % FCS 6 mM Glutamin 1 mM Natrium-Pyruvat 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren 500 µg/mL G418 1 % Streptomycin / Penicillin (100×)

4.3.2 Stammhaltung und Zellpassagierung

Die Kultivierung der CHO DP-12-Zellen, der transduzierten Zellpools und der CHO K1-Suspensionszellen erfolgte standardmäßig in einem 125 mL Erlenmeyerkolben (Shaker) aus Polycarbonat ohne Schikanen der Firma Corning B.V. Life Sciences (Niederlande). Die Erlenmeyerkolben wurden auf einem Schüttler (Shaker ES-X, 50 mm Auslenkung, Fa. Kuhner, Schweiz) befestigt, der bei 185 rpm betrieben wurde. Um optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen zu schaffen, wurde der Schüttler in einem Brutschrank (Fa. Mytron, Heilbad Heiligenstadt) betrieben, in dem eine Atmosphäre von 5 % CO₂, eine Humidität von 80 % und eine Temperatur von 37 °C eingestellt wurde.

Das Arbeitsvolumen der Suspensionszellen betrug zwischen 30 und 50 mL. Die Kulturen wurden so inokuliert, dass eine Startzelldichte von 5×10^5 Zellen/mL erreicht wurde.

Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen passagiert und damit wieder auf die anfängliche Zellkonzentration verdünnt. Dazu wurde zunächst die genaue Zelldichte mit dem Cedex Analyzer (Fa. Roche (ehemals Innovatis), Mannheim) ermittelt (Abschnitt 4.3.3). Anschließend wurde die benötigte Menge Zellsuspension aus dem Corning[®]-Gefäß entnommen, mit frischem Medium vermischt und mit Glutamin aus einer sterilfiltrierten 200 mM Stamm-lösung supplementiert. Standardmäßig wurde mit 5 mM Glutamin kultiviert. Die übrige Zellsuspension wurde verworfen. Eine Kultivierung der CHO-Zellen in TPP-Kulturröhrchen (Fa. TPP, Schweiz) wurde ebenfalls im Brutschrank (Fa. Mytron, Heilbad Heiligenstadt) durchgeführt. Die Röhrchen wurden mit 10–20 mL Medium befüllt und in einem um ca. 30° geneigten Halter auf dem Schüttler befestigt.

Die HEK293FT-Zellen, sowie die adhärenenten CHO K1-Zellen wurden in einem Brutschrank (Function Line, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte) bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Da es sich um adhärenente Zellen handelt, wurden sie in beschichteten T-Flaschen (Nunc Flasks Nunclon[™] Δ, T80 oder T175, Fa. Nunc, Langenselbold) kultiviert. Die Zellen wurden passagiert, sobald sie konfluent gewachsen waren. Die Wachstumsoberfläche war zu diesem Zeitpunkt zu etwa 80–90 % bewachsen. In der Regel wurden die Zellen 1:10 verdünnt. Dazu wurde zuerst das Medium abgenommen und die Zellen mit erwärmtem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 mL einer Trypsin/EDTA Lösung (1:250, Fa. PAA, Österreich) auf die Zellen gegeben, das Kulturgefäß kurz geschwenkt und bei 37 °C etwa 3 min inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 mL FCS-haltigem Kultivierungsmedium inaktiviert. Etwa 1 mL dieser Suspension wurde in der T-Flasche zurückbehalten, der Rest wurde verworfen. Anschließend wurde das Volumen auf ca. 25 mL mit Kultivierungsmedium angeglichen.

Bei manchen der durchgeführten Experimente, wie der Nukleofektion oder der Selektion der EPO-produzierenden Zellen, war es erforderlich, in Volumina kleiner als 10 mL zu kultivieren. Für eine solche Kultivierung wurden *Multiwell*-Zellkulturplatten (Fa. VWR, Darmstadt) eingesetzt. Das Format variierte je nach Anwendung zwischen *6-well*- und *12-well*-Zellkulturplatte. Hierbei lagen die Kultivierungsvolumina zwischen 2 und 5 mL. Die Zellkulturplatten wurden, sofern es sich bei den kultivierten Zellen um Suspensionszellen handelte, in eine Klemmvorrichtung auf einem Schüttler (CERTOMAT[®] SII, 50 mm Auslenkung, Fa. Sartorius AG, Göttingen) gespannt und bei 125 rpm im Brutschrank (Fa. Mytron, Heilbad Heiligenstadt, Bedingungen siehe oben) kultiviert. Adhärenente Zellen wurden nach dem Aussähen ebenfalls in einem Brutschrank (Function Line, Fa. Heraeus), jedoch ohne Schüttelvorrichtung, kultiviert.

Tabelle 4.15: Zusammensetzung des PBS-Puffers. Das PBS wurden ebenfalls in weiteren Arbeitsschritten, wie der Isolierung genomischer DNA (Abschnitt 4.2.14), der Kryokonservierung (Abschnitt 4.3.4), der Transduktion (Abschnitt 4.3.9) und der Durchflusszytometrie (Abschnitt 4.3.6), verwendet.

Lösung	Zusammensetzung
PBS	210 mg/L KH_2PO_4 9 g/L NaCl 726 mg/L Na_2HPO_4

4.3.3 Automatische Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung mit dem Cedex

Sowohl die Zelldichte, als auch die Viabilität einer Zellkultur sind Parameter, die während der Stammhaltung oder einer Kultivierung regelmäßig überprüft werden müssen. Die automatisierte Zellzählung und Viabilitätsbestimmung erfolgte mit dem *cell density examination system*, dem Cedex (Fa. Roche (ehemals Innovatis), Mannheim). Dabei wird die Probe mit Trypanblau vermischt und durch eine Durchflusszelle geleitet. Das Trypanblau dringt nur in tote Zellen mit beschädigten Membranen ein und färbt diese dunkelblau an (Tennant, 1964). So kann die Cedex-Software eine Serie von Bildern einer CCD-Kamera auswerten und zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden.

4.3.4 Kryokonservierung

Bei Arbeiten mit RNA-Interferenz ist es für eine korrekte Evaluation der Experimente besonders wichtig, konsistente Eigenschaften der benutzten Zellen garantieren zu können. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Arbeit eine *working cell bank* (WCB) zur Sicherung des Ursprungszustandes der verwendeten Zelllinien CHO DP-12, CHO K1 (in Suspension), CHO K1 (adhärent) sowie HEK293FT angelegt. Auch die erzeugten transduzierten oder transfizierten Zellpools wurden als Kryokultur eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte in einem Kryotank (Chronos Biosafe 350, Fa. Messer-Griesheim, Sulzbach) in der Dampfphase flüssigen Stickstoffs bei einer Temperatur von etwa $-196\text{ }^\circ\text{C}$.

Das Einfrieren der Zellen geschah während sich diese in der exponentiellen Phase befanden. Pro *cryovial* wurden $1,1 \times 10^7$ Zellen verwendet. Das entsprechende Volumen Zellsuspension wurde 5 min bei 200 g zentrifugiert (Megafuge 1.0, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte), der Überstand verworfen und das Pellet in $4\text{ }^\circ\text{C}$ kaltem, mit DMSO-versetztem Kultivierungsmedium (Tabelle 4.14) vorsichtig resuspendiert. In jedes zu befüllende *cryovi-*

al wurden 1,5 mL Zellsuspension gefüllt. Nach der Aliquotierung in die *vials* wurden diese sofort in einen auf 4 °C gekühlten *Freezing-Container* (Mr Frosty, Fa. Nalgene, Dänemark) überführt und in diesem für 24 h bei -80 °C gelagert. Die Temperatur im Behälter sank dabei um 1 °C pro Minute ab, wodurch die Zellen schonend eingefroren wurden. Nach 24 h wurden die *cryovials* in den Stickstofftank überführt. Um die gefrorenen Zellen wieder aufzutauen, wurden die benötigten *cryovials* aus dem Tank entnommen und zügig in der Hand erwärmt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig in 10 mL 4 °C kaltem PBS resuspendiert und anschließend 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 10 mL raumtemperiertem Kultivierungsmedium aufgenommen. Für die Inokulation eines TPP-Kulturröhrchens oder einer T-Flasche wurde ein *cryovial* benutzt. Die Kulturröhrchen bzw. die Shaker wurden anschließend im Brutschrank inkubiert (Abschnitt 4.3.2).

4.3.5 Fed-Batch Kultivierung im Shaker-Maßstab

Die Fed-Batch Kultivierung von CHO-Zellen erfolgte im Shaker unter Standard-Kultivierungsbedingungen (Abschnitt 4.3.2). Das Startvolumen betrug 20 mL, welches mit einer Zelldichte von 5×10^5 Z/mL inokuliert wurde. Auch hier betrug die eingesetzte Glutamin-Konzentration 5 mM.

Tabelle 4.16: *Feed-Regime* für den Fed-Batch mit CHO DP-12-Zellen. Inokuliert wurde zur Kultivierungszeit $d = 1$. Ab Tag 2, also dem ersten Tag nach der Inokulation, wurde mit der *Feed-Zugabe* begonnen. Nach Tag 7 betrug der *Feed* pro Tag 2,4 mL.

Kultivierungszeit [d]	1	2	3	4	5	6	7
<i>Feed-Menge</i> [ml/20 mL]	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2,4

Als *Feed* wurde TCx2D (Fa. TeutoCell AG, Bielefeld) eingesetzt, welcher zusätzlich mit 20 g/L Glukose und 5,5 g/L Glutamin supplementiert war. Zufüttert wurde nach dem in Tabelle 4.16 gezeigten *Feed-Regime*. Es wurden täglich Proben der Fed-Batch Kulturen in Doppelbestimmung im Cedex gemessen (Abschnitt 4.3.3). Zusätzlich wurden Aliquote der Kulturen für die spätere Produktanalytik (Abschnitt 4.5) bei -20 °C eingefroren.

4.3.6 Durchflusszytometrische Analyse von Zellkulturen (FACS)

Die auch als *fluorescence activated cell sorting* (FACS) bekannte Durchflusszytometrie erlaubt es, in kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen bezüglich Größe und Granularität

zu analysieren. Dabei werden die Zellen vereinzelt durch einen Laserstrahl geleitet und das gestreute und gebrochene Licht als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) detektiert. Der FSC ist ein Maß für die Größe der Zelle, der SSC ein Indiz für die Granularität und den Kompartimentierungsgrad der Zelle. Zusätzlich kann ebenfalls eine von den Zellen emittierte Fluoreszenz gemessen werden, was eine zusätzliche Charakterisierung der Zellen bzw. der Zellpopulationen erlaubt. Die verschiedenen Fluoreszenzkanäle werden mit FL1, FL2 und FL3 bezeichnet.

Für die FACS-Analysen in dieser Arbeit wurde mit dem FACSCaliburTM der Firma BD Biosciences (Belgien) gearbeitet. Die Zellen wurden dazu so in einem Polystyrol-Röhrchen mit PBS verdünnt, dass 200 *events/s* durch den Laser angeregt und vom Detektor erfasst wurden. Damit unterschiedliche Proben und die dazugehörigen Daten miteinander verglichen werden konnten, akquirierte die Software so lange Messwerte, bis 10000 *events* in *gate* der Zellpopulation erfasst wurden. Der *threshold* wurde auf 92 eingestellt, um Zelldebris oder andere nicht-zelluläre Fragmente von der Analyse auszuschließen. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte über ein *gate*, im *Dot-Plot* „SSC gegen FSC“, welches die Zellpopulation erfasste. In einem Histogramm wurde die GFP-Expression ausgewertet. Damit wurde der Anteil der durch das *gate* definierten Zellpopulation von GFP-emittierenden und nicht-emittierenden Zellen bestimmt.

4.3.7 Transfektion durch Nukleofektion

Die Transfektion mit dem *Nucleofector*[®] II (Fa. Lonza, Schweiz) ist ein auf Elektroporation basierendes System, um Nukleinsäuren in tierische Zellen einzubringen. Dabei werden die Zellen so mit elektrischen Impulsen behandelt, dass die Zellmembran perforiert wird, ohne diese zu zerstören. Die Nukleinsäuren in der Lösung passieren die Membran und werden durch spezielle Substanzen in der Nukleofektionslösung in den Zellkern transportiert. Da jede Zelllinie unterschiedlich auf die Elektroporationsimpulse reagiert, muss für jede zu transfizierende Zelllinie ein geeignetes Transfektionsprogramm in Verbindung mit dem verwendeten Nukleofektionspuffer ermittelt werden. Die für jede verwendete Zelllinie ermittelten Parameter und deren Bestimmung sind im Ergebnisteil detailliert beschrieben (Abschnitt 5). Eine Übersicht über die letztlich verwendeten Nukleofektionsparameter ist in Tabelle 4.17 gegeben.

Tabelle 4.17: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Nukleofektionsprogramme, je nach Zelllinie. Zudem ist der jeweilige Nukleofektionspuffer und die Transfektionseffizienz in Form des Anteils der transfizierten Zellen angegeben.

Zelllinie	Programm	Puffer	Effizienz [%]
CHO DP12	X-001	V	82
CHO K1 adhären	U-023	L	91
CHO K1 Suspension	U-024	L	86
CHO K1 Suspension	X-001	L	42

Für jeden Transfektionsansatz wurden 1×10^6 Zellen verwendet. Die zu transfizierenden Zellen wurden nicht öfter als sechsmal nach dem Auftauen (Abschnitt 4.3.4) passagiert, um die Reproduzierbarkeit und damit die Vergleichbarkeit der Experimente gewährleisten zu können. Die entsprechende Menge an Zellsuspension wurde 5 min bei 200 *g* zentrifugiert (Megafuge 1.0, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und der Überstand verworfen. Durch vorsichtiges Klopfen des Reaktionsgefäßes wurden die Zellen im Restvolumen des Zentrifugats gelöst. Anschließend wurden 100 μL Nukleofektionslösung pro Reaktion hinzugegeben und die Zellen resuspendiert. Für eine Transfektion wurden die 100 μL zellhaltige Flüssigkeit in eine Nucleofector[®] II -Küvette überführt und die DNA hinzupipettiert. Die DNA-Menge richtete sich je nach zu nukleofizierendem Plasmid und ist in der jeweiligen Ergebnisdokumentation vermerkt. Direkt nach der Nukleofektion wurden 500 μL vorgewärmtes Kulturmedium (Tabelle 4.14) in die Küvette gegeben, ohne die Zellen dabei zu resuspendieren. Die 600 μL Zellsuspension konnten mit einer Spezialpipette aus der Küvette gesogen und in ein *well* einer 12-*well*-Kulturplatte, gefüllt mit 1,5 mL Kulturmedium, getropft werden. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank 24 h inkubiert (Abschnitt 4.3.2).

4.3.8 Herstellung pseudotypisierter Lentiviren

Stabile Zelllinien können durch verschiedene Techniken generiert werden. Eine weit verbreitete Methode ist die Transfektion linearisierter Plasmid-DNA, die mit anschließender Selektion über einen Resistenzmarker kombiniert wird. Die schnellere und effizientere Alternative ist die Infektion mit Viren, die stabil in das Wirtsgenom integrieren können. Häufig werden dazu Lentiviren eingesetzt, weil sie verschiedene Vorteile besitzen, die ein breites Anwendungsspektrum ermöglichen (Naldini *et al.*, 1996). Sie sind beispielsweise in der Lage, auch nicht-teilende Zellen zu infizieren und eine stabile Integration durchzuführen und sind zudem einfach herzustellen. Die Transfervektoren können für verschiedene Zwecke, wie

die Expression einer cDNA aber auch einer shRNA, angepasst werden. Da die Lentiviren trotz des hohen Sicherheitsstandards potentiell gefährlich sind, wurden alle Arbeiten mit den Viren unter S2-Bedingungen durchgeführt. Dazu gehörten die Virusherstellung, -ernte und die Transduktion von Zellen (Abschnitt 4.3.9).

Für die Virusherstellung wurde das *Lenti-XTM Lentiviral Expression System* in Kombination mit dem Transfervektor pLVX-shRNA1 verwendet (Fa. Takara Bio Europe/Clontech, Frankreich). Am Tag vor der Transfektion der HEK293FT-Zellen zur Erzeugung der Lentiviren wurden diese nochmals passagiert (Abschnitt 4.3.2). Das Trypsin wurde durch Zugabe von DMEM-Medium, versetzt mit 10 % zertifiziert Tetracyclin-freiem FCS und 6 mM Glutamin, inaktiviert. Da in dem verwendeten lentiviralen Verpackungssystem ein Tet-Off[®] Transaktivierungssystem verwendet wurde, wäre Tetracyclin-haltiges FCS für die Virusproduktion kontraproduktiv gewesen. Die exakte Zellzahl wurde mit dem Cedex bestimmt (Abschnitt 4.3.3) und 8×10^6 Zellen in eine T80-Kulturflasche (Fa. Nunc, Langenselbold) überführt. Das Kulturvolumen betrug 10 mL. Am darauffolgenden Tag wurden die HEK293FT-Zellen transfiziert. Dazu wurde generell nach Anleitung des Herstellers vorgefahren (Clontech, 2012c). Es wurden zwei sterile Reaktionsgefäße vorbereitet. In das erste Gefäß wurden *XfectTM Reaction Buffer*, 36 μL des *Lenti-XTM HTX Packaging Mix* sowie 7 μg des lentiviralen Transfervektors zu einem Gesamtvolumen von 600 μL vereinigt. In einem zweiten Gefäß wurden 7,5 μL *XfectTM Polymer* mit 592,5 μL *XfectTM Reaction Buffer* zusammengeführt. Beide Reaktionsgefäße wurden intensiv gevortext. Anschließend wurde der Inhalt des zweiten Gefäßes dem Inhalt des ersten Reaktionsgefäßes hinzugefügt und bei mittlerer Intensität erneut gevortext. Die 1200 μL wurden dann zu den Zellen getropft und durch Schwenken der T-Flasche verteilt. Nach 4 h wurde das Medium gegen frisches DMEM mit 10 % zertifiziert Tetracyclin-freiem FCS und 6 mM Glutamin getauscht. Die Zellen wurden für 72 h im Brutschrank (Function Line, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte) inkubiert (Abschnitt 4.3.2).

4.3.9 Virusernte und Transduktion von CHO-Zellen

Der virushaltige Überstand (Abschnitt 4.3.8) konnte nach 72 h Stunden geerntet werden. Dazu wurden die 10 mL Medium vorsichtig von den Zellen abgenommen und 10 min bei 200 g und 4 °C zentrifugiert (Rotina 420R, Fa. Hettich, Tuttlingen). Anschließend wurde das Zentrifugat über einen 0,45 μm Sterilfilter (Fa. Sartorius AG, Göttingen) geklärt und konnte dann zur Infektion von CHO DP-12-Zellen eingesetzt werden. Die CHO DP-12-Zellen wurden in Shaker ausgesäht (Abschnitt 4.3.2). Es wurde eine Zelldichte von 5×10^5 Z/mL verwendet. Diese Zelldichte war für ein Kulturvolumen von 30 mL berechnet, jedoch nur in

20 mL Kulturmedium angesetzt. Zu dem Medium wurden 4 µg/mL Polybrene (Hexadimethrinbromid, Fa. Sigma-Aldrich, USA) hinzugefügt. Polybrene ist ein Poly-Kation, welches die Abstoßung der negativen Ladung zwischen dem Virus und der Zellmembran reduziert (Davis *et al.*, 2004). Danach wurden die 10 mL geernteter Virusüberstand zu den CHO DP-12-Zellen hinzugefügt. Die Shaker wurden für 5 h in den Brutschrank bei 33 °C gestellt. In dieser Zeit wurden die Kulturen nicht geschüttelt, da so eine Infektion der Zellen erleichtert wird. Die Reduktion der Temperatur verlängert die Halbwertszeit der Viruspartikel, wodurch höhere Transduktionsraten erreicht werden können (Higashikawa & Chang, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Nach Ablauf der 5 h wurde der Schüttler wieder aktiviert und die Temperatur auf 37 °C erhöht. 48 h nach Beginn der Infektion galt diese als abgeschlossen (Clontech, 2012c). Die Zellen wurden zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in frischem Kultivierungsmedium in neue Shaker überführt. Da die verwendeten Viren replikationsdefizient waren, konnten die transduzierten Zellen nach dieser Zeit und dem Waschen wieder in den S1-Bereich überführt und dort kultiviert werden. Zur Selektion der stabil transduzierten Zellen wurde dem Medium 5 µg/mL Puromycin hinzugefügt. Die Ermittlung dieser Selektionskonzentration ist im Ergebnisteil genauer beschrieben (Abschnitt 5.1.2). Die eigentliche Selektionsphase war nach ca. 12–14 Tagen abgeschlossen. Während der Selektionsphase wurden lediglich Einfachbestimmungen im Cedex (Abschnitt 4.3.3) durchgeführt.

4.4 Bioreaktorkultivierung und differentieller Microarray

4.4.1 Kultivierung von tierischen Zellen im geregelten Bioreaktor

Für die Generierung von Proben für einen differentiellen Microarray (µArray) wurden Bioreaktorkultivierungen durchgeführt. Der Vorteil in der Nutzung eines geregelten Systems besteht darin, dass die Kultivierungsparameter, wie z. B. der pH-Wert, konstant gehalten werden können. Auf diese Weise können die in nachfolgenden Experimenten ermittelten Daten auf die durchgeführte biologische Fragestellung bezogen werden und andere Effekte, wie z. B. Veränderungen im pH-Wert oder im Gelöst-Sauerstoff, sollten sich nicht auf den zellulären Metabolismus auswirken.

Die Bioreaktorkultivierungen wurden in 2 L-Fermentationssystemen durchgeführt, den BIOSTAT[®] MD-Systemen und den BIOSTAT[®] Aplus Reaktoren (Fa. Sartorius Stedim Systems GmbH, Göttingen). Der Aufbau der Reaktoren entsprach einer Batch-Kultivierung. Durch den Edelstahldeckel wurden verschiedene Sonden (pH- (Fa. Mettler Toledo, USA), pO₂- (Fa. Hamilton, Schweiz), PT100-Temperatursonde (Fa. Sartorius AG, Göttingen)) im Innenraum der Reaktoren installiert. Zusätzlich wurden Septen in den Bioreaktoren einge-

baut, durch die ein Natriumbutyrat-Puls zugeführt werden sollte. Weiterhin wurden Tauchrohre für ein Probenahme-System mittels Luer-Lock (Fa. DASGIP, Jülich) und zum Animpfen der Reaktoren eingebaut. Das Rührsystem verfügte sowohl über einen Schrägblattrührer, als auch eine Rushton-Turbine. Die Bioreaktoren der MD-Systeme wurden durch einen beheizbaren Doppelmantel temperiert, die Aplus Reaktoren durch eine elektrische Heizmanschette. Alle Bioreaktoren verfügten über zwei Gaseinlässe, den Kopfraum (Luft, CO₂, N₂) und die Ringbrause (O₂). Die Gasein- und Gasausgänge wurden mit 0,2 µm Sterilfiltern (Midisart[®], Fa. Sartorius AG, Göttingen) versehen. Die Regelung des pH-Werts erfolgte durch Zugabe von Base (1 M NaHCO₃) oder CO₂. Der Gelöst-Sauerstoff wurde durch die übrigen Gase eingestellt. Die Bioreaktoren wurden mit einer Zelldichte von 4×10⁵ Z/mL in einem Gesamtvolumen von 1,2 L mit einer Glutaminkonzentration von 5 mM inokuliert. Die Sollwerte für den pH-Wert, die Temperatur und den Gelöst-Sauerstoff betragen 7,1, 37 °C und 40 %. Die initiale Rührerdrehzahl betrug 100 rpm, wurde aber im Verlauf der Kultivierung zur Vermeidung von Aggregaten auf bis zu 200 rpm erhöht.

4.4.2 Probenahme während der Bioreaktorkultivierung und Injektion von Natriumbutyrat

Die Probenahme der Bioreaktoren erfolgte direkt nach dem Animpfen bzw. zweimal täglich. Das Ventil wurde vor und nach der Probenahme mit 70 % Ethanol sterilisiert. Für den Vorlauf wurden 5 mL Suspension mit einer sterilen Einwegspritze (Fa. B|Braun, Melsungen) über die Luer-Lock-Sterilkupplung gezogen und verworfen. Anschließend wurden 10 mL Zellsuspension aus dem Bioreaktor entnommen. Die Zelldichten und die Viabilitäten wurden in drei technischen Replikaten mit dem Cedex bestimmt (Abschnitt 4.3.3). 5×10⁶ Zellen wurden mit TRIzol[®] behandelt (Abschnitt 4.2.11) und für eine mögliche spätere Analyse durch einen Microarray bei -80 °C eingefroren. Weiterhin wurde 3 × 1 mL zellfreier Überstand durch Zentrifugation der Suspension bei 200 g und 5 min gewonnen und für die spätere Produktanalytik bei -20 °C eingefroren.

Die Zugabe des Natriumbutyrats erfolgte über die in die Bioreaktoren eingebauten Septen (Abschnitt 4.4.1). Dazu wurde ein entsprechendes Volumen einer 1 M sterilfiltrierten Natriumbutyrat-Stammlösung in der Sterilbank in eine sterile Einwegspritze (Fa. B|Braun, Melsungen) aufgezogen. Die Spritze wurde mit einem 0,2 µm Minisart[®] Spritzenvorsatzfilter (Fa. Sartorius AG, Göttingen) und einer sterilen Kanüle verschlossen. Vor und nach der Injektion wurden die Septen mit 70 % Ethanol desinfiziert.

4.4.3 Differentielle Analyse der Genexpression mit einem *custom*-cDNA-Microarray

Die Microarray (μ Array)-Technologie erlaubt es, eine Vielzahl von Genen oder mRNAs gleichzeitig zu evaluieren. Dabei sind Gensonden, sogenannte *probes*, auf einem Glasobjektträger immobilisiert. Bei den von der Firma Agilent Technologies (USA) vertriebenen cDNA-Genexpressions- μ Arrays handelt es sich um 60-mer Oligonukleotide, die spezifisch an ein Transkript aus einem zellulären Transkript-*Pool* hybridisieren können. So kann diese Technik beispielsweise in der differentiellen Genexpressionsanalyse genutzt werden. Dazu werden die Transkripte zweier Proben, z. B. einer mit einer Komponente induzierten Kultur und einer Referenzkultur, mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert (*labeling*). Diese werden dann an die *probes* hybridisiert und der μ Array kann mit einem speziellen Scanner ausgelesen werden. Jeder Farbstoff wird individuell angeregt und dessen Emission detektiert. So werden für jede Sonde zwei Farbtintensitäten gemessen. Diese können mit einer Software ausgewertet werden, um Unterschiede in der Genexpression zwischen den Proben zu evaluieren. So wird die Intensität des Referenzfarbstoffes mit dem des Probenfarbstoffes verglichen. Daraus ergibt sich ein gleiches, ein höheres oder ein geringeres Transkriptlevel der induzierten Kultur im Vergleich zur Referenz.

Bei dem verwendeten μ Array handelte es sich um ein *custom*-cDNA- μ Array (Fa. Agilent Technologies, USA) im Format 2×10^5 k. Pro Array wurden 94580 *probes* verwendet. Dadurch konnten 31905 der sequenzierten CHO-Transkripte abgedeckt werden (Becker *et al.*, 2011; Klausning *et al.*, 2011). Für das *labeling* der Proben wurde das *Quick Amp Labeling Kit, two-color* (Fa. Agilent Technologies, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet (Agilent Technologies, 2008). Dabei wird zunächst cDNA aus der Proben-RNA generiert, die dann durch Zugabe einer T7 RNA-Polymerase in cRNA (*complimentary* RNA) transkribiert wird. Dabei erfolgt gleichzeitig die Markierung der RNA durch Inkorporation von Cytidintriphosphat (CTP), welches mit den Farbstoffen *Cyanine 3* (Cy3) oder *Cyanine 5* (Cy5) verbundenen ist. Die markierte cRNA wurde über ein Spinsäulenverfahren gereinigt, um Enzyme und überschüssige Komponenten zu entfernen. Anschließend wurden die gelabelten Proben mit dem NanoPhotometer[®] quantifiziert (Abschnitt 4.2.4). Die Ausbeute musste für einen funktionierenden μ Array > 825 ng sein und die spezifische Aktivität des Farbstoffs $> 8,0$ pmol Cy3 oder Cy5 pro μ g cRNA. Die cRNA wurde über Nacht an die *probes* hybridisiert (*Microarray Hybridization Oven*, Fa. Agilent Technologies (USA)) und konnte am darauffolgenden Tag gescannt werden (*High-Resolution Microarray Scanner*, Fa. Agilent Technologies (USA)). Damit in der Auswertung statistische Tests möglich wa-

ren, wurden insgesamt 4 Arrays durchgeführt, von denen je 2 Arrays ein *dye-swap*, also ein Tausch der *labeling*-Farbstoffe Cy3 bzw. Cy5, waren.

Die Auswertung der μ Arrays erfolgte durch von der *Bioinformatics Resource Facility* (BRF, CeBiTec, Universität Bielefeld) bereitgestellte Software-Tools. Zunächst wurden die Daten der Arrays durch das Programm *ArrayLIMS* archiviert und damit den anderen Programmen zur Verfügung gestellt. So konnten die μ Arrays in das Programm *EMMA* importiert werden, mit dem die Auswertung der differentiellen Genexpression erfolgte (Dondrup *et al.*, 2003; Küster *et al.*, 2007). Durch Verknüpfung mit *SAMS* konnten die einzelnen *probes* identifiziert werden (Bekel *et al.*, 2009).

Damit die Daten interpretiert werden konnten, wurden in *EMMA* statistische Methoden angewendet. Die Rohdaten wurden zunächst durch eine Agilent-Hintergrund- und in *EMMA* durch eine *locally weighted scatterplot smoothing* (LOWESS)-Normalisierung normalisiert (Berger *et al.*, 2004). Die Normalisierung soll der Eliminierung der nicht-biologisch bedingten Varianz in der gemessenen Signalintensität dienen. Der der LOWESS-Normalisierung zugrunde liegende Algorithmus gewichtet lokal mittels polynominaler Regression die Intensität in einem MA-Plot (Dudoit *et al.*, 2002). Durch einen Signifikanztest mit *false discovery rate* (FDR) ($\alpha=0,05$) wurde eine sichere Identifikation differentiell transkribierter Gene ermöglicht. Die differentiell transkribierten Gene wurden durch die Wahl von Filtern sortiert. Der angepasste p-Wert lag bei $\leq 0,05$, die log-Ratio bei < -1 oder > 1 (entspricht einem *fold change* von < -2 oder > 2) und die log-Intensität war ≥ 6 , was einer Roh-Intensität von ≥ 64 entsprach. Der *fold change* erlaubt eine quantitative Beurteilung der Veränderung der Genexpression im Vergleich zu einer Referenz. Bei dem angepassten p-Wert handelt es sich um eine Berechnung, die durchgeführt wird, wenn mehrere p-Werte miteinander verrechnet bzw. verglichen werden müssen. Da bei den durchgeführten Experimenten je vier Arrays miteinander verglichen wurden, war der angepasste p-Wert ein sinnvolles Maß für die Beurteilung der statistischen Signifikanz. Im Anhang werden die aus dem μ Array-Experiment erhaltenen Daten dargestellt (Abschnitt A.2).

4.5 Analytik der Zellkulturprozesse

4.5.1 Glukose- / Laktat-Konzentration

Die Glukose- und Laktatkonzentration der Proben wurden mit einem Glukose-/Laktat-Biosensor (YSI 2700 S, Fa. Yellow Springs Instruments, USA) bestimmt. Die Messung erfolgt über membrangebundene Enzyme. Dabei wird Glukose unter Verbrauch von Sauerstoff zu Glucono- δ -lacton umgesetzt. In dieser Reaktion entsteht Wasserstoffperoxid, welches nach

Passieren einer Celluloseacetatmembran an einer Platin-Anode oxidiert wird. Der Stromfluss wird gegen ein Ag/AgCl-Bezugssystem gemessen. Die Messung der Laktat-Konzentration erfolgt analog dazu. Dabei wird das Laktat von einer Laktatoxidase umgesetzt. Die Proportionalität des Stromflusses zur Konzentration des Analyten im Vergleich zu einer Referenzlösung erlaubte die Berechnung der Konzentration der Probelösung.

4.5.2 Aminosäure-Konzentration

Die Analyse der Aminosäurekonzentration erfolgte über eine *Reversed-Phase*-HPLC mit einer RP18-Säule. Die mobile Phase bestand aus einem binären Puffersystem mit einem Gradienten vom polaren zum unpolaren Puffer (Büntemeyer, 1988). Zunächst mussten die zellfreien Überstände von Proteinen durch Fällung befreit werden. Dazu wurden 50 μL Probe mit 50 μL 10 % Perchlorsäure versetzt und abzentrifugiert. 50 μL des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 μL 0,6 M Kalium-Boratpuffer (pH 10,4) durch vortexen gemischt und wieder abzentrifugiert. 20 μL dieses Überstandes wurden dann für die Aminosäureanalytik verwendet. Damit die Aminosäuren detektiert werden konnten, wurden diese zuvor durch eine Vorsäule derivatisiert (25 mg ortho-Phthaldialdehyd gelöst in 0,5 mL Methanol mit 50 μL 3-Mercaptopropionsäure und 4,5 mL 0,6 M Boratpuffer (pH 10,4)). So entsteht ein Isoindolderivat, dass durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm bei einer Emission von 450 nm fluoresziert (Lim, 1986). Durch einen Vergleich mit einem internen Standard (L-Norvaline) und Berechnung der Peakflächen konnte die Aminosäurekonzentration bestimmt werden.

4.5.3 Antikörperbestimmung durch Protein A-Affinitätschromatographie

Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgte über eine Protein A-Säule (POROS A, Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) mit einem HPLC-System. Dazu wurden 120 μL des zellfreien Überstandes für 1 min bei 4 °C und 16000 g (Hereaus fresco, Fa. Thermo Fisher Scientific, Schwerte) durch einen 0,2 μm Zentrifugal-Filter zentrifugiert. Anschließend wurden 100 μL der Probe in ein Probengefäß überführt. Bei der Messung wurden die Peakflächen mit einer Reihe von internen Standards verglichen, um die Konzentration des Antikörpers berechnen zu können.

4.5.4 Bestimmung der EPO/DARBE-Produktkonzentration

Die Ermittlung der Erythropoetin- bzw. Darbepoetin-Konzentration erfolgte mit einer *Reversed-Phase*-4-HPLC-Säule (Nucleosil 300-5 C4, Fa. Macherey-Nagel, Düren) in einem binären Puffersystem. Laufmittel A bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure in dH_2O , Laufmit-

tel B aus 0,095 % Trifluoressigsäure in 80 % Acetonitril / 20 % dH₂O. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 214 nm durch Messung der Absorption der Peptidbindung. Für eine Probe wurden 50 µL zellfreier Überstand verwendet.

4.6 Berechnung zellspezifischer Parameter

In dieser Arbeit wurden sowohl Batch- als auch Fed-Batch-Prozesse durchgeführt. Die Berechnung der zellspezifischen Parameter wurde auch für die Fed-Batch-Prozesse angewandt, da das Volumen nur geringen Änderungen unterlag.

4.6.1 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ

Die zeitliche Änderung der Zelldichte während einer Batch-Kultivierung kann durch Gleichung 4.2 beschrieben werden (Pirt, 1985).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (4.2)$$

Dabei ist X die Zelldichte, t die Kulturdauer und μ die spezifische Wachstumsrate. Die Berechnung kann durch die Differenzmethode, wie in Gleichung 4.3 gezeigt, durchgeführt werden.

$$\mu \approx \frac{\Delta X}{\Delta t \cdot X_m} = \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1) \cdot X_m} \quad \text{mit} \quad X_m = \frac{X_1 + X_2}{2} \quad (4.3)$$

4.6.2 Berechnung der Produkt- und Substratbildungs- bzw. -verbrauchsrate

Während einer Kultivierung werden Substrate wie z. B. Glukose von der Zelle aufgenommen und metabolisiert. Dabei entstehen neben dem Produkt auch andere Komponenten des Zellstoffwechsels, wie beispielsweise Laktat. Auch hier wurde die Differenzmethode benutzt, um die spezifischen Bildungs- und Verbrauchsrate q_S und die Produktbildungsrate q_P zu berechnen.

$$\frac{dS}{dt} = q_S \cdot X$$

$$q_S \approx \frac{\Delta S}{\Delta t \cdot X_m} = \frac{(S_2 - S_1)}{(t_2 - t_1) \cdot X_m} \quad \text{mit} \quad X_m = \frac{X_1 + X_2}{2} \quad (4.4)$$

Gleichung 4.4 beschreibt die Formel zur Berechnung der Substratbildungs- und -verbrauchsrate, Gleichung 4.5 die der Produktbildung. S ist die Substratkonzentration zum gekennzeichneten Berechnungszeitpunkt, P analog dazu die Produktkonzentration.

$$\frac{dP}{dt} = q_P \cdot X$$

$$q_S \approx \frac{\Delta P}{\Delta t \cdot X_m} = \frac{(P_2 - P_1)}{(t_2 - t_1) \cdot X_m} \quad \text{mit} \quad X_m = \frac{X_1 + X_2}{2} \quad (4.5)$$

5 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnis- und Diskussionsteil ist in mehrere Unterkapitel gegliedert. Zunächst werden allgemeine Experimente für den RNAi-Teil beschrieben, da diese Ergebnisse für den restlichen Kontext notwendig sind. Dazu gehören Transfektionstests, die Bestimmung der einzusetzenden Konzentration eines selektiven Agens, die Erzeugung einer Leervektor-transduzierten Negativkontrolle sowie die Tests der Primer für die qRT-PCR. Danach werden die einzelnen RNAi-Experimente beschrieben, in denen verschiedene Zielgene auf ihre Eignung in Bezug auf die ZLE hin untersucht wurden. Dabei wurde zunächst in transienten Tests eine geeignete shRNA-Sequenz zum *knockdown* des Zielgens ermittelt. Mithilfe dieser Sequenz wurden Lentiviren generiert, die die Erzeugung eines mit der shRNA stabil transduzierten CHO DP-12 Zellpools erlaubten. Da nach der Transduktion keine Einzelzellerexpansion durchgeführt wurde, werden die erzeugten Zellen nach der Transduktion als Zellpool und nicht mehr als Zelllinie bezeichnet. Nach der stabilen Modifikation erfolgte die Charakterisierung der Auswirkungen des *knockdowns* der Zielgene durch Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen. Die Erzeugung der lentiviral modifizierten Negativkontrolle (Abschnitt 5.1.3) und die Arbeiten im Zusammenhang mit dem *knockdown* von *Set* erfolgten in Kooperation mit Frau Sandra Klausning.

Der sich an diesen Themenkomplex anschließende Teil stellt einige Experimente eines alternativen Systems zur Manipulation der Genexpression bzw. zum Gen-*knockout* vor. Am Beispiel des *knockouts* der Glutamin-Synthetase mit dem CoDA-Zinkfinger-Nuklease-System werden die Vor- und Nachteile dieses Systems gezeigt und im Zusammenhang mit kommerziell erwerblichen Zinkfinger-Nukleasen diskutiert.

In den letzten Kapiteln des Ergebnis- und Diskussionsteils wird die Konstruktion von rekombinanten CHO-Zellen, die Erythropoetin bzw. Darbepoetin alfa produzieren sollten, beschrieben. Mit Hilfe dieser Zellen könnte in weiteren Arbeiten eine Übertragbarkeit der Ergebnisse der zuvor durchgeführten RNAi-Experimente untersucht werden.

5.1 Etablierung von Methoden für die nachfolgenden RNAi-Experimente

5.1.1 Ermittlung geeigneter Nukleofektionsparameter für die Modell-Zelllinie CHO DP-12

Das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen kann je nach Zelltyp und Transfektionsmethode unterschiedlich effizient sein (Micka *et al.*, 2000). Da für die Evaluation eines shRNA-*knockdowns* die mRNA-Reduktion deutlich messbar sein muss, ist eine hohe Transfektionseffizienz der shRNA-Expressionsplasmide erforderlich. So kann gewährleistet werden, dass der *knockdown* mittels qRT-PCR messbar ist und nicht aufgrund einer unzureichenden Transfektion keine eindeutige Veränderung der mRNA-Menge detektiert wird. Aus diesem Grund wurden transiente Transfektionen in dieser Arbeit mittels Nukleofektion durchgeführt. Die Nukleofektion ermöglicht hohe Transfektionsraten auch bei schwierig zu transfizierenden Zellen (Iversen *et al.*, 2005; Gresch & Altrogge, 2012).

Auch wenn CHO-Zellen zu den etablierten, einfach zu transfizierenden Zelllinien zählen, lässt sich die Nukleofektion einsetzen, um hohe Transfektionseffizienzen zu erreichen. Dazu musste ein geeignetes Nukleofektionsprogramm in Kombination mit dem zu verwendenden Puffer für die CHO DP-12-Zellen ermittelt werden. Es wurden 4 verschiedene Programme in Verbindung mit dem Nukleofektionspuffer V getestet (Abschnitt 4.3.7). Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden 2 µg des pmaxGFP[®]-Plasmids transfiziert. Die Analyse erfolgte 24 h nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie (Abschnitt 4.3.6). Da die Zellen nicht mit einem Agens gefärbt wurden, das eine Lebend-/Tot-Unterscheidung durch das Gerät ermöglicht hätte, wurde eine Probe der transfizierten Zellen zusätzlich im Cedex vermessen (Abschnitt 4.3.3). Die ermittelten Transfektionsraten und die Viabilität der Zellen sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

Alle verwendeten Programme erzielten mit 79 % bis 82 % hohe Transfektionsraten. Die Viabilitäten waren mit 86 % bis ca. 99 % wenig verändert zur Ursprungskultur, deren Viabilität bei 99 % lag. Für die shRNA-Transfektionsexperimente wurde Programm X-001 verwendet, da es die höchste Transfektionseffizienz und zugleich eine hohe Viabilität aufwies. Die auf diese Weise ermittelten Programme unterschieden sich zum Teil von denen, die für andere CHO-Zellen empfohlen werden. So gibt der Hersteller für CHO K1SV-Zellen, transfiziert mit dem Programm U-023 und Puffer V, eine Nukleofektionseffizienz von 80 % an. Die CHO DXB11-Zellen lassen sich unter Verwendung des gleichen Puffers mit Programm U-024 zu 69 % transfizieren (Lonza, 2009b). Diese Variabilitäten zwischen den unterschiedlichen Zelllinien zeigen deutlich, dass, obwohl sie alle auf einen Ursprungsklon zurückzuführen sind,

Tabelle 5.1: Anhand von Durchflusszytometrie ermittelte Transfektionseffizienzen für die CHO DP-12-Zellen unter Verwendung verschiedener Nukleofektionsprogramme. Der Anteil transfizierter Zellen wurde aus dem Verhältnis von GFP-exprimierenden zu nicht-exprimierenden Zellen berechnet. Die Viabilität wurde mit dem Cedex bestimmt.

Programm	Anteil transfizierter Zellen [%]	Viabilität [%]
A-033	79	98,8
U-023	73	86,4
D-023	79	97,7
X-001	82	98,5

eine Ermittlung geeigneter Nukleofektionsparameter für jede Zelllinie individuell notwendig und ratsam ist.

Die für die CHO DP-12-Zellen erreichten Transfektionseffizienzen sind auch im Vergleich zu anderen Zelltypen oder Zelllinien hoch. HeLa-Zellen (ATCC CCL-2) können mit ca. 70 % Transfektionseffizienz bei Verwendung von Programm I-013 und Puffer R nukleofiziert werden (Lonza, 2009a). Primärzellen, wie adulte, humane, epidermale Keratinozyten, können mit einem speziellen Keratinozyten-Puffer und dem Programm T-024 bei einer Viabilität von 86 % zu ca. 56 % transfiziert werden (Distler *et al.*, 2005). Die so erreichte Transfektionseffizienz ist deutlich geringer, als die für die CHO DP-12-Zellen ermittelte Effizienz. Dennoch ist dieses Verfahren für die Keratinozyten eine gute Lösung, da mit konventionellen Methoden, wie der Lipofektion und Calcium-Phosphat-basierten Techniken, die Keratinozyten praktisch nicht zu transfizieren sind (Distler *et al.*, 2005).

5.1.2 Kill curve-Experiment zur Ermittlung der einzusetzenden Puromycin-Konzentration zur Selektion in CHO DP-12-Zellen

Die Erzeugung eines stabilen shRNA-exprimierenden Zellpools erfolgte durch Transduktion der Parentalzelllinie CHO DP-12 mit Lentiviren. Obgleich eine lentivirale Transduktion in der Regel als stabil gilt (Naldini *et al.*, 1996; Ciuffi, 2008), kann durch Anlegen eines Selektionsdruckes die Stabilität der Zelle begünstigt werden. Weiterhin dient die Selektion dem Entfernen von nicht- oder geringtransduzierten Zellen. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass eine virale Infektion tierischer Zellen einer Poisson-Verteilung folgt (Flint *et al.*, 2009). Es liegen daher sowohl mehrfach infizierte Zellen mit einer hohen Anzahl an Provirus-Integraten vor, als auch Zellen, die nicht infiziert wurden (Kustikova *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2003). Um die Auswirkungen einer shRNA auf eine Kultur unter idealen Bedingun-

gen analysieren zu können, ist es sinnvoll, die nicht-transduzierten Zellen abzutöten, da sie durch ihre unveränderten Transkriptmengen die Auswertung mittels qRT-PCR verfälschen können. Gleichzeitig wird so die Stabilität der Modifikation unterstützt.

Der in dieser Arbeit verwendete lentivirale Transfervektor pLVX-shRNA1 kodiert eine Sequenz für das *Pac*-Gen, eine Puromycin-N-Acetyltransferase aus *Streptomyces alboniger* (Vara *et al.*, 1986). Puromycin kann als selektives Agens in tierischen Zellen eingesetzt werden, da es als Aminonukleosid-Antibiotikum die Proteinbiosynthese inhibiert. Die Konformation von Puromycin entspricht dem 3'-Ende von Aminoacyl-tRNAs, allerdings ist der Aminoacyl-Rest über eine Amidbindung anstelle einer Estherbindung verknüpft. Dadurch wird das Antibiotikum zwar mit einer wachsenden Polypeptidkette verbunden, die geringere Affinität des Peptidyl-Puromycins als die der Peptidyl-tRNA zum Ribosom sowie die Unfähigkeit des Ribosoms, die Amidbindung zu spalten, sorgen letztlich dafür, dass Peptidyl-Puromycin und Ribosom dissoziieren (Pestka, 1971). Die Resistenz-vermittelnde Acetyltransferase acetyliert das Puromycin. Das Acetyl-Puromycin kann nicht mehr an die Ribosomen binden und ist damit inaktiv.

Je nach Zelllinie wird eine andere Puromycin-Konzentration benötigt, um eine selektive Wirkung zu erzielen (Liang *et al.*, 2004; Iwaki & Umemura, 2011). Das Spektrum reicht in der Regel von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Um eine geeignete Puromycin-Konzentration für die CHO DP-12-Zelllinie zu ermitteln, wurde eine Parallelkultivierung mit drei unterschiedlichen Puromycin-Konzentrationen angesetzt. Für weitere Experimente sollte die Konzentration eingesetzt werden, welche die Zellen innerhalb von sieben Tagen töten kann. Die Kultivierung wurde in Kultivierungsröhrchen durchgeführt (Abschnitt 4.3.2). Das Gesamtvolumen betrug 10 mL, die Startzelldichte 5×10^5 Z/mL. Den Röhrchen wurde Puromycin in den Konzentrationen 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hinzugegeben. Über einen Zeitraum von etwa 14 Tagen wurden Proben im Cedex vermessen (Abschnitt 4.3.3), um den Verlauf der Lebendzelldichte und der Viabilität zu kontrollieren (Abbildung 5.1).

Nach 4 Tagen wurde das Medium der Kulturen getauscht, was sich in einer sprunghaften Änderung der Lebendzelldichte bemerkbar machte. Dazu wurden die Zellen bei 200 *g* 5 min abzentrifugiert und in frischem Medium mit entsprechender Puromycin-Konzentration resuspendiert. Da Puromycin, wie fast alle Antibiotika, hitzelabil ist, sollte diese Maßnahme den Selektionsdruck aufrecht erhalten.

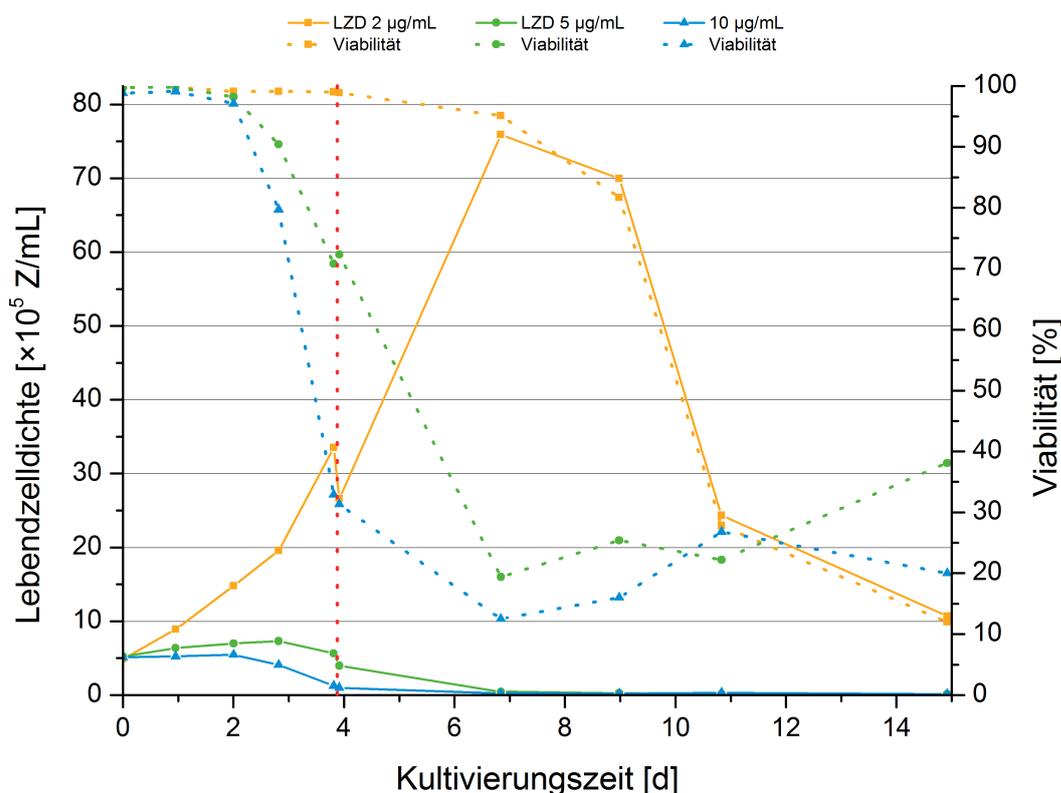


Abbildung 5.1: Puromycin *kill curve* zur Ermittlung einer geeigneten Selektionskonzentration. Dargestellt sind die Lebendzellichten und Viabilitäten dreier Ansätze mit 2 µg/mL, 5 µg/mL bzw. 10 µg/mL Puromycin. Die rote, gepunktete Linie zeigt einen Medienwechsel an.

Bei Verwendung von 2 µg/mL Puromycin verlief das Wachstum der CHO DP-12-Zellen entsprechend der Erwartung einer normalen Batch-Kultivierung (vgl. z. B. Abschnitt 5.2.5). Es zeigte sich keine vorzeitige Reduktion der Viabilität oder eine Stagnation im Wachstum. Im Vergleich dazu wiesen die Zellen, die mit 5 µg/mL bzw. 10 µg/mL Puromycin kultiviert wurden, deutliche Unterschiede auf. Beide Kulturen stellten ihr Wachstum nach Zugabe des Puromycins ein. Die Viabilitäten blieben bis Kultivierungstag 1 noch unverändert, doch sanken bereits an Tag 2 auf 90 % bzw. 80 %. Während bei 10 µg/mL Puromycin die viable Zelldichte nach 4 Tagen praktisch nicht mehr messbar war, konnten bei 5 µg/mL bis einschließlich Kultivierungstag 7 noch viable Zellen detektiert werden. Ab Tag 9 waren in beiden Kulturen nur noch vereinzelt lebende Zellen detektierbar. Dennoch wurde durch das Cedex ein Anstieg in der Viabilität gemessen. Eine Erklärung dafür ist, dass die bereits durch das Puromycin abgetöteten Zellen lysiert waren, so dass dadurch scheinbar die Viabilität der Kultur stieg. Aus diesem Grund sollte eine Selektion auch mindestens zwei Wochen

durchgeführt werden, damit sichergestellt ist, dass auch die Zellen abgetötet werden, die dem Puromycin länger standhalten können.

Für die spätere Selektion der stabilen Zellpools wurde eine Puromycin-Konzentration von 5 µg/mL eingesetzt. Damit konnten die nicht-resistenten Zellen effektiv innerhalb von sieben Tagen abgetötet werden. Da die doppelte Konzentration möglicherweise auch für resistente Zellen zu hoch ist, wurde sie in den folgenden Experimenten nicht verwendet. Damit der Selektionsdruck auch nach der eigentlichen Selektionsphase aufrecht erhalten werden konnte, wurden die stabilen Zellpools standardmäßig mit 5 µg/mL Puromycin kultiviert.

5.1.3 Erzeugung von stabilen pLVX-shRNA1-CHO DP-12-Zellen

Für eine korrekte Evaluierung von *knockdown*-Effekten ist ein Vergleich mit einer adäquaten Negativkontrolle unerlässlich. Weil für die Erzeugung der stabilen shRNA-exprimierenden Zellpools die lentivirale Transduktion gewählt wurde, musste auf diese Weise auch eine Negativkontrolle generiert werden. Da Lentiviren ihre Provirus-Genome in transkriptionell-aktive Bereiche integrieren (Ciuffi, 2008; Desfarges & Ciuffi, 2010; Ciuffi & Barr, 2011), kann eine Transduktion den Phänotyp der Zellen beeinflussen (Ciuffi, 2008; Simone & Saverino, 2009). Die Integration kann beispielsweise in Gene erfolgen, deren Inaktivierung eine Veränderung des Wachstums bewirkt. Fehlt der Vergleich mit einer Negativkontrolle, so kann nicht zwischen Effekten, die auf der Transduktion beruhen und Effekten, die durch die shRNA bzw. den *knockdown* des Zielgens hervorgerufen werden, unterschieden werden.

Zur Erzeugung der Negativkontrolle wurden daher Lentiviren generiert, deren Transfervektor das unveränderte pLVX-shRNA1-Plasmid war (Abschnitt 4.3.8). Mit den so hergestellten Viren wurden CHO DP-12-Zellen infiziert (Abschnitt 4.3.9). Anschließend wurden diese mit 5 µg/mL Puromycin selektioniert (Abschnitte 4.3.2 und 5.1.3). Der mit dem Cedex (Abschnitt 4.3.3) gemessenen Verlauf der Lebendzellichte sowie der Viabilität während der Selektion ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

Nach initialer Zugabe von Puromycin wuchsen die Zellen zunächst einen Tag unverändert weiter. Da die Zelldichte dann eine Verdünnung erforderte, wurden die Zellen unter Zugabe von neuem Puromycin passagiert (Abschnitt 4.3.2). Daraufhin setzte die Selektionsphase ein, die durch eine Abnahme der Viabilität von 99 % auf etwa 94 % gekennzeichnet war. Diese vergleichsweise geringe Reduktion der Viabilität (vgl. Abschnitt 5.2.2.3) lässt auf einen hohen Virustiter zum Zeitpunkt der Infektion schließen. Die Selektionsphase war nach ca. 12 Tagen abgeschlossen. Verglichen mit der Selektion anderer auf diese Weise erzeugten Zelllinien, verlief die hier beobachtete Selektionsphase kürzer (vgl. Abschnitt 5.2.2.3).

Wahrscheinlich war das auf den bereits erwähnten höheren Virustiter zum Zeitpunkt der Infektion zurückzuführen.

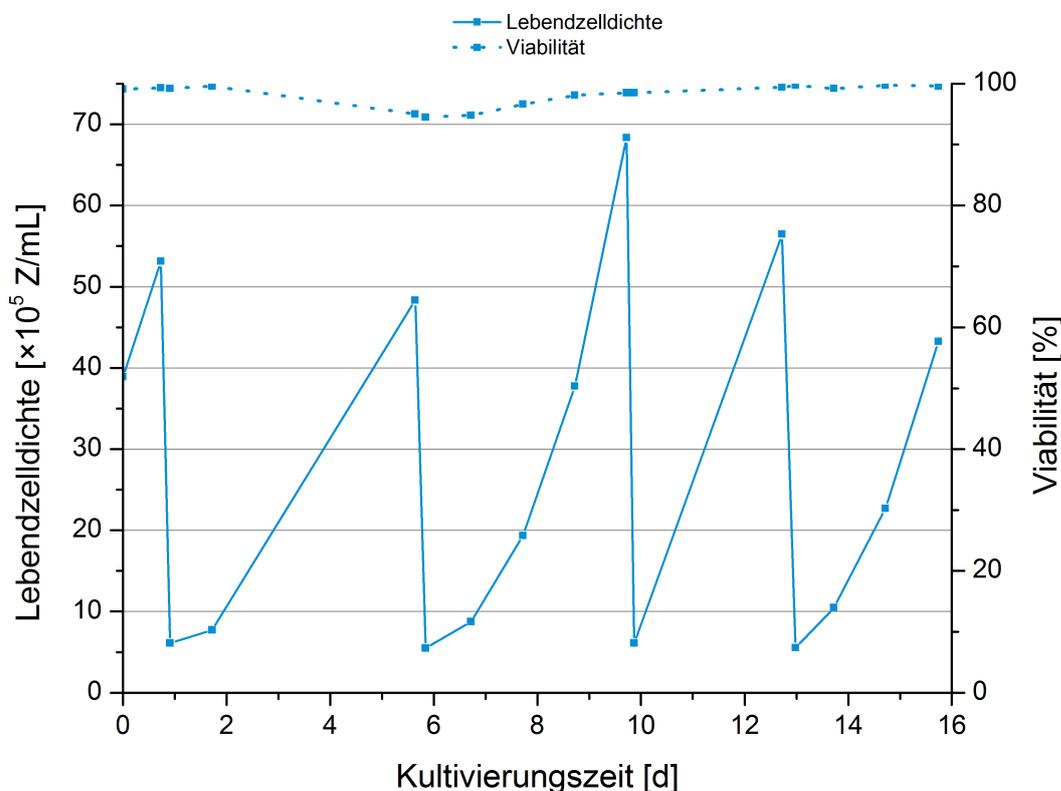


Abbildung 5.2: Selektionsverlauf der mit dem Leervektor pLVX-shRNA1-transduzierten CHO DP-12-Zellen. Dargestellt sind sowohl die Lebendzelldichte, als auch die Viabilität der Kultur im Verlauf von ca. 16 Tagen.

Da die selektierten Zellen keine nachweislich einheitlichen Integrationsloci und -häufigkeiten besaßen (Abschnitt 5.1.2), handelte es sich hierbei um einen Zellpool. Der generierte Zellpool diente, neben der Parentalzelllinie CHO DP-12, in den Batch und Fed-Batch Prozessen als zusätzliche Kontrolle (Abschnitte 5.2.5 und 5.2.6). Im Folgenden werden diese Zellen als pLVX-Zellpool oder Negativkontrolle bezeichnet.

5.1.4 Verifikation der Spezifität der für die qRT-PCR eingesetzten Primer

Damit die Ergebnisse einer qRT-PCR korrekt ausgewertet werden können, ist eine hohe Spezifität der eingesetzten Primer unerlässlich. Ist dies nicht gegeben, können während der Reaktion unspezifische Fragmente entstehen. Mittels Schmelzkurvenanalytik ist es möglich, unspezifische Reaktionen zu identifizieren (vgl. Abschnitt 4.2.13). Die Auswertung einer

qRT-PCR wird dadurch jedoch unmöglich, da das gemessene Fluoreszenzsignal verfälscht wurde. Daher ist es sinnvoll, die zu verwendenden Primer zuvor unter den gleichen Bedingungen zu testen, wie sie später in der qRT-PCR eingesetzt werden sollen.

Dazu wurde RNA von 5×10^6 CHO DP-12-Zellen isoliert (Abschnitt 4.2.11). Nach der Bestimmung der Konzentration und Reinheit (Abschnitt 4.2.4) wurde $1 \mu\text{g}$ der RNA in cDNA konvertiert (Abschnitt 4.2.12). Die cDNA diente als *template* für eine PCR, mit deren Hilfe die Spezifität der qRT-PCR-Primer getestet werden sollte. Für jedes zu testende Primerpaar wurde eine PCR-Reaktion angesetzt (Abschnitt 4.2.1), die im Thermocycler mit dem Programm der qRT-PCR durchgeführt wurde (Abschnitte 4.2.1.2 und 4.2.1.3). Anschließend wurden die PCR-Reaktionen in 2 %igen-Agarosegelen aufgetrennt (Abschnitt 4.2.7) und evaluiert.

Ein Beispiel der Ergebnisse einer PCR-Reaktion für die im späteren Verlauf der Arbeit verwendeten qRT-PCR-Primer ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Die Reaktion lieferte Bandengrößen, die den theoretisch berechneten entsprachen. Weiterhin konnten weder zusätzliche, unspezifische Banden, noch eine größere Menge Primer-Dimere nachgewiesen werden. Das ausgewählte Primerpaar konnte daher für die nachfolgenden qRT-PCR-Versuche verwendet werden.

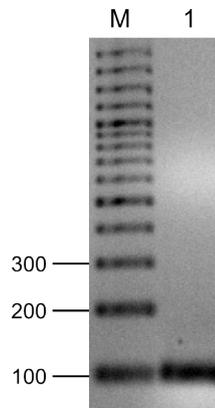


Abbildung 5.3: Beispiel einer PCR-Reaktion mit den getesteten qRT-PCR-Primern für den Nachweis der *Lgals1*-mRNA, aufgetragen in einem 2 %igen Agarosegel. M enthält den GenerulerTM 100 bp DNA-Marker. In (1) wurde die PCR-Reaktion aufgetragen, deren PCR-Amplifikat 100 bp groß sein sollte. Das erzeugte Fragment aus der Reaktion wies eine Größe von 100 bp auf und enthielt keine zusätzlichen, unspezifischen Banden. Die übrigen getesteten qRT-PCR-Primer erzeugten ebenfalls nur die entsprechende Amplifikatbande der untersuchten cDNA. Da die Gelbilder damit ähnlich zu dem hier abgebildeten Beispiel waren, wurde auf die Darstellung der übrigen Gele verzichtet.

5.2 RNAi-*knockdown* von Zielgenen für die Zelllinienentwicklung

Die folgenden Abschnitte beschreiben die Erzeugung von verschiedenen Zellpools, in denen die Transkripte unterschiedlicher Zielgene durch RNAi herunter reguliert worden sind. Zu den Zielgenen gehören *Set*, *Bad* und *Lgals1*. Zusätzlich wurden zwei weitere Zielgene aus dem μ Array-Experiment bearbeitet, *Ypel3* und *Phf3*. Die *knockdowns* sollten eine Steigerung der maximalen Lebendzellichte, die Erhöhung der Toleranz gegenüber apoptotischen Prozessen, bzw. die Modulation der Produktivität und letztlich damit des Produkttiters bewirken. Zunächst wird dazu die Erzeugung der einzelnen *knockdown*-Zellpools beschrieben. Anschließend erfolgt die gemeinsame Evaluation und Diskussion anhand von Batch- und Fed-Batch-Parallelkultivierungen.

5.2.1 *Knockdown* der *Set*-mRNA in CHO DP-12-Zellen

Die gezielte Reduktion des mRNA-Levels eines Gens mittels RNAi kann auf verschiedene Arten erreicht werden. Beispielsweise ist es möglich ein Gemisch von siRNA- oder shRNA-Sequenzen in die Zellen einzubringen. Die verschiedenen RNAi-Moleküle richten sich gegen unterschiedliche Bereiche der Ziel-mRNA. Bei einem solchen Ansatz kann die Sequenz, die einen *knockdown* vermittelt, nicht genauer bestimmt werden. Da im Rahmen dieser Arbeit stabil transduzierte Zellen mit reduzierter Zielgen-mRNA erzeugt werden sollten, war es erforderlich, eine spezifische und wirksame shRNA-Sequenz zu ermitteln. Diese sollte dann durch einen lentiviralen Vektor persistent in der Zelle exprimiert werden. Daher war vor der Erzeugung der stabilen Zellen ein transienter Test der Wirksamkeit verschiedener shRNA-Sequenzen gegen eine mRNA notwendig.

Dem SET-Protein wurde nach bisherigem Wissensstand zugeschrieben, dass es bei der Inhibierung der Histonacetylierung mitwirkt (Abschnitt 3.4.1). Die Acetylierung von Histonen führt wahrscheinlich zu einer veränderten Faltung des Nukleosoms. Dies wiederum soll die Bildung und Elongation einer mRNA durch die RNA-Polymerase während der Transkription erleichtern (Mizzen & Allis, 1998; Eberharter & Becker, 2002). Der *knockdown* eines Acetylierungsinhibitors sollte daher zu einer stärkeren Acetylierung der Histone führen, was letztlich zu einer höheren Gesamt-Transkription führen kann. Davon wären wahrscheinlich auch die Produktgene betroffen. Durch den *knockdown* könnte somit eine erhöhte Produktivität und, damit verbunden, ein erhöhter Produkttiter erreicht werden. Im Folgenden wird zunächst die Erstellung der shRNA-Sequenzen gegen die mRNA des SET-Proteins erläutert. Anschließend erfolgt die Beschreibung der Ergebnisse aus den transienten und persistenten

Transfektionen bzw. Transduktionen. Die Beurteilung der Effektivität des *knockdowns* von *Set* zur Steigerung der Produktivität von CHO DP-12-Zellen erfolgte durch Batch und Fed-Batch-Kultivierungen, die parallel mit weiteren genetisch modifizierten Zellen durchgeführt worden sind (Abschnitte 5.2.5 und 5.2.6).

5.2.1.1 Herstellung der lentiviralen shRNA-Expressionsvektoren gegen die *Set*-mRNA

Die Sequenzen der siRNAs zur Expression der shRNAs gegen *Set* sollten auf CHO-mRNA beruhen. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieses Experimentes bestand jedoch noch kein Zugriff auf Sequenzinformationen der CHO-Zellen (Becker *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurden Primer von der orthologen *M. musculus* Sequenz (*GenBank*-Nr.: NM_023871.3, August 2011) von *Set* zur Amplifikation des CHO-Transkriptes erstellt (s. Anhang, Tabelle A.2, Primer 15 und 16), damit dieses in einem nachfolgenden Schritt sequenziert werden konnte. Um das Fragment in einen Vektor klonieren zu können, wurde an das 5'-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle und an das 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle angefügt.

Zunächst wurde RNA aus CHO DP-12-Zellen isoliert (Abschnitt 4.2.11) und 1 µg davon in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 4.2.12). Mit der generierten cDNA als *template* wurde eine PCR (Abschnitt 4.2.1.1) mit einer *annealing*-Temperatur von 50 °C zur Amplifikation der *Set*-cDNA durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem 1 %igen-Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 4.2.7), die Amplifikatbande mit einem Skalpell ausgeschnitten und aufgereinigt (Abschnitt 4.2.8). Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und die entfernten DNA-Basen sowie die Enzyme abgetrennt (Abschnitt 4.2.9). Analog dazu wurde das pUC19-Plasmid mit *EcoRI* und *BamHI* unter Zugabe von FastAPTM geschnitten (Abschnitt 4.2.5) und der linearisierte Vektor in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 4.2.7). Die Vektorbande wurde ausgeschnitten und gereinigt (Abschnitt 4.2.8). Das geschnittene PCR-Amplifikat der CHO *Set*-cDNA und der linearisierte Vektor wurden ligiert (Abschnitt 4.2.6), transformiert (Abschnitt 4.1.3) und die Plasmide der Kolonien am nächsten Tag mittels Kolonie-PCR (Abschnitt 4.2.1.2) auf Vorhandensein des Inserts überprüft. Dazu wurden die Primer 33 und 34 (Tabelle A.2) verwendet. Nach erfolgreicher Identifikation von fünf Kolonien, deren Plasmide das Insert integriert hatten, wurde von diesen Kolonien eine Übernachtskultur für eine DNA-Mini-Präparation (Abschnitte 4.1.1 und 4.2.10) angesetzt und die Plasmide sequenziert (Abschnitt 4.2.17).

Auf Ebene der mRNA bestand zwischen dem murinen- und dem CHO-*Set* eine Sequenzidentität von 93,8 %. 41 der Veränderungen in der kodierenden mRNA-Sequenz waren Transitionen, 13 waren Transversionen. Auf der Proteinebene, berechnet aus der künstlichen

Translation der mRNA, resultierten hieraus 12 veränderte Aminosäuren. Dies entsprach einer Sequenzidentität von etwa 95,9 %. SET ist damit ein stark konserviertes Protein im Vergleich zwischen der murinen und der CHO-Sequenz.

Basierend auf der CHO-cDNA-Sequenz wurden mit zwei verschiedenen bioinformatischen Programmen je zwei mögliche siRNA-Sequenzen identifiziert. Die siRNA-Sequenzen *Set.1* und *Set.2* wurden mit dem *siRNA Selection Program* ermittelt (Yuan *et al.*, 2004), *Set.3* und *Set.4* mit dem *Ambion siRNA Finder* (Ambion, 2010). Zusätzlich wurde eine *scrambled control* auf der Grundlage von *Set.1* generiert. Eine *scrambled control* enthält die gleichen Basen einer siRNA-Sequenz, jedoch in zufälliger Reihenfolge. Damit sollte sie keine Komplementarität zu einer existierenden mRNA besitzen, was durch einen BLAST verifiziert werden kann (Abschnitt 4.2.18). Die *scrambled control* sollte zeigen, ob ein Effekt einer beliebigen shRNA auf die Transkriptlevel der untersuchten Gene vorlag. Die benutzten bioinformatischen Programme erleichtern die Auswahl von möglichen shRNA-Sequenzen, da sie automatisch verschiedene Kriterien überprüfen, die eine funktionierende siRNA bzw. shRNA besitzen sollte (vgl. Abschnitt 3.2.3). Dennoch ist ein empirischer Test der so ermittelten shRNA-Sequenzen erforderlich, da eine shRNA, auch trotz Erfüllung sämtlicher Kriterien, möglicherweise keinen *knockdown* herbeiführen kann.

Die siRNA-Sequenzen wurden mittels BLAST mit der *M. musculus* cDNA-Datenbank verglichen (Abschnitt 4.2.18). Auf diese Weise wurde bestätigt, dass die gewählten siRNAs 14 Basen oder weniger (≤ 70 %) Übereinstimmung mit anderen cDNA-Sequenzen außer der *Set*-cDNA besaßen. Dieser Grad an Sequenzidentität mit anderen mRNAs wurde im Rahmen dieser Arbeit als unkritisch definiert, da bereits gezeigt werden konnte, dass die *silencing*-Effektivität von der Länge der siRNA-Sequenz abhängig ist und bei 21 Nukleotiden am höchsten ist (Elbashir *et al.*, 2001c). Daraus wurde gefolgert, dass das *silencing* durch die kürzeren, bindenden siRNA-Abschnitte so gering war, dass es vernachlässigt werden konnte. Die identifizierten siRNA-Sequenzen wurden manuell in *top*- und *bottom*-Stränge zur Integration in den pLVX-shRNA1-Zielvektor konvertiert. Es wurde das klassische *loop*-Motiv 5'-TTCAAGAGA-3' verwendet (Brummelkamp *et al.*, 2002). Die so generierten *top*- und *bottom*-Stränge wurden bei einem Oligonukleotid-Hersteller synthetisiert und anschließend hybridisiert und verdünnt (Abschnitt 4.2.2).

Alle shRNA-Sequenzen wurden direkt in den lentiviralen Transfervektor pLVX-shRNA1 kloniert. Dieser konnte sowohl transient als auch für die stabile Transduktion eingesetzt werden. Die Nutzung des Transfervektors für transiente Transfektionen eliminierte die Notwendigkeit weiterer Subklonierungen in andere Vektoren. Diese Strategie kann jedoch nur durchgeführt werden, wenn eine hohe Transfektionseffizienz für die transiente Analyse besteht. Dabei ist insbesondere die Größe des Vektors (pLVX-shRNA1 ca. 7,8 kb) ein entschei-

denes Kriterium für den Erfolg der Transfektion. Mit zunehmender Größe des Plasmids nimmt die Transfektionseffizienz ab (Kreiss *et al.*, 1999; Maucksch *et al.*, 2009). Bei der Nukleofektion kann durch Anpassung der eingesetzten Plasmidmenge die Transfektionseffizienz in etwa konstant gehalten werden. Plasmide bis ca. 12 kb Größe sind daher skalierbar zum Test-Plasmid pmaxGFP[®] einsetzbar (persönliche Kommunikation mit Fa. Lonza).

Der lentivirale Transfervektor wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und aufgereinigt (Abschnitte 4.2.5 und 4.2.9). Im Anschluss erfolgte in 5 Parallelreaktionen die Ligation des linearisierten Vektors mit je einem hybridisierten Oligonukleotid-Doppelstrang (Abschnitt 4.2.6). Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde hitzeschocktransformiert und die Bakterien über Nacht auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte inkubiert (Abschnitte 4.1.3 und 4.1.1). Am nächsten Tag wurden mit der Kolonie-PCR Kolonien identifiziert, deren Plasmide ein integriertes Insert besaßen (Abschnitt 4.2.1.2). Bei einer Ligation kann es in einigen Fällen zu Religationen, also einer Rezirkularisierung des Ursprungsvektors ohne Integration des Inserts, kommen. Dies kann auch bei nicht-komplementären *sticky-ends* durch die Ligase katalysiert werden. Unvollständig geschnittener Vektor kann ebenfalls ligiert werden. Da diese beiden Plasmid-Spezies durch die Transformation gleichermaßen in die Bakterien eingebracht werden, ist ein *screening* der Kolonien auf das Vorhandensein eines Inserts notwendig. Dazu wurden die Primer so erstellt, dass sie in den angrenzenden Vektorbereichen um das Insert herum hybridisierten (vgl. Tabelle A.2). Für einen rezirkulierten oder unvollständig geschnittenen Vektor entstand ein etwa 231 bp großes Amplifikat und für ein Plasmid mit integrierter Oligonukleotid-Sequenz ein Fragment mit 273 bp. Eine exemplarische Darstellung einer Kolonie-PCR dieser Art ist im Anhang, Abschnitt A.1 zu finden.

Von je einem der bakteriellen Klone mit gewünschtem Plasmid je shRNA-Sequenz bzw. *scrambled control* wurde eine Übernachtskultur angelegt (Abschnitt 4.1.1). Anschließend wurden aus diesen die Plasmide durch eine DNA-Mini-Präparation isoliert (Abschnitt 4.2.10). Durch Sequenzierung (Abschnitt 4.2.17) konnten für jede shRNA-Sequenz und die *scrambled control* Plasmide mit korrektem Insert identifiziert werden. Anschließend wurde für die spätere transiente Nukleofektion und die Generierung der Lentiviren eine DNA-Maxipräparation von je einem korrekten Plasmid der shRNA-Sequenzen und der *scrambled control* durchgeführt (Abschnitt 4.2.10).

5.2.1.2 Evaluation der *knockdown*-Effizienz verschiedener shRNA-Sequenzen gegen *Set*

Von den zuvor erzeugten shRNA-Expressionsvektoren (Abschnitt 5.2.1.1) wurden je 6 μg in CHO DP-12-Zellen nukleofiziert (Abschnitt 4.3.7) und die transfizierten Zellen in den *wells* einer 12-*well*-Zellkulturplatte kultiviert (Abschnitt 4.3.2). Nach 24-stündiger Inkubation wurde die RNA von je 2×10^6 unbehandelten CHO DP-12-Zellen und der transfizierten Zellen isoliert (Abschnitt 4.2.11). Nach der Bestimmung der Konzentration und Reinheit wurde 1 μg der RNA in cDNA konvertiert (Abschnitte 4.2.4 und 4.2.12). Die qRT-PCR wurde mit den CHO DP-12-Zellen als Kalibrator durchgeführt. Normalisiert wurde gegen drei *housekeeping*-Gene (Abschnitt 4.2.13). Das Ergebnis der qRT-PCR ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

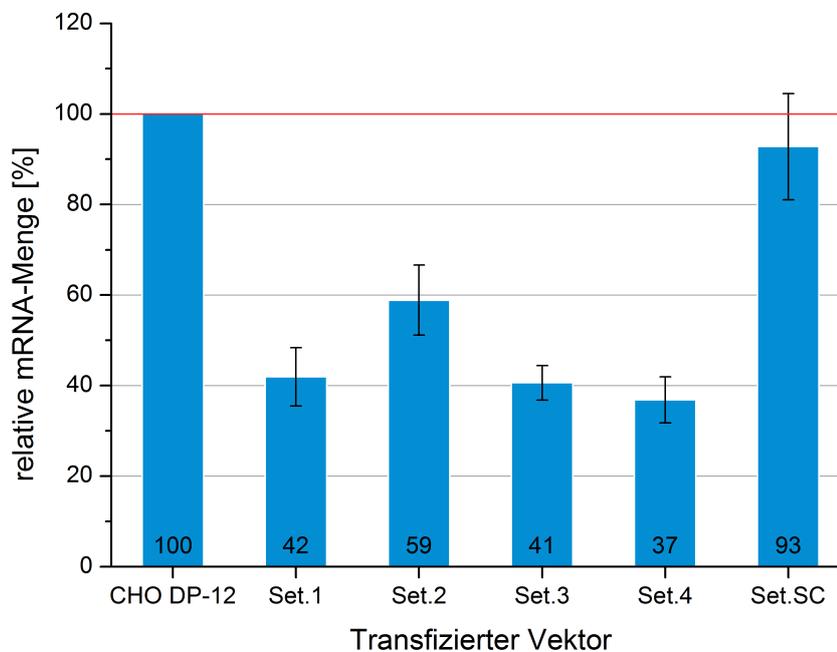


Abbildung 5.4: Auswertung der qRT-PCR der mit den verschiedenen *Set*-shRNA-Sequenzen transfizierten CHO DP12-Zellen. Normalisiert wurde gegen 3 *housekeeping*-Gene und die Parentalzelllinie diente als Kalibrator. Alle shRNA-Sequenzen waren in der Lage, die mRNA-Menge von *Set* zu verringern. Den stärksten *knockdown* mit ca. 37 % verbleibender mRNA-Menge erreichte *Set.4*. Die Abkürzung „SC“ steht für die *scrambled control*. Die Fehlerbalken in diesem und den folgenden Diagrammen gleichen Typs berechnen sich aus der Standardabweichung der Triplikate.

Alle vier getesteten shRNA-Sequenzen waren in der Lage, die *Set*-mRNA-Menge zu reduzieren. Während *Set.2* die mRNA um $41\% \pm 7,8\%$ reduzieren konnte, war der *knockdown* der übrigen shRNAs stärker. *Set.1* und *Set.3* reduzierten die mRNA um $58\% \pm 6,5\%$ bzw. $59\% \pm 3,8\%$, *Set.4* um $63\% \pm 5,1\%$. Die *scrambled control* hatte, unter Einbeziehung des Fehlers in den Messwert, keine Auswirkungen auf die mRNA-Menge von *Set*. Für die Erzeugung der stabilen *Set-knockdown*-Zellen wurde daher shRNA-Sequenz 4 verwendet, da sie die stärkste *silencing*-Wirkung im Vergleich der vier getesteten Sequenzen zeigte. Die Reduktion der *Set*-mRNA um 63% entspricht dabei einem *fold change* von $-2,7$. Dieser Wert stellt für die Messung einer RNAi-vermittelten Reduktion einer mRNA in einem Zellpool eine realistische Größe dar. Wong *et al.* (2006) haben für siRNA-vermittelte *knockdowns* der mRNAs von *Alg-2* und *Requiem* *fold changes* von $-2,3 \pm 0,1$ bzw. $-3,4 \pm 0,4$ messen können (Wong *et al.*, 2006). Das entspricht im Vergleich zu den Referenzzellen einer mRNA-Reduktion um etwa 57% bzw. etwa 71% . Imai-Nishiya *et al.* (2007) geben für den *knockdown* der *Fut8*-mRNA eine Reduktion der mRNA von über 90% an. Bei dem Vergleich dieser Werte ist allerdings zu beachten, dass sowohl Wong *et al.*, als auch Imai-Nishiya *et al.* vor der qRT-PCR-Messung eine Selektion mittels eines Antibiotikums durchgeführt haben. Auf diese Weise werden nicht- oder nur geringtransfizierte Zellen aus dem *pool* entfernt. Sie verfälschen letztlich das *knockdown*-Ergebnis, da ihre Ziel-mRNA im Vergleich zur Referenz höchstwahrscheinlich unverändert ist. Dadurch wird ein geringerer *knockdown* gemessen, als tatsächlich vorliegt. Die in dem nicht-selektierten Zellpool gemessenen mRNA-Reduktionen von *Set* entsprachen daher üblichen Werten.

5.2.1.3 Persistenter *knockdown* von *Set* durch lentivirale Transduktion eines shRNA-exprimierenden Plasmids

Der stabile *knockdown* von *Set* erfolgte durch eine Infektion der CHO DP-12-Parentalzelllinie mit Lentiviren und anschließender Puromycin-Selektion. Dazu wurde der lentivirale Transfektor mit der shRNA-Sequenz *Set.4* verwendet, welcher im transienten Test (Abschnitt 5.2.1.2) eine Reduktion der *Set*-mRNA um 63% bewirkte. Nach der Generierung der Lentiviren wurden CHO DP-12-Zellen mit diesen infiziert (Abschnitte 4.3.8 und 4.3.9). Anschließend erfolgte die Selektion mit Puromycin (vgl. Abschnitt 5.1.2). Dazu wurde zu den transduzierten Zellen $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin gegeben. Der Zustand der Kultur bezüglich Wachstum und Viabilität wurde regelmäßig durch Cedex-Messungen kontrolliert (Abschnitt 4.3.3). Die Entwicklung dieser Parameter während der Selektionsphase ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

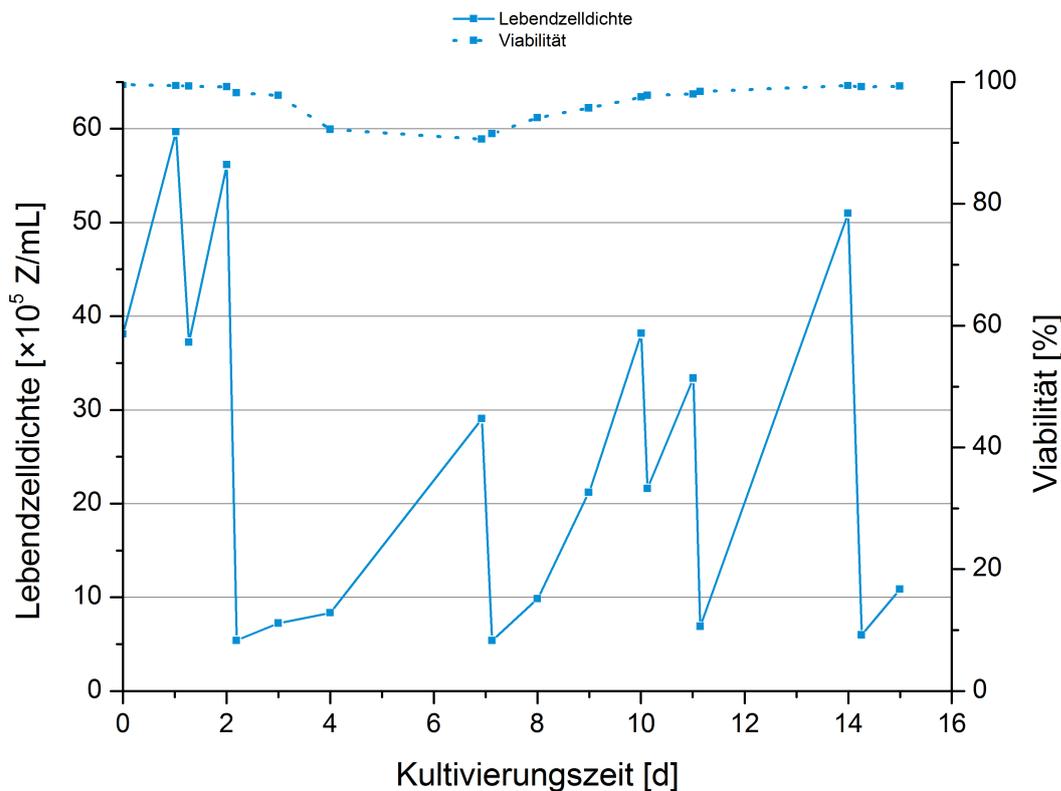


Abbildung 5.5: Selektionsverlauf der mit dem anti-*Set*-shRNA-Vektor transduzierten CHO DP-12-Zellen. Die Kulturen wurden während der Selektionsphase an Tag 1 und 10 je 1:2 verdünnt, woraus die sprunghaften Änderungen der Zelldichte resultieren. An den Tagen 2, 7, 11 und 14 wurden die Zellen normal passagiert (Abschnitt 4.3.2).

Die Selektionsphase schloss sich direkt an die Infektion der Parentalzelle an. Die Zugabe von Puromycin wirkte sich nicht sofort auf die Viabilität oder das Zellwachstum aus, so dass sich die Lebendzellichte von $38,1 \times 10^5$ Z/mL an Tag 0 auf $59,7 \times 10^5$ Z/mL an Tag 1 erhöhte. Die Kultur wurde unter Beibehaltung des Selektionsdruckes 1:2 auf $37,2 \times 10^5$ Z/mL verdünnt. An Tag 2 schien sich das Puromycin noch immer nicht auf die Wachstumsgeschwindigkeit oder die Viabilität auszuwirken. Aus diesem Grund wurde die Kultur auf eine Zelldichte von $5,4 \times 10^5$ Z/mL verdünnt. Nach dieser Verdünnung konnten die Auswirkungen der Selektion mittels der Cedex-Messungen nachverfolgt werden. Die Viabilität erreichte an Tag 6,9 mit etwa 91 % den niedrigsten Wert während der Selektionsphase. In dieser Zeit war auch die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur reduziert. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ lag zwischen Tag 3 und 7 bei $0,14 \text{ d}^{-1}$ bis $0,43 \text{ d}^{-1}$ (Abschnitt 4.6.1). Nach der Selektionsphase erhöhte sich μ wieder auf Werte um $0,7 \text{ d}^{-1}$. Auch die Viabilität erhöhte

sich wieder auf das Niveau zu Beginn der Selektion von über 99 %. Der erzeugte Zellpool wird im Folgenden als *Set-knockdown*-Zellpool (*Set-kd*) bezeichnet.

Nach der Selektion der Puromycin-resistenten Zellen sollte die Effizienz des *knockdowns* durch Messung der verbliebenen *Set*-mRNA-Menge in den transduzierten Zellen bestimmt werden. Dazu wurde die RNA aus CHO DP-12-Zellen, den transduzierten *Set-kd*-, sowie aus pLVX-Zellen isoliert (Abschnitte 4.2.11 und 5.1.3). Nach Bestimmung der Reinheit und Konzentration wurde jeweils 1 µg der verschiedenen RNAs in cDNA umgeschrieben (Abschnitte 4.2.4 und 4.2.12). Die cDNA wurde als Ausgangsmaterial für eine qRT-PCR eingesetzt, in der die CHO DP-12-Zelllinie als Kalibrator diente. Zur Normalisierung wurden drei *housekeeping*-Gene verwendet (Abschnitt 4.2.13).

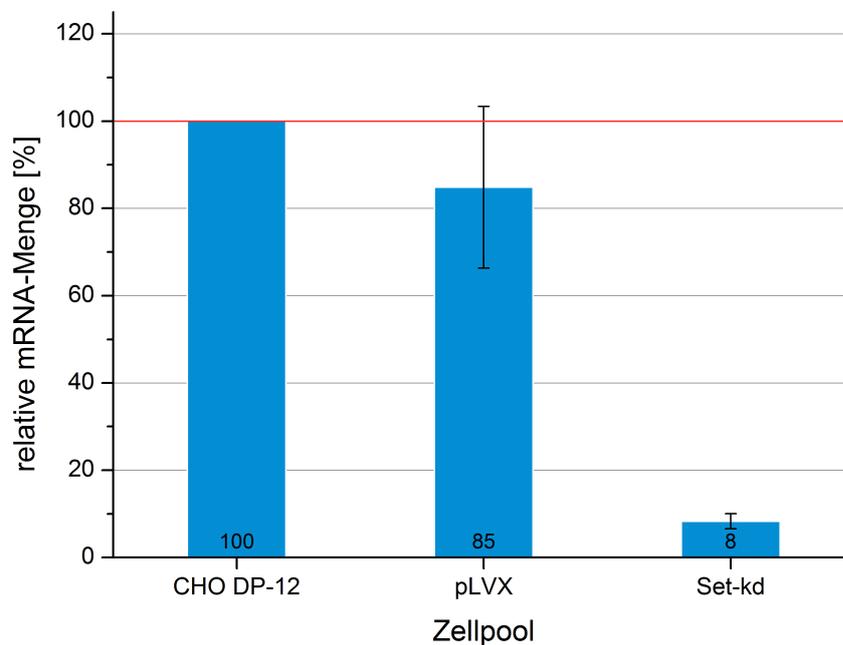


Abbildung 5.6: Quantitative *real-time*-PCR der *Set*-mRNA von den *Set-kd*-Zellen und des pLVX-Zellpools im Vergleich zur nativen *Set*-mRNA-Menge der CHO DP-12-Zelllinie. Die *Set*-mRNA-Menge konnte in den *Set-kd*-Zellen bis auf etwa 8 % reduziert werden.

Die transduzierte shRNA war in der Lage, die *Set*-mRNA effektiv herunter zu regulieren (Abbildung 5.6). In Bezug auf die Parentalzelle konnte die mRNA-Menge auf 8,3 % ± 1,7 % reduziert werden. Dieser Wert war vergleichbar mit den erreichten *silencing*-Effizienzen in anderen stabil transduzierten Zellen (vgl. Abschnitte 5.2.2.3 und 5.2.3.3). Eine Reduktion der mRNA auf 8,3 % entspricht einem *fold change* von -12. Damit erreichte der *Set-kd*-Zellpool

eine stärkere mRNA-Reduktion als der bereits erwähnte *Alg-2*- und *Requiem*-Zellpool (Wong *et al.*, 2006). Zudem übertraf der erreichte *fold change* auch die mRNA-Reduktion einer monoklonalen *Requiem-kd*-Zelllinie, die eine Reduktion der mRNA auf etwa 24 % verbleibende mRNA-Menge aufwies (Wong *et al.*, 2006). In den ebenfalls bereits diskutierten *Fut8-kd*-Zellen konnte eine mRNA-Reduktion des Zielgens von mehr als 90 % gemessen werden (Imai-Nishiya *et al.*, 2007). Die mRNA-Reduktion der erzeugten *Set-kd*-Zellen liegt mit 92 % daher in einer realistischen Größenordnung.

Die Leervektor-Transduktion wirkte sich ebenfalls auf das Level der *Set*-mRNA aus. Unter Einbeziehung des Messfehlers, könnte der tatsächliche Wert zwar nahe an den 100 % *Set*-mRNA der Parentalzelle liegen, in der vorliegenden Messung jedoch ergab der Mittelwert der Triplikate eine Reduktion der mRNA-Menge auf $84,84\% \pm 18,5\%$ verglichen mit der Ausgangszelllinie. Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit einer Negativkontrolle. Die Transduktion des leeren Vektors hatte die Zelle so weit verändert, dass z. B. die *Set*-mRNA anders transkribiert wurde als in der Parentalzelllinie. Dies kann je nach untersuchtem Gen unterschiedlich stark ausfallen und hängt von der Integration des Provirus-Genoms ab. Dennoch konnte erfolgreich ein *Set-kd*-Zellpool erzeugt werden, in dem die Reduktion der *Set*-mRNA nachgewiesen werden und der für die Beurteilung der Eignung eines *Set-knockdowns* für die ZLE genutzt werden konnte. Die Charakterisierung der Auswirkung des *Set-knockdowns* erfolgte durch Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen (Abschnitte 5.2.5 und 5.2.6).

5.2.2 Knockdown der *Bad*-mRNA in CHO DP-12-Zellen

Das folgende Kapitel beschreibt die Ergebnisse des transienten und persistenten *knockdowns* von *Bad*. Die Reduktion der *Bad*-mRNA sollte den modifizierten Zellen eine verbesserte Wachstumscharakteristik verleihen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der *knockdown* von pro-apoptotischen Genen zu einem verlängerten Wachstum auch unter Substratlimitierung führen kann (Wong *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2007). Das BAD-Protein gehört ebenfalls zu den pro-apoptotischen Genen, da es Apoptose-inhibierende Proteine wie Bcl-XL inaktivieren kann (Abschnitt 3.4.2). Daher sollte durch einen *knockdown* versucht werden, die modifizierten Zellen widerstandsfähiger gegen apoptotische Prozesse zu machen.

5.2.2.1 Herstellung der lentiviralen shRNA-Expressionsvektoren gegen die *Bad*-mRNA

Die siRNA- bzw. shRNA-Sequenzen gegen *Bad* basierten auf der orthologen cDNA-Sequenz der Maus (*M. musculus*, GenBank-Nr.: NM_007522.2, Juli 2011). Mit dem *RNAi Target*

Sequence Selector Tool (Clontech, 2012b) wurden drei siRNA-geeignete Sequenzen identifiziert (*Bad.1–Bad.3*). Basierend auf *Bad.3* wurde eine *scrambled control* erstellt. Mittels BLAST wurde bestätigt, dass die ausgewählten siRNAs nur mit der *M. musculus Bad*-cDNA übereinstimmen bzw. die Komplementarität mit anderen *M. musculus* cDNAs unter 70 % (≤ 14 Basen) lag (Abschnitt 4.2.18). Die Sequenzen wurden mit Hilfe des *shRNA Sequence Designers* (Clontech, 2012a) in *top*- und *bottom*-Stränge konvertiert und diese von einem Oligonukleotid-Hersteller synthetisiert. Auf die Einführung einer *MluI*-Restriktionsschnittstelle für eine Kontrollspaltung wurde verzichtet. Es wurde die Standard-*loop*-Sequenz 5'-TTCAAGAGA-3' verwendet (Brummelkamp *et al.*, 2002). Die Oligonukleotide sind so erstellt worden (Abschnitt 4.2.3), dass die bei der Hybridisierung entstehenden Überhänge zu Schnittstellen von *EcoRI* und *BamHI* kompatibel sind. Anschließend wurden die zusammengehörigen *top*- und *bottom*-Stränge hybridisiert und verdünnt (Abschnitt 4.2.2). Der lentivirale Transfervektor pLVX-shRNA1 wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* linearisiert und aufgereinigt (Abschnitte 4.2.5 und 4.2.9). Die hybridisierten Oligonukleotid-Stränge wurden dann in den linearisierten pLVX-shRNA1-Vektor ligiert und die transformierten Bakterien nach einer Hitzeschocktransformation auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen (Abschnitte 4.2.6, 4.1.3 und 4.1.1). Durch eine Kolonie-PCR konnten Klone identifiziert werden, deren Plasmide eine integrierte shRNA-Sequenz besaßen (Abschnitt 4.2.1.2). Eine Sequenzierung dieser Plasmide bestätigte die korrekte Abfolge und Identität der shRNA-Sequenz (Abschnitt 4.2.17). Von den Plasmiden wurden DNA-Maxi-Präparationen für die nachfolgenden transienten und stabilen Transfektionen bzw. Transduktionen angefertigt (Abschnitt 4.2.10).

5.2.2.2 Transienter *knockdown* von *Bad* zur Beurteilung der *silencing*-Effizienz der shRNAs

Die im vorigen Schritt erzeugten shRNA-Expressionsvektoren gegen die mRNA von *Bad* wurden zu je 6 μg in CHO DP-12-Zellen transfiziert (Abschnitt 4.3.7). Zusätzlich wurden CHO DP-12-Zellen ohne Zugabe eines Plasmids transfiziert. Die Zellen wurden in die *wells* einer 12-*well*-Kulturplatte überführt und in 2 mL Kulturmedium für 24 h inkubiert (Abschnitt 4.3.2). Von den transfizierten Zellen wurde die RNA isoliert und ihre Konzentration und Reinheit bestimmt (Abschnitte 4.2.11 und 4.2.4). Je 1 μg RNA wurde in cDNA konvertiert und diente als *template* für die qRT-PCR (Abschnitte 4.2.11 und 4.2.13). Die Normalisierung erfolgte gegen drei *housekeeping*-Gene und die CHO DP-12-Zelle wurden als Kalibrator genutzt. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind in Abbildung 5.7 dargestellt.

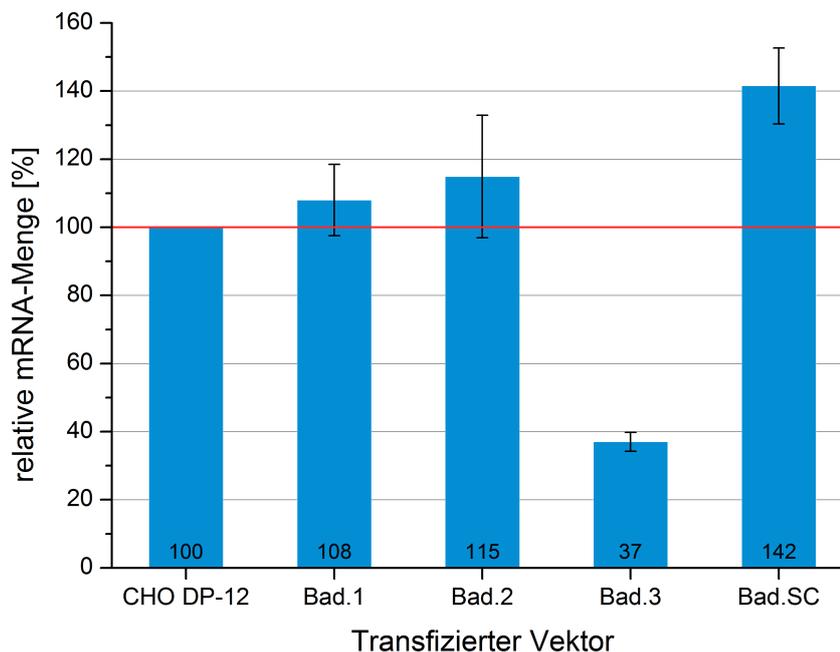


Abbildung 5.7: Evaluation der qRT-PCR mit den transient transfizierten *Bad*-shRNA-Vektoren. Während alle Sequenzen inklusive der *scrambled control* („SC“) eine erhöhte *Bad*-mRNA-Menge aufwiesen, konnte *Bad.3* das Transkriptlevel auf etwa 37 % im Vergleich zur CHO DP12-Zelle reduzieren.

Die einzige shRNA-Sequenz, welche einen *knockdown* von *Bad* herbeiführte, war *Bad.3*. Sie war in der Lage, die *Bad*-mRNA um $63 \% \pm 2,8 \%$ zu reduzieren. *Bad.3* wurde daher für die Generierung der Lentiviren zur stabilen Transduktion verwendet (Abschnitt 5.2.2.3). Die mit den shRNA-Expressionsvektoren *Bad.1* und *Bad.2* transfizierten Zellen zeigten mit $108 \% \pm 10,5 \%$ bzw. $115 \% \pm 17,8 \%$ eine leicht erhöhte mRNA-Menge des Zielgens. Unter Berücksichtigung des Fehlerbereichs für den dargestellten Mittelwert dieser mRNAs lag das tatsächliche mRNA-Level jedoch nah an den ursprünglichen 100 % des *Bad*-Transkriptniveaus. Daher konnte vermutet werden, dass die shRNA-Sequenzen *Bad.1* und *Bad.2* keine Wirkung auf die *Bad*-mRNA hatten. Ungewöhnlich war die Erhöhung des *Bad*-Transkriptlevels bei Behandlung mit der *scrambled control*. Es konnte eine Steigerung der mRNA-Menge um $41,5 \% \pm 11,1 \%$ gemessen werden. Auch unter Einbeziehung der Fehlertoleranz dieser Messungen war dieser Anstieg mit einer Messungenauigkeit nicht zu erklären. Eine solche Erhöhung der mRNA sollte durch eine unspezifische shRNA nicht ausgelöst werden. Die Ursache dafür könnte in der Funktion des herunter zu regulierenden Gens liegen. *Bad* ist ein Gen bzw. ein Protein, das in der Apoptose-Kaskade mitwirkt (Abschnitt 3.4.2). Die Transfektion, so schonend sie auch sein mag, löste dennoch Stress in den Zellen aus, der

unter Umständen die Apoptose-Kaskade aktivierte. Weiterhin wurden die Zellen auch durch das Einbringen von Plasmid-DNA unter Stress gesetzt, was ebenfalls zu Apoptose führen könnte. Daher wäre an dieser Stelle auch eine Leervektor-Transfektion sinnvoll gewesen. Wenn dort das *Bad*-mRNA-Level im Vergleich zur Parentalzelle ebenfalls erhöht gewesen wäre, wäre dies ein Hinweis auf Stressreaktionen in den Zellen, die möglicherweise eine Steigerung der Transkription der pro-apoptotischen Gene auslöste.

Weiterhin könnten auch *off-target*-Effekte eine Veränderung der zellulären *Bad*-Transkription ausgelöst haben (vgl. Abschnitt 3.2.3). Zusammengenommen könnte dies bedeuten, dass die Sequenzen *Bad.1* und *Bad.2* die *Bad*-mRNA ebenfalls herunter regulieren konnten, allerdings deutlich weniger effizient als *Bad.3*. Daher wären die dort gemessenen mRNA-Mengen geringer, als die in der *scrambled control*, welche das *Bad*-mRNA-Level nicht beeinflussen konnte.

5.2.2.3 Etablierung eines stabilen anti-*Bad*-shRNA-exprimierenden CHO DP-12-Zellpools

Unter Verwendung der zuvor ermittelten, funktionsfähigen shRNA gegen *Bad* wurden Lentiviren generiert (Abschnitt 4.3.8). Mit den Lentiviren wurden CHO DP-12 Zellen infiziert und anschließend, nach einer Passagierung auf 10×10^5 Z/mL, mit 5 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin selektiert (Abschnitte 4.3.9 und 4.3.2). Die Entwicklung der Lebendzellichte und der Viabilität während der Selektion wurde mit dem Cedex verfolgt (Abschnitt 4.3.3) und ist in Abbildung 5.8 dargestellt.

Bei initialer Zugabe des Puromycins schien das Antibiotikum in den ersten 2 Kultivierungstagen zunächst keinen Effekt zu haben. Diese Beobachtung konnte auch bei anderen Selektionen mit Puromycin gemacht werden (vgl. Abschnitt 5.2.1.3). Erst nach einer weiteren Passage der Zellen (Abschnitt 4.3.2) reduzierte sich die spezifische Wachstumsrate μ und die Viabilität der Zellen sank. Ein Vergleich mit der Selektion von *Set*-shRNA-exprimierenden CHO-Zellen (Abschnitt 5.2.1.3) zeigt, dass die Selektion im Fall der *Bad*-shRNA-exprimierenden Zellen stärker war. Während die Viabilität bei der Selektion der *Set-kd*-Zellen um etwa 9 % sank, sank sie bei denen der *Bad-kd*-Zellen um 39 %. Auch der Rückgang der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von anfänglich $0,56 \text{ d}^{-1}$ an Tag 1,7 auf $0,03 \text{ d}^{-1}$ an Tag 6,7 war ein Beleg für die Selektion. Der sprunghafte Anstieg in der Viabilität an Tag 6,7 erklärt sich durch einen Medienwechsel. Da Puromycin temperatursensitiv ist, wurden die Zellen an dem Tag abzentrifugiert und in frischem Medium, supplementiert mit 5 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin, neu aufgenommen. Ab Tag 7,7 begannen die Viabilität und die Lebendzellichte wieder anzusteigen. Demzufolge waren alle nicht-resistenten Zellen abgetötet

worden bzw. das Wachstum der resistenten Zellen genügte, um die Änderung des Wachstumsverhaltens der Kultur hervorzurufen. Auch die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit erhöhte sich wieder auf $0,54 \text{ d}^{-1}$ an Tag 8,7. Nach etwa 14 Tagen war die Selektion abgeschlossen und die Zellen wuchsen erneut bei hoher Viabilität mit Werten um 97 %. Der erzeugte Zellpool wird im Folgenden als *Bad-knockdown* (*Bad-kd*)-Zellpool bezeichnet.

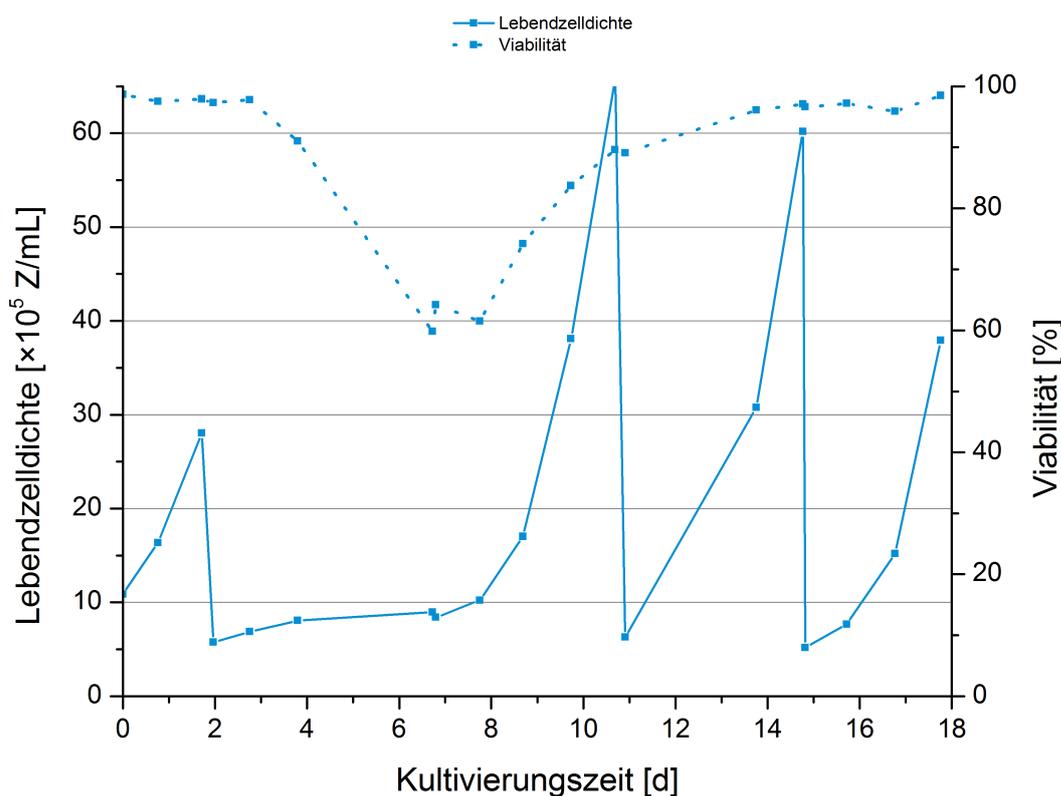


Abbildung 5.8: Verlauf der Lebendzelldichte und der Viabilität während der Selektion der *Bad-kd*-Zellen mit Puromycin. Die Selektion wirkte sich im Vergleich zu anderen Selektionen deutlicher aus, was in einem stärkeren Rückgang in der Viabilität auf ca. 60 % zu sehen ist (vgl. z. B. Abbildung 5.5).

Generell ist ein Selektionsverlauf, wie bei der Selektion der *Bad-kd*-Zellen, mit deutlichem Einbruch von Viabilität und Stagnation des Wachstums nicht ungewöhnlich. Die Ausprägung des Verlusts an viablen Zellen ist abhängig vom Virustiter zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen. Bei einer stärkeren Selektion sind sowohl weniger Zellen insgesamt, als auch weniger Zellen mehrfach infiziert worden (Woods *et al.*, 2003). Die Generierung der Lentiviren zur Etablierung der *Lgals1-knockdown*-Zellen (Abschnitt 5.2.3.3) und die Generierung der Lentiviren zum *knockdown* von *Bad* wurden parallel durchgeführt, ebenso wie die Infekti-

on und die Selektion. Die Effekte der Selektion der *Lgals1-knockdown*-Zellen waren weniger stark sichtbar im Vergleich zur *Bad-kd*-Selektion. Das bedeutet, dass trotz gleicher Ausgangsbedingungen mehr *Lgals1*-shRNA-exprimierende als *Bad*-shRNA-exprimierende Viren produziert wurden. Die Produktion der Lentiviren unterliegt damit anscheinend deutlichen Schwankungen. Einen immer gleichen Virustiter zu erhalten ist daher kaum möglich. Sollte der Virustiter für ein bestimmtes Experiment entscheidend sein, da beispielsweise eine definierte *multiplicity of infection* (MOI) verwendet werden soll, so ist eine Titrierung der Lentiviren in jedem experimentellen Ansatz unerlässlich. Durch Herabsetzen der MOI können auch Mehrfachintegrate verhindert werden (Lois *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2003). Die mehrfache Integration des shRNA-Konstrukts war zwar gewünscht, da so auch ein effizientes *silencing* der Ziel-mRNA erreicht werden konnte, allerdings führt eine hohe MOI nur bis zu einem gewissen Grad zu einem größeren Anteil an transduzierten Zellen. Wird diese „maximale“ Transduktion erreicht, führt eine Erhöhung der MOI lediglich zu mehr Integraten pro Zelle (Kustikova *et al.*, 2003). Dadurch steigt das Risiko, dass wichtige zelluläre Gene durch einen *knockout* ihre Funktion verlieren und sich der Phänotyp unabhängig von der Reduktion der Ziel-mRNA ändert. Aus diesem Grund sollten in Zukunft so wenig Lentiviren wie möglich eingesetzt werden, so dass ein effektives *silencing* noch möglich ist. Durch Titration könnte evaluiert werden, wie hoch die MOI und damit auch die Anzahl der integrierten Vektorkopien sein darf, um die Ziel-mRNA zu über 90 % zu reduzieren.

Damit überprüft werden konnte, ob der *knockdown* erfolgreich war, wurde nach der Selektion der Zellen RNA aus diesem Zellpool, den pLVX-Zellen und der Parentalzelllinie isoliert und in cDNA umgewandelt (Abschnitte 4.2.11 und 4.2.12). Die Ergebnisse der daraus resultierenden qRT-PCR sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Als Kalibrator wurde wiederum die Parentalzelllinie eingesetzt, die Normalisierung erfolgte über drei *housekeeping*-Gene (Abschnitt 4.2.13).

Die erfolgreiche Reduktion der mRNA-Konzentration von *Bad* konnte durch die qRT-PCR bestätigt werden. Im Vergleich zur Ausgangszelllinie lagen im *Bad-kd*-Zellpool noch $13,8 \% \pm 2,1 \%$ der ursprünglichen *Bad*-mRNA-Menge vor. Die Reduktion war mit der Verringerung der *Set*-mRNA durch Transduktion und Werten der Literatur vergleichbar (vgl. Abschnitt 5.2.1.3). Allerdings fielen auch an dieser Stelle die mit dem pLVX-Leervektor transduzierten Zellen auf, deren *Bad*-mRNA-Transkriptspiegel um ca. $49 \% \pm 20 \%$ höher war als der der Ausgangszelllinie. Daraus ließ sich schließen, dass die lentivirale Transduktion die *Bad*-mRNA Transkription beeinflusst hatte. Da bei der stabilen Transduktion die DNA in das Genom integriert wird, kann dieser Effekt demnach nicht durch exogene, episomale DNA hervorgerufen werden. Ähnlich wie bei der Erzeugung der *Set-kd*-Zellen ist also auch für die *Bad-knockdown*-Zellen der Vergleich mit der Leervektor-Zelllinie in späte-

ren Experimenten unumgänglich. In Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen wurde der Effekt des *knockdowns* von *Bad* evaluiert (Abschnitte 5.2.5 und 5.2.6).

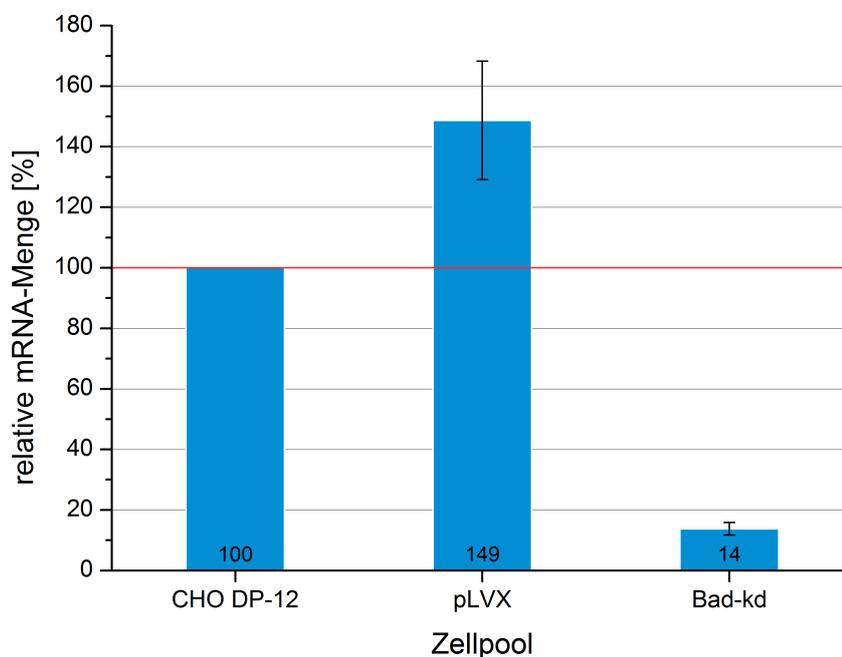


Abbildung 5.9: Nachweis des persistenten *knockdowns* von *Bad* mittel qRT-PCR. Als Kalibrator wurde die CHO DP-12-Zelllinie verwendet. Zusätzlich wurde das *Bad*-Transkriptlevel der pLVX-Negativkontrolle evaluiert.

5.2.3 Knockdown der *Lgals1*-mRNA in CHO DP-12-Zellen

In den folgenden Abschnitten wird die transiente Evaluation der *knockdown*-Effizienz verschiedener shRNAs gegen *Lgals1* beschrieben. Anschließend erfolgt die Ergebnisdarstellung und Diskussion der Erzeugung der stabilen *knockdown*-Zellen. Die Evaluation der Eignung dieses Zielgens für die ZLE mittels *knockdown* wurde durch Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen durchgeführt (Abschnitte 5.2.5 und 5.2.6). Galectin-1 wurde zuvor in einem Proteomansatz bei Vergleichen zwischen CHO-Hochproduzenten und CHO-Niedrigproduzenten als differenziell exprimiert identifiziert (Carlage *et al.*, 2009). Es lag in den Hochproduzenten schwächer exprimiert vor als in den Niedrigproduzenten. Daher wurde die Vermutung angestellt, Galectin-1 besäße eine wachstumsinhibierende Funktion (Carlage *et al.*, 2009). Wie zuvor bereits erläutert, ist die exakte Funktion von *Lgals1* bisher nicht geklärt (Abschnitt 3.4.3). Zudem scheint sie vom untersuchten Zelltyp abhängig zu sein. Die Auswirkungen einer gezielten Reduktion durch RNAi-vermittelten *knockdown* auf Wachstum

und Produktivität einer CHO-Zelllinie sollten daher im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

5.2.3.1 Konstruktion lentiviraler Transfervektoren mit shRNA-Sequenzen zum *knockdown* von *Lgals1*

Die Generierung der shRNA-Sequenzen gegen *Lgals1* basierte auf CHO cDNA-Daten (Becker *et al.*, 2011). Mit Hilfe des *siRNA Selection Programs* (Yuan *et al.*, 2004) wurden zwei siRNA-Sequenzen generiert, auf die im Folgenden als *Lgals1.1* bzw. *Lgals1.2* referenziert wird. Die siRNA-Sequenzen wurden gegen den CHO-cDNA-Sequenzdatensatz geblasted (Abschnitt 4.2.18). Dadurch konnte bestätigt werden, dass es keine oder weniger als 14 Basen ($\leq 70\%$) Übereinstimmung mit anderen cDNAs des CHO-Transkriptoms gab. Neben den siRNA-Sequenzen wurde zusätzlich auf Grundlage von *Lgals1.1* eine *scrambled control* erstellt. Diese enthielt die identische Basenkomposition wie *Lgals1.1*, jedoch waren die Basen zufällig angeordnet. Die Sequenz wies damit keinerlei Komplementarität zu einer CHO-mRNA auf, was ebenfalls durch einen BLAST bestätigt wurde (Abschnitt 4.2.18). Die so generierten siRNA-Sequenzen wurden analog zu den *Bad*-shRNA-Sequenzen (vgl. Abschnitt 5.2.2.1) mittels des *shRNA Sequence Designers* (Clontech, 2012a) in *top*- und *bottom*-shRNA-Stränge konvertiert, die bei einer *in vivo* Transkription zu funktionellen shRNAs führen (vgl. Abschnitt 3.2.2). Die Sequenzen der *top*- und *bottom*-Stränge wurden anschließend bei einem Oligonukleotid-Hersteller synthetisiert.

Analog zu den bereits durchgeführten Transfervektor-Konstruktionen (Abschnitte 5.2.1.1 und 5.2.2.1) wurden die Oligonukleotide verdünnt und hybridisiert (Abschnitt 4.2.2). Anschließend wurde der pLVX-Transfervektor mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und aufgereinigt (Abschnitte 4.2.5 und 4.2.9). Das geschnittene Plasmid und die hybridisierten Oligonukleotide wurden in drei separaten Reaktionen gemischt, ligiert und durch Hitzeschocktransformation in TOP10 *E. coli*-Zellen eingebracht (Abschnitte 4.2.6 und 4.1.3). Die Bakteriensuspension wurde auf Ampicillin-haltigem LB-Agar ausgestrichen (Abschnitt 4.1.1).

Nach der Inkubation der Bakterien über Nacht wurden mittels Kolonie-PCR Klone identifiziert, deren Plasmide die ligierten Oligonukleotide enthielten (Abschnitt 4.2.1.2). Von je einem bakteriellen Klon mit korrekter PCR-Amplifikatgröße pro shRNA-Sequenz bzw. der *scrambled control* wurde eine Übernachtskultur für eine DNA-Mini-Präparation angelegt (Abschnitt 4.1.1). Die Plasmide wurden daraufhin isoliert und zur Verifikation der Sequenzidentität sequenziert (Abschnitt 4.2.17). Damit für die weiteren Versuche, wie der transienten Nukleofektion und der Lentivirus-Produktion, ausreichend Plasmid zur Verfügung stand,

wurde von den Plasmiden mit korrekter Sequenz eine DNA-Maxi-Präparation durchgeführt (Abschnitt 4.2.10).

5.2.3.2 Evaluation des transienten *knockdowns* von *Lgals1*

Die für die Reduktion des mRNA-Levels von *Lgals1* generierten shRNA-Sequenzen (Abschnitt 5.2.3.1) sowie die entsprechende Kontrolle wurden im Folgenden auf ihre Wirksamkeit hin getestet. Um die Effektivität der jeweiligen shRNA-Sequenz zu beurteilen, wurden 1×10^6 CHO DP-12-Zellen mit 6 μg der generierten Plasmid-DNA nukleofiziert (Abschnitt 4.3.7). Dazu wurden vier Ansätze erstellt, zwei mit *Lgals1.1* bzw. *Lgals1.2*, einer mit der *scrambled control*, sowie einer mit dem pLVX-shRNA1-Leervektor. Die transfizierten Zellen wurden in die *wells* einer 12-*well*-Kulturplatte transferiert und in einem Gesamtvolumen von 2 mL Kulturmedium für 24 h inkubiert (Abschnitt 4.3.2). Der Vergleich der *Lgals1*-mRNA-Menge dieser Kulturen sollte zum einen klären, welche Sequenz den stärksten *knockdown* erzielt, zum anderen sollte nachgewiesen werden, dass weder der Leervektor, noch die unspezifische shRNA einen deutlichen Einfluss auf das *Lgals1*-mRNA-Level hatte. Nach 24 h Kultivierung wurde die RNA der transfizierten Zellen extrahiert und die Konzentration und Reinheit gemessen (Abschnitte 4.2.11 und 4.2.4). Anschließend wurde 1 μg RNA in cDNA konvertiert (Abschnitt 4.2.12).

Die cDNA wurde als *template* für eine qRT-PCR eingesetzt, um das Transkriptlevel der *Lgals1*-mRNA zu messen (Abschnitt 4.2.13). Dabei wurde die mit dem Leervektor transfizierte CHO DP-12 Zelle als Kalibrator eingesetzt. In Abbildung 5.10 sind die so normalisierten, relativen mRNA-Mengen dargestellt. Die Normalisierung wurde mittels dreier *housekeeping*-Gene durchgeführt (Abschnitt 4.2.13).

Sowohl *Lgals1.1* als auch *Lgals1.2* führten zu einer Reduktion der *Lgals1*-mRNA-Menge im Vergleich zu einer Leervektor-Transfektion. Dabei unterschieden sie sich jedoch in ihrer *silencing*-Effektivität. Die shRNA-Sequenz *Lgals1.1* vermochte das *Lgals1*-Transkriptlevel um $51 \% \pm 10,6 \%$ zu senken, *Lgals1.2* um $71 \% \pm 6,7 \%$. Die *scrambled control* hatte keinen deutlichen Einfluss auf das Transkriptlevel. Zwar war auch dort die mRNA-Menge geringer als bei der Leervektor-Transfektion, aufgrund des Messfehlers war dies aber zu vernachlässigen. Generell konnte eine relative hohe mRNA-Menge von *Lgals1* detektiert werden, woraus auch auf eine hohe Proteinabundanz geschlossen werden kann. Das wird durch einen Vergleich der C_P -Werte deutlich. In den mit dem pLVX-Vektor bzw. der *scrambled control* transfizierten Zellen lag der durchschnittliche C_P der *Lgals1*-mRNA bei etwa 14,7, während β -Aktin, ein Protein das ebenfalls in hoher Menge in der Zelle vorliegt, einen C_P von etwa 15,4 erreichte. Dies würde bereits durchgeführte Analysen zu der Proteinmenge von

LGALS1 in CHO-Zellen bestätigen, in denen eine hohe Syntheseleistung der CHO-Zellen für Galectin-1 nachgewiesen wurde (Cho & Cummings, 1995a). Da für weitere Schritte ein möglichst hoher *knockdown* angestrebt werden sollte, wurde *Lgals1.2* für die Produktion der Lentiviren ausgewählt.

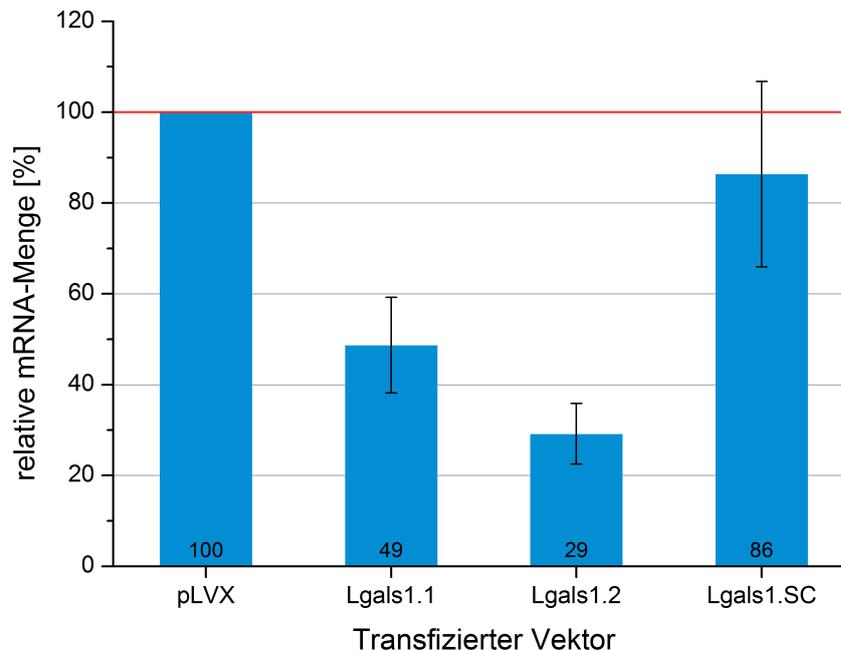


Abbildung 5.10: Evaluation der *silencing*-Effektivität der shRNA-Sequenzen gegen die mRNA von *Lgals1* und die *scrambled control* („SC“). Alle Proben sind auf die Leervektor-transfizierte CHO DP-12-Zelllinie bezogen.

5.2.3.3 Erzeugung von stabil anti-*Lgals1*-shRNA exprimierenden CHO DP-12-Zellen

In vorherigen Schritten wurde transient eine shRNA-Sequenz ermittelt, die das mRNA-Level von *Lgals1* in CHO DP-12-Zellen effektiv reduzieren konnte (Abschnitt 5.2.3.2). Der Vektor mit der shRNA-Sequenz *Lgals1.2* wurde für die Generierung von Lentiviren genutzt und die CHO DP-12-Parentalzelllinie mit diesen Viren infiziert (Abschnitte 4.3.8 und 4.3.9). Nach einer Subkultivierung der Zellen im Anschluss an die Infektion startete die Selektionsphase mit 5 µg/mL Puromycin bei einer Zelldichte von 10×10^5 Z/mL und dauerte etwa 14 Tage an. Sie ist in Abbildung 5.11 dargestellt.

Die Effekte der Puromycin-Zugabe waren bereits ab Kultivierungstag 0,8 sichtbar, denn die Viabilität sank von 99 % auf 96 %. Nach 1,7 Tagen wurde die Kultur auf eine Zelldichte

von $5,3 \times 10^5$ Z/mL verdünnt (Abschnitt 4.3.2). Die Viabilität sank daraufhin weiter bis auf 83 % an Tag 6,7, an dem die Zellen erneut unter Beibehaltung des Selektionsdrucks passagiert wurden (Abschnitt 4.3.2). Zu diesem Zeitpunkt war eine Zunahme der Viabilität der Kultur messbar. Sie erreichte nach insgesamt 13,8 Tagen seit Beginn der Selektion mit 98 % wieder einen für die CHO DP-12-Zelllinie üblichen Wert. Neben der Reduktion der Viabilität war ebenfalls ein Rückgang in der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ um etwa die Hälfte ihres normalen Wertes zu beobachten. Zwischen Tag 2,8 und Tag 6,7 lag μ durchschnittlich bei $0,3 \text{ d}^{-1}$. Unterdessen erreichte μ an den späteren Zeitpunkten der Selektionsphase (7,8 bis 17,8) durchschnittliche Werte zwischen $0,6 \text{ d}^{-1}$ bzw. $0,8 \text{ d}^{-1}$. Sowohl die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, als auch die der Viabilität waren auf ein Absterben der nicht-Puromycin-resistenten Zellen zurückzuführen. Die Selektion war nach dieser Zeit abgeschlossen und der erzeugte Zellpool wird im Folgenden als *Lgals1-knockdown* (*Lgals1-kd*)-Zellpool bezeichnet.

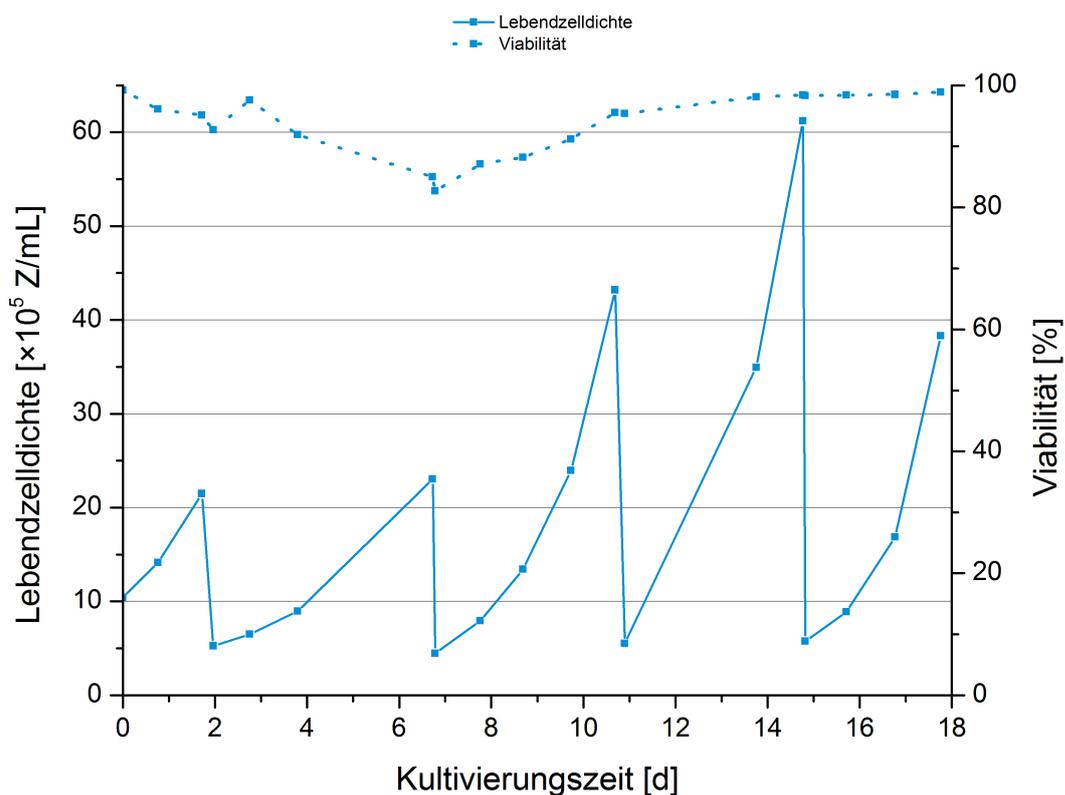


Abbildung 5.11: Selektion der Puromycin-resistenten *Lgals1-kd*-Zellen. Dargestellt ist der durch das Cedex gemessene Verlauf der viablen Zelldichte und der Viabilität.

Der Selektionseffekt war im Vergleich zu der Selektion des pLVX-Zellpools stärker (vgl. Abschnitt 5.1.3). Dort fiel die Viabilität der Kultur lediglich von 99 % auf 94 %. Das lässt den Rückschluss zu, dass bei der Erzeugung der *Lgals1-kd*-Zellen weniger Lentiviren zur Infektion zur Verfügung standen als bei den pLVX-Zellen. Trotz gleicher Vorgehensweise bei der Generierung der Lentiviren, scheint der erzeugte Titer damit nicht exakt reproduzierbar zu sein. Dieser Effekt wurde zuvor bereits bei den *Bad-kd*-Zellen beobachtet (Abschnitt 5.2.2.3).

Die Vermittlung der Puromycin-Resistenz alleine lieferte keine Informationen zum tatsächlichen *silencing*-Effekt. Oftmals reicht eine einzige Kopie, um eine Resistenz gegen einen Selektionsmarker ausbilden zu können (Fukushige & Sauer, 1992). Diese Kopie kann unter Umständen allerdings nicht ausreichend sein, um das mRNA-Level der Ziel-mRNA hinreichend reduzieren zu können. Damit die Stärke des *knockdowns* beurteilt werden konnte, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurde aus den transduzierten und selektionierten Zellen, der Ursprungskultur sowie aus den pLVX-Zellen RNA isoliert (Abschnitt 4.2.11). Nach der Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurde 1 µg der RNA in cDNA transkribiert (Abschnitte 4.2.4 und 4.2.12). In der qRT-PCR mit der erzeugten cDNA wurde die CHO DP-12-Zelllinie als Kalibrator eingesetzt (Abschnitt 4.2.13).

Die erfolgreiche Reduktion des *Lgals1*-Transkriptspiegels ist in Abbildung 5.12 zu sehen. Im Vergleich zur Ausgangszelllinie konnte die mRNA-Menge des Zielgens um $92,6\% \pm 0,9\%$ reduziert werden. Das entspricht einem *fold change* von -13,5. Auch die *Lgals1-kd*-Zellen waren in ihrem maximalen *knockdown* stärker als die *Requiem-kd*-Zellen von Wong *et al.* (2006). Das verwendete Lentivirus-System eignete sich dementsprechend gut für die Erzeugung von stabilen Zellen mit einem hohen *knockdown* der Ziel-mRNA. Es fiel allerdings auf, dass auch die Leervektor-Transduktion die *Lgals1*-mRNA beeinflusst hatte. Dort war ebenfalls eine Reduktion um $30,7\% \pm 9,1\%$ zu beobachten. Da, wie zuvor bereits erläutert (Abschnitt 5.1.3), auch eine Leervektor-Transduktion eine neue Zelle mit gegebenenfalls anderem Phänotyp generiert, ist die Änderung des *Lgals1*-Transkriptspiegels nicht verwunderlich. Da der pLVX-Zellpool in weiteren Experimenten wie der Batch- und Fed-Batch-Kultivierung (Abschnitte 5.2.5 und 5.2.6) als Kontrolle mitgeführt wurde, konnte zwischen zufälligen Effekten, die durch die Transduktion und Selektion entstanden und den zielgerichteten Effekten, hervorgerufen durch den shRNA-vermittelten *knockdown*, differenziert werden.

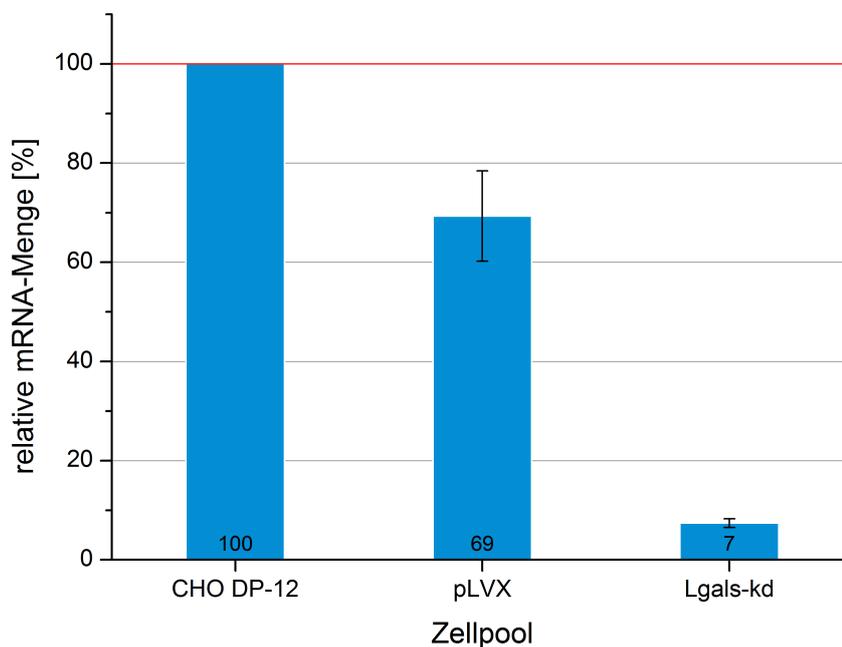


Abbildung 5.12: Verifikation des *knockdowns* von *Lgals1* in den stabil transduzierten *Lgals1-kd*-Zellen. In der qRT-PCR wurde die CHO DP-12-Zelllinie als Kalibrator verwendet. Die Veränderungen des *Lgals1*-Transkriptlevels in der Leervektor-transduzierten Negativkontrolle wurde ebenfalls evaluiert.

5.2.4 Test der *knockdown*-Effizienz verschiedener shRNAs gegen die mRNA von *Ypel3* und *Phf3*

In dieser Arbeit wurden zwei weitere Zielgene untersucht, die eine signifikante Regulierung in einem differentiellen μ Array bei Induktion durch Natriumbutyrat zeigten (s. Anhang, Abschnitt 4.4.3), *Yippee Like 3*-Protein (*Ypel3*) und *PHD finger protein 3* (*Phf3*). *Ypel3* zeigte in der mit Natriumbutyrat-behandelten Kultur einen *fold change* von +3,7 (angepasster p-Wert: 0,001, log-Intensität: 10,1). Da YPEL3 wachstumshemmend wirkt, könnte eine zusätzliche Reduktion des mRNA-Levels und daraus resultierend auch der Proteinmenge wachstumsfördernd wirken (Abschnitt 3.4.5). *Phf3* war mit einem *fold change* von -14,3 herunter reguliert (angepasster p-Wert: 0,0002, log-Intensität: 12,8). Dem Protein konnte bislang keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Es handelt sich aber möglicherweise um einen Transkriptionsfaktor (Abschnitt 3.4.4). Um herauszufinden, ob die unter dem Einfluss von Natriumbutyrat beobachtete Reduktion der mRNA einen Effekt auf Wachs-

tum oder Produktivität besaß, sollte versucht werden, die Transkript-Menge dieser Gene zu senken.

Den generierten shRNA-Sequenzen lagen cDNA-Daten von *M. musculus* zugrunde (*GenBank*-Nr.: NM_025347.2 und NM_001081080.1, Dezember 2011 und April 2012). Sofern möglich, wurden die Sequenzinformationen der CHO-Sequenzierung berücksichtigt, um eine größtmögliche Sequenzidentität zu den Zielzellen zu erreichen. Aufgrund der mit 360 nt geringen mRNA-Länge von *Ypel3* wurden lediglich zwei shRNA-Sequenzen und eine *scrambled control* (basierend auf *Ypel3.2*) generiert. Die mRNA von *Phf3* hingegen ist mit 6078 nt deutlich länger. Daher wurden gegen diese mRNA drei shRNA-Sequenzen und die *scrambled control* (basierend auf *Phf3.1*) erstellt. Alle shRNA-Sequenzen wurden mit dem *RNAi Target Sequence Selector Tool* der Firma Clontech identifiziert (Clontech, 2012b). Die siRNA-Sequenzen wurden gegen die CHO cDNA-Datenbank geblastet (Abschnitt 4.2.18) und nur die, die weniger als 70 % Homologie zu einer anderen cDNA aufwiesen, wurden für die weiteren Experimente ausgewählt. Die *scrambled control* wies in beiden Fällen keine Homologie zu den CHO-Sequenzen auf. Anschließend wurden die shRNA-Sequenzen mit dem *shRNA Sequence Designer* in *top*- und *bottom*-Stränge konvertiert (Clontech, 2012a), die dann bei einem Oligonukleotid-Hersteller synthetisiert wurden.

Analog zu den bisher durchgeführten Klonierungen zur Erzeugung der shRNA-Expressionsvektoren wurden die Vektoren für die *Ypel3*- und *Phf3*-shRNAs erstellt (vgl. Abschnitte 5.2.1.1, 5.2.2.1 und 5.2.3.1). Nach Hybridisierung und Verdünnung der Oligonukleotide wurden diese in den geschnittenen pLVX-shRNA1-Transfektor ligiert und ein Aliquot davon in TOP10 *E. coli* transformiert (Abschnitte 4.2.5, 4.2.6, 4.1.3 und 4.1.1). Im Anschluß der Kultivierung über Nacht wurden Klone deren Plasmide Inserts trugen mittels Kolonie-PCR identifiziert, die Sequenzintegrität wurde verifiziert und DNA-Maxi-Präparationen angefertigt (Abschnitte 4.2.1.2, 4.2.17 und 4.2.10).

Die Plasmide mit den shRNA-Sequenzen gegen *Ypel3*, *Phf3* sowie der Leervektor pLVX-shRNA1 wurden zu je 6 µg in je 1×10^6 CHO DP-12-Zellen nukleofiziert und in die *wells* einer 12-*well*-Zellkulturplatte überführt (Abschnitte 4.3.7 und 4.3.2). Nach 24-stündiger Inkubation wurde die RNA dieser Zellen sowie die von 2×10^6 CHO DP-12-Zellen isoliert und nach Messung von Konzentration und Reinheit wurde 1 µg je RNA in cDNA umgeschrieben (Abschnitte 4.2.11, 4.2.4 und 4.2.12). Diese diente als *template* für eine qRT-PCR, in der die relative mRNA-Menge von *Ypel3* bzw. *Phf3* gemessen wurde (Abschnitt 4.2.13). Die CHO DP-12-Zellen dienten als Kalibrator, normalisiert wurde gegen zwei *housekeeping*-Gene, β -Aktin und Vezatin.

Abbildung 5.13 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR für die transfizierten *Ypel3*-shRNA-Sequenzen. Beide shRNAs waren nicht in der Lage, die mRNA von *Ypel3* im Vergleich zur

Parentalzelle signifikant herunter zu regulieren. Die *scrambled control* hatte ebenfalls keine Auswirkungen auf die *Ypel3*-mRNA. Auch die Leervektor-Transfektion änderte das *Ypel3*-mRNA-Level praktisch nicht. Alle Werte schwankten zwischen $95\% \pm 8\%$ für *Ypel3.1* und $101\% \pm 9\%$ für *Ypel3.2*. Es ist durchaus möglich, dass beide shRNAs nicht in der Lage waren, die mRNA zu reduzieren. Möglicherweise sind weite Bereiche der 360 nt langen *Ypel3*-mRNA mit RNA-bindenden Proteinen gebunden, was die Anlagerung des mit der siRNA beladenen RISC erschwerte oder gar unmöglich machte. Zusätzlich könnten auch Sekundärstrukturen die Bindung der siRNA verhindern. Da keine der *Ypel3*-shRNA-Sequenzen in der Lage war, die mRNA-Menge zu reduzieren, müssten für dieses Zielgen zunächst neue shRNA-Sequenzen generiert werden, um deren Effizienz beurteilen zu können und eine shRNA zu identifizieren, die für eine stabile Reduktion der *Ypel3*-mRNA geeignet ist.

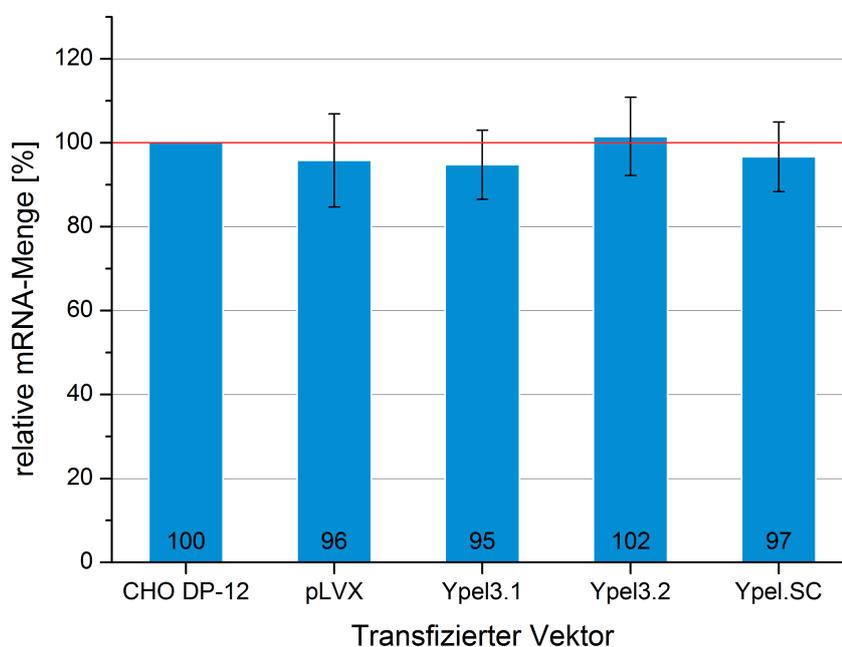


Abbildung 5.13: qRT-PCR der transient transfizierten *Ypel3*-shRNA-Expressionsvektoren. Normalisiert wurde mit den *housekeeping*-Genen β -Aktin und Vezeatin. Alle Daten wurden auf die CHO DP-12-Zelllinie kalibriert. Zusätzlich wurde die Änderung des Transkriptlevels von *Ypel3* bei Transfektion des pLVX-Leervektors und der *scrambled control* („SC“) erfasst.

Abbildung 5.14 stellt die Ergebnisse der qRT-PCR mit den *Phf3*-shRNA-behandelten CHO DP-12-Zellen dar. *Phf3.1* und *Phf3.3* waren in der Lage, die mRNA-Menge von *Phf3* im Vergleich zu der Parentalzelle um $45\% \pm 4\%$ bzw. $47\% \pm 4\%$ zu verringern. Die relative mRNA-Menge von *Phf3* bei den mit der *scrambled control* transfizierten Zellen lag bei

79 % \pm 9 %. Diese Veränderung war unerwartet, da die *scrambled control* keinen Einfluss auf die endogene *Phf3*-mRNA hätte haben sollen. Da die exakte Funktion des Proteins PHF3 nicht bekannt ist, kann eine Transfektion eventuell eine Auswirkung auf die Transkription dieses Gens haben. Möglicherweise wäre die Generierung einer weiteren *scrambled control* hilfreich, da damit überprüft werden könnte, ob allein die Anwesenheit einer shRNA einen Effekt auf die *Phf3*-mRNA hat. Eine deutliche Reduktion der mRNA ist bei der Leervektor-Transfektion nicht zu beobachten. Sie wirkte sich mit einem relativen *Phf3*-mRNA-Level von 90 % \pm 5 % im Vergleich zur Parentalzelllinie praktisch nicht auf diese aus. Die Reduktion von maximal 15 % kann eventuell auf den Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Isolation zurückgeführt werden. Da die RNA der CHO DP-12-Zellen von nicht-transfizierten Zellen isoliert wurde, könnte die Transfektionsprozedur selbst einen Einfluss auf die untersuchte mRNA haben. Für zukünftige Arbeiten sollte die Parentalzelle ohne Zugabe von Plasmid-DNA ebenfalls nukleofiziert werden, um Varianzen, die durch die Transfektionsmethode selbst entstehen, ausschließen zu können.

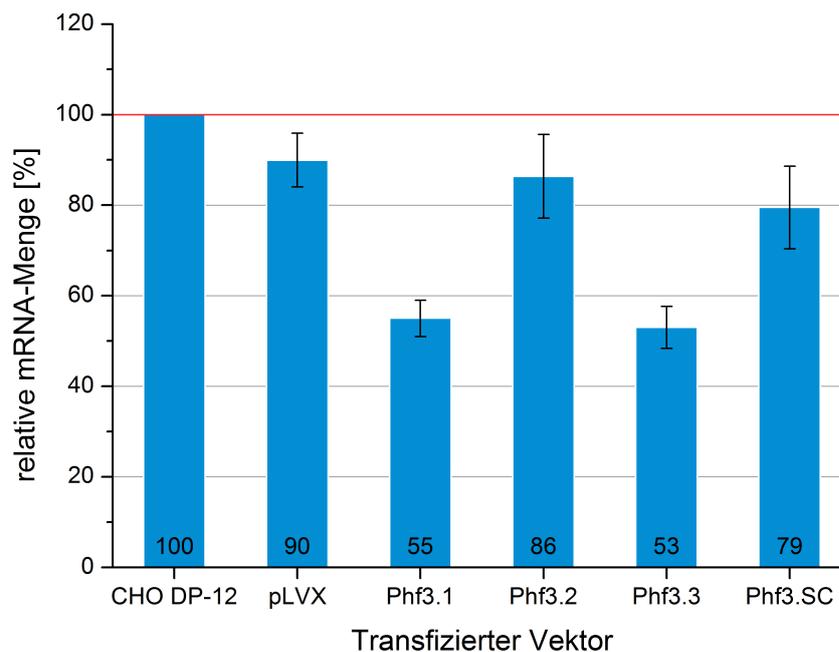


Abbildung 5.14: qRT-PCR-Ergebnis der Messung der relativen *Phf3*-mRNA-Menge nach Transfektion der *Phf3*-shRNA-Expressionsvektoren. Normalisiert wurde mittels der zwei *housekeeping*-Gene β -Aktin und Vezatin. Kalibriert wurde gegen die CHO DP-12-Parentalzelllinie. Zusätzlich wurden die Veränderungen der mRNA-Menge von *Phf3* bei Transfektion des pLVX-Leervektors und der *scrambled control* („SC“) erfasst.

Die Arbeiten an dem *knockdown* von *Ypel3* und *Phf3* wurden an dieser Stelle eingestellt. Sie bieten aber dennoch einen Ansatzpunkt für zukünftige Experimente. YPEL3 ist als möglicher Wachstumsinhibitor ein Protein, dessen *knockdown* oder *knockout* in der ZLE zu höheren Lebendzellichten im Kulturverlauf führen kann. Diese Zunahme kann zu einer Erhöhung der Produktausbeute führen. *Phf3.1* und *Phf3.3* konnten die *Phf3*-mRNA-Menge zwar verringern, jedoch lag diese Reduktion bei lediglich 45–47 %. Im Vergleich zu anderen shRNAs, wie der funktionierenden *Set*-, *Bad*- oder *Lgals1*-shRNA, die für die Generierung von stabilen *knockdown*-Zelllinien eingesetzt wurden (Abschnitte 5.2.1.2, 5.2.2.2 und 5.2.3.2), ist der transiente *knockdown* deutlich geringer. Die shRNAs gegen *Set*, *Bad* und *Lgals1* erreichten in der transienten Transfektion bereits Reduktionen der mRNA zwischen 62 % und 70 %. Es ist daher möglich, dass ein transienter *knockdown* von 45 % in einem stabilen Ansatz die mRNA nicht ausreichend verringern kann, so dass ein möglicher Effekt nicht, oder nur abgeschwächt sichtbar werden würde. Aus diesem Grund sollten sowohl für *Ypel3* als auch für *Phf3* andere shRNA-Sequenzen evaluiert werden. Weiterhin könnte die shRNA selbst angepasst werden, indem der *antisense*-Strang nicht homolog zum *sense*-Strang konstruiert wird. Alternativ könnten, wie bei miRNAs üblich, nicht-komplementäre Bereiche in den beiden Strängen eingeführt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Modifikationen der siRNAs zu einer Verbesserung der *silencing*-Effektivität führen (Chang *et al.*, 2009).

5.2.5 Batch-Kultivierung der CHO DP-12-Parentalzelle, der pLVX-, *Set*-*kd*-, *Bad*-*kd*- und *Lgals1*-*kd*-Zellen

In den vorherigen Abschnitten wurde die Erzeugung von drei verschiedenen *knockdown*-Zellpools beschrieben, der *Set*-*kd*-, *Bad*-*kd*-, und *Lgals1*-*kd*-Zellen (Abschnitte 5.2.1.3, 5.2.2.3 und 5.2.3.3). Um eine Auswirkung des *knockdowns* auf das Wachstumsverhalten oder die Produktivität der Zellen festzustellen, wurde zunächst eine Batch-Kultivierung der verschiedenen Zellen durchgeführt. Dazu wurden diese aus der Kryokonservierung aufgetaut und für 7 Tage kultiviert, um Effekte der Konservierung auszuschließen (Abschnitte 4.3.4 und 4.3.2). Zunächst wurde der Batch mit den *Bad*-*kd*- und den *Lgals1*-*kd*-Zellen im Shaker durchgeführt. Dazu wurde ein Gesamtvolumen von 50 mL Medium, versetzt mit 5 µg/mL Puromycin, verwendet. Die Shaker wurden mit 5×10^5 Z/mL inokuliert und anschließend Proben davon täglich in Doppelbestimmung im Cedex gemessen (Abschnitte 4.3.2 und 4.3.3). Zusätzlich wurde zellfreier Überstand zur Antikörper-Bestimmung bei -20 °C eingefroren. Das Abbruchkriterium war erreicht, wenn die Viabilität der Zellen 30 % unterschritt. Die

Entwicklung der Lebendzellichte und die der Viabilität während des Batches sind in Abbildung 5.15 dargestellt.

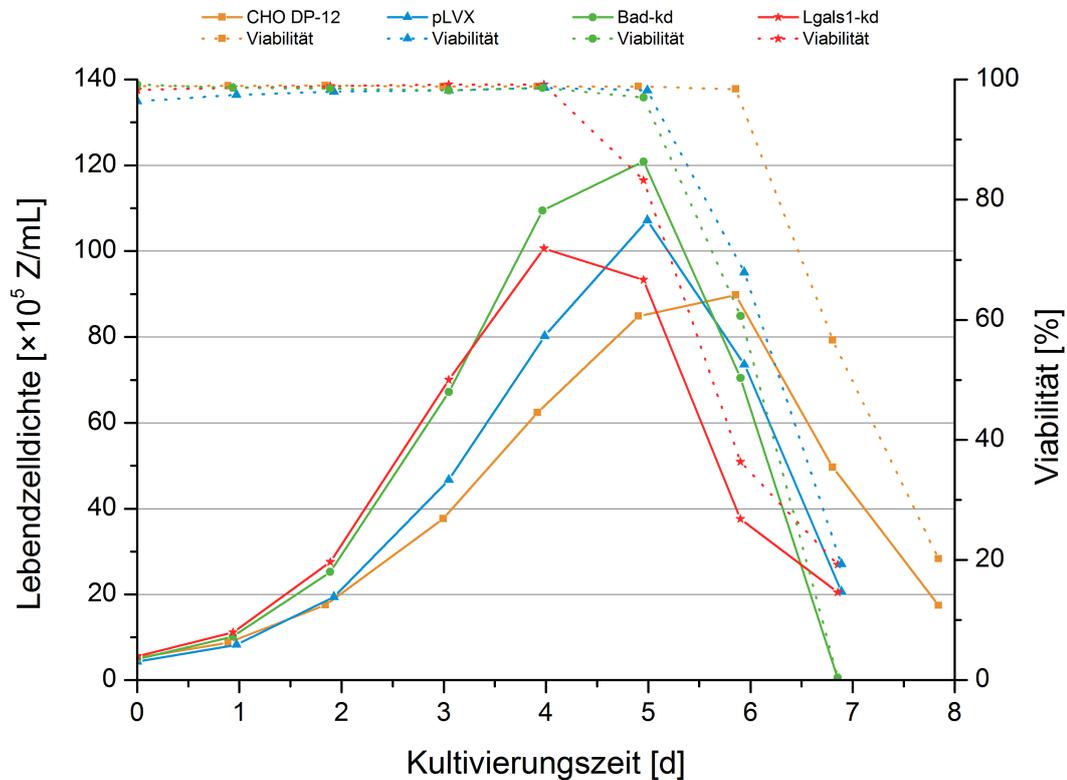


Abbildung 5.15: Entwicklung der Lebendzellichte und der Viabilität im Verlauf der Batch-Kultivierung der CHO DP-12- (orange), pLVX- (blau), *Bad-kd*- (grün) und *Lgals1-kd*-Zellen (rot). Die Lebendzellichten sind mit durchgezogenen Linien dargestellt, die zugehörigen Viabilitäten mit gepunkteten Linien. Alle modifizierten Zelllinien, inklusive der Negativkontrolle, erreichten höhere maximale Lebendzellichten als die Referenzkultur. Die höchste Lebendzellichte wurde von den *Bad-kd*-Zellen erzielt. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Cedex-Doppelbestimmung.

Der Verlauf der Lebendzellichte zeigte, dass alle modifizierten Zellen inklusive der Negativkontrolle in ihrem Wachstumsverhalten von der CHO DP-12-Parentalzelllinie abwichen. Dies betraf sowohl die maximale Lebendzellichte, als auch die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit, wie in Tabelle 5.2 ersichtlich. Die Unterschiede zeichneten sich bereits ab Kultivierungstag 1 ab, waren aber noch nicht deutlich ausgeprägt. Die *Lgals1-kd*- und *Bad-kd*-Zellen erreichten an Tag 3 eine fast doppelt so hohe Lebendzellichte wie die Parentalzellen (ca. 69×10^5 Z/mL im Vergleich zu $37,6 \times 10^5$ Z/mL). Auffällig war, dass die *Lgals1*-

kd-Zellen nach Tag 4 bereits an Viabilität und Lebendzellichte abnahmen, während alle anderen Zellpools einen Tag länger wuchsen, bevor die Absterbephase begann. Es ist zu vermuten, dass die maximale Zelldichte der *Lgals1-kd*-Zellen zwischen Kultivierungstag 4 und 5 erreicht wurde. Der *Bad-kd*-Zellpool erreichte in diesem Ansatz mit 121×10^5 Z/mL die höchsten Lebendzellichten. Abgesehen von der erhöhten Maximalzellichte war allerdings keine Verlängerung der Wachstums- oder Absterbephase festzustellen, was auf ein späteres Einsetzen der Apoptose hätte hindeuten können.

Auch die pLVX-Zellen wuchsen mit 107×10^5 Z/mL zu höheren Lebendzellichten, als die Ausgangszelllinie, deren Maximum bei einer Zelldichte von 90×10^5 Z/mL erreicht war. Durch das hier vorliegende veränderte Wachstumsprofil der einzelnen Zellpools ist ein direkter Vergleich untereinander schwierig. Zwar mag es sein, dass ein Zellpool schneller wuchs und zudem höhere Zelldichten erreichte, dafür starben die Zellen jedoch auch früher als die Referenzkultur ab. Letztlich ist die Ausbeute an viablen Zellen ein entscheidendes Kriterium für die Beurteilung der Qualität eines Prozesses, da sich dies in den meisten Fällen direkt auf den Produkttiter aber auch die Produktqualität oder die Aktivität auswirkt. Daher ist die Auswertung mithilfe des Zell-Zeit-Integrals eine geeignete Methode, um Kulturen mit unterschiedlichen Wachstumsprofilen miteinander vergleichen zu können.

Die erhöhte maximale Lebendzellichte des *Bad-kd*-Zellpools führte auch im Integral der Zellen über die Zeit, welches in Grafik 5.16 zu sehen ist, zu Unterschieden im Vergleich zu den übrigen Zellen. Verglichen mit der Ausgangszelllinie war es um 12,3 % größer. Das frühere Absterben der *Lgals1-kd*-Zellen konnte nicht durch die anfänglich höheren Zelldichten kompensiert werden. Das Integral war mit $346,5 \times 10^5$ Z · d · mL⁻¹ sogar 1,9 % geringer, als das der Parentalzelllinie. Das geringste Zell-Zeit-Integral wiesen die pLVX-transduzierten Zellen auf. Sie erreichten mit $107,2 \times 10^5$ Z/mL zwar eine 19,4 % höhere maximale Lebendzellichte und zeigten eine höhere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit als die Referenzkultur, allerdings begann ihre Absterbephase einen Tag früher als die der CHO DP-12-Zellen. Dadurch ist ihr Zell-Zeit-Integral 3,6 % geringer als das der Referenz.

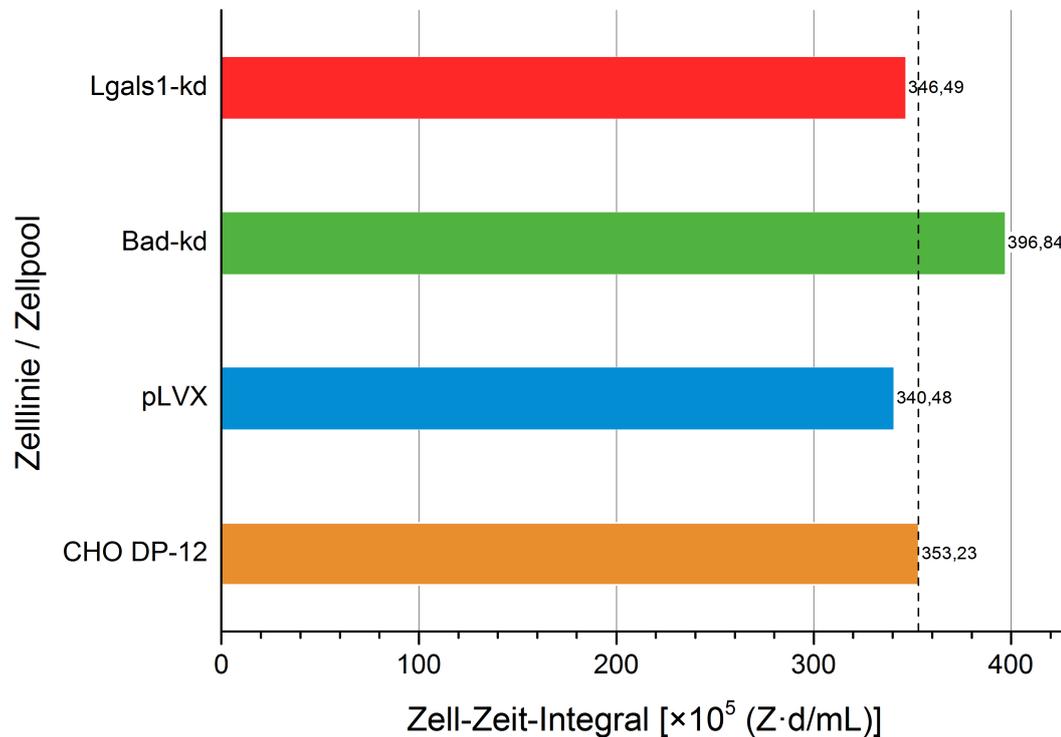


Abbildung 5.16: Zell-Zeit-Integral der Kultivierung mit den CHO DP-12-, pLVX-, *Bad-kd*- und *Lgals1-kd*-Zellen. Da alle Kulturen gleich behandelt wurden, wurde das Kulturvolumen nicht in die Berechnung einbezogen und ist somit noch Teil der Dimension des Zell-Zeit-Integrals. Die gestrichelte Linie markiert das erreichte Zell-Zeit-Integral der Referenzkultur. Auch hier wurde das höchste Integral von den *Bad-kd*-Zellen erzielt.

Die Auswertung dieser Wachstumskurven macht deutlich, dass nicht unbedingt die maximale Lebendzellichte eines Prozesses entscheidend für dessen Qualität und die Beurteilung der Eignung des veränderten Zielgens für die ZLE ist. Separiert man die Produktbildung der Zellen von ihrem Wachstum und betrachtet ausschließlich dieses als Bewertungskriterium für die Prozesse, so schienen alle modifizierten Zelllinien ein besseres Wachstumverhalten als die Ausgangszelllinie zu besitzen. In Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit war dies zumindest der Fall (Tabelle 5.2). Die Ausbeute an Zellen korreliert aber ebenso mit der Kulturdauer. Unter Einbeziehung des Zell-Zeit-Integrals zeigten daher lediglich die *Bad-kd*-Zellen eine Verbesserung gegenüber der Ausgangszelllinie CHO DP-12. Es ist dabei zu beachten, dass eine häufigere Probennahme für die korrekte Evaluation des Zell-Zeit-Integrals, aber auch der Entwicklung der viablen Zelldichte ratsam wäre, da so das Abbruchkriterium genauer bestimmt werden kann. Durch die definierten Abstände der Probennahme konnte

nicht verfolgt werden, wann der jeweilige Zellpool die finale Viabilität erreicht hatte. Die Kulturen konnten lediglich zum Zeitpunkt der Probenahme beurteilt werden. Alternativ zur Cedex-Messung könnten die Zelldichten auch *on-line* während der Kultivierung aufgezeichnet werden. Eine Möglichkeit dazu bietet beispielsweise die dielektrische Spektroskopie (Noll & Biselli, 1998; Opel *et al.*, 2010). Zu beachten ist dabei allerdings die Veränderung der dielektrischen Eigenschaften einer Zellkultur zum Ende der Kultivierung hin (Opel *et al.*, 2010).

Tabelle 5.2: Maximale (μ_{\max}) und durchschnittliche (μ_{\emptyset}) spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [d^{-1}] der Zellpools und der CHO DP-12-Zellen während der Batch-Kultivierung. μ_{\emptyset} wurde während der Wachstumsphase bis zum Erreichen der maximalen Lebendzellichte berechnet (Abschnitt 4.6.1). μ_{\max} umfasst alle Zeitpunkte während der Kultivierung.

	CHO DP-12	pLVX	<i>Bad-kd</i>	<i>Lgals1-kd</i>
μ_{\max}	0,73	0,90	0,95	0,95
μ_{\emptyset}	0,41	0,53	0,53	0,47

Die Evaluierung eines industriell-relevanten Produktionsprozesses kann jedoch nicht alleine aufgrund von Wachstumsdaten erfolgen. Die Entwicklung der Produktkonzentration, wie auch der Produktivität, ist ebenso wichtig, wenngleich nicht sogar wichtiger, als das Erreichen hoher Zelldichten. Hohe Zelldichten bedeuten zwar in vielen Fällen größere Ausbeuten, allerdings führen sie auch zu einem höheren Aufwand im Bereich der Aufarbeitung des Produktes. Es entstehen größere Mengen an Zelldebris oder auch freigesetztem *host cell protein*, dass vom Produkt getrennt werden muss. Eine gute Produktionszelllinie würde demnach viel Produkt in kurzer Zeit bilden bei gleichzeitig vergleichsweise geringen Zelldichten. Bei wachstumsgekoppelten Produktionen, wie sie bei der CHO DP-12-Zelle vorliegen, sind diese beiden Ziele allerdings divergent und könnten nur durch eine Entkopplung der Produktion vom Wachstum erreicht werden. Eine Möglichkeit dazu wäre eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität. Aus diesem Grund wurden bei den durchgeführten Prozessen auch die Produktmengen und die daraus resultierenden Produktivitäten verfolgt. So sollte überprüft werden, ob die Reduktion der Transkription der Zielgene eine Möglichkeit zur Erhöhung des Produkttiters darstellte und sich diese Strategie somit für eine Zelllinienmodifikation eignete.

Abbildung 5.17 zeigt die Entwicklung der Produktkonzentration während der Batch-Kultivierung. Die Parentalzelllinie erreichte an Tag 6,9 mit 133 mg/L ihren maximalen

Antikörpertiter. Bereits an Tag 5,9 war die Antikörperkonzentration auf einen Wert von 131 mg/L gestiegen. Die Erhöhung um lediglich 2 mg/L sind vernachlässigbar gering und könnten ebenfalls aus einer Messungenauigkeit resultieren.

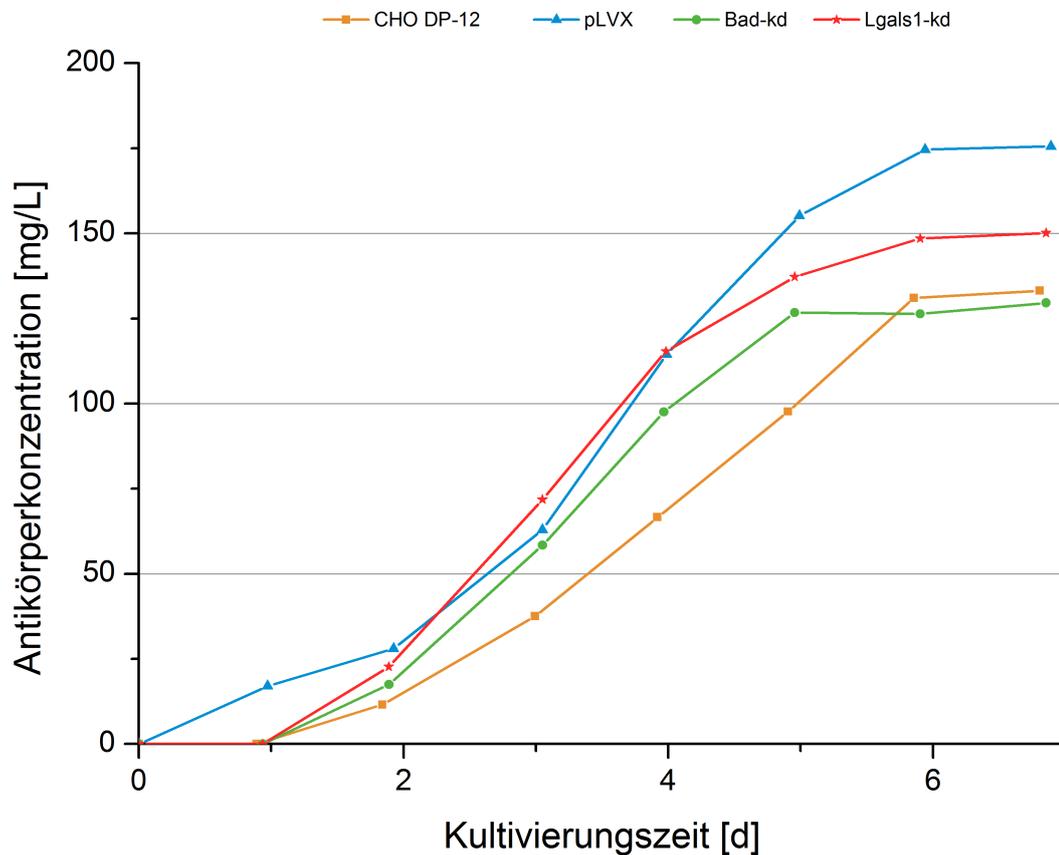


Abbildung 5.17: Entwicklung der Antikörperkonzentration im Verlauf der Kultivierungszeit der CHO DP-12-, pLVX-, *Bad-kd*- und *Lgals1-kd*-Zellen. Der höchste Titer wurde von den Zellen der Negativkontrolle produziert. Trotz einer höheren Lebendzellichte erreichten die *Bad-kd*-Zellen lediglich den gleichen Antikörpertiter wie die Referenzzellen. Das sichere Detektionslimit der Antikörperbestimmung (Abschnitt 4.5.3) lag bei etwa 10 mg/L. Daher war die Antikörperkonzentration in allen Kulturen zu Beginn der Kultivierung bei 0, da keine sichere Bestimmung unterhalb von 10 mg/L möglich war.

Damit korreliert das Erreichen des maximalen Produkttiters mit dem Erreichen der maximalen viablen Zelldichte. Als die Zellen nach Tag 5,9 abzusterben begannen, erhöhte sich auch die Antikörpermenge nicht mehr. Der Produkttiter der *Lgals1-kd*-Zellen lag während der gesamten Kultivierung über dem der Referenzzelllinie. Gleiches galt jedoch auch für die

Negativkontrolle. Interessanterweise erhöhte sich die Antikörperkonzentration der *Lgals1-kd*-Zellen jedoch bis Tag 6,9 auf einen finalen Wert von 150 mg/L. Dieses Verhalten ist untypisch, da sich die Zellen bereits ab Tag 4,9 in der Absterbephase befanden. Allerdings zeigten auch die pLVX-Zellen dieses atypische Verhalten. Auch bei ihnen fand eine Erhöhung des Antikörpertiters noch nach Erreichen der maximalen viablen Zelldichte statt. Dieses geänderte Produktionsverhalten ist demzufolge wahrscheinlich kein Effekt des gezielten *knockdowns* von *Lgals1*, sondern kann entweder auf die Transduktion und die Virusintegration oder auf die Selektion mit Puromycin zurückgeführt werden. Möglicherweise wurde durch diese Behandlungen ein Phänotyp mit verändertem Produktionsverhalten generiert oder selektioniert.

Anders als die Negativkontrolle und die *Lgals1-kd*-Zellen verhielten sich die *Bad-kd*-Zellen in Bezug auf die Produktkonzentration. Dort ist die Kopplung zwischen Produktbildung und Wachstum augenscheinlich noch vorhanden, da der maximale Antikörpertiter mit 127 mg/L an Tag 4,9, dem Kultivierungstag mit der höchsten Lebendzellichte der Zellen im Verlauf der Kultivierung, erreicht wurde. Obgleich die Antikörperkonzentration bis Tag 4,9 immer höher war, als die der Ausgangszelllinie, erreichten die *Bad-kd*-Zellen keinen höheren Produkttiter als die CHO DP-12-Zellen. Im Gegenteil, der maximale Titer war sogar 2,2 % geringer, als der der Parentalzelllinie. Dies kann durch die unterschiedlichen zellspezifischen Produktivitäten erklärt werden, die in Abbildung 5.18 dargestellt sind.

Die zellspezifische Produktivität der *Bad-kd*-Zellen lag zwischen den Tagen 1,9 und 4,9 stets unterhalb der der CHO DP-12-Zellen, wohingegen die der Negativkontrolle und die der *Lgals1-kd*-Zellen während der Wachstumsphase der Zellen oberhalb der Referenzkultur lag. Zum besseren Vergleich der zellspezifischen Produktivitäten wurden die durchschnittlichen Produktivitäten während der exponentiellen Phasen der Zellen bis zum Erreichen der maximalen Zelldichte berechnet (vgl. Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Maximale ($q_{P_{\max}}$) und durchschnittliche ($q_{P_{\emptyset}}$) zellspezifische Produktivität [pg/(Z · d)] während der Batch-Kultivierung der CHO DP-12-Zellen und drei transduzierten Zellpools. $q_{P_{\emptyset}}$ wurde während der exponentiellen Phase des Wachstums bis zum Erreichen der maximalen Antikörperkonzentration berechnet (Abschnitt 4.6.2), während $q_{P_{\max}}$ alle Zeitpunkte der Kultivierungsverläufe einschließt.

	CHO DP-12	pLVX	<i>Bad-kd</i>	<i>Lgals1-kd</i>
$q_{P_{\max}}$	9,8	29,3	11,5	13,6
$q_{P_{\emptyset}}$	6,7	8,2	6,9	9,6

Die erreichten Durchschnittswerte der Referenzkultur und der *Bad-kd*-Zellen glichen sich mit $6,7 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$ bzw. $6,9 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$. Für die Negativkontrolle und die *Lgals1-kd*-Zellen war die durchschnittliche spezifische Produktivität mit $8,2 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$ und $9,6 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$ allerdings höher, als die der Vergleichskultur. Wie bereits zuvor erwähnt, muss auch die Negativkontrolle, der pLVX-Zellpool, in die Evaluation mit einbezogen werden. Demnach hatte auch die Transduktion des Leervektors Auswirkungen auf das Wachstum, aber auch auf den Produkttiter und möglicherweise die zellspezifische Produktivität.

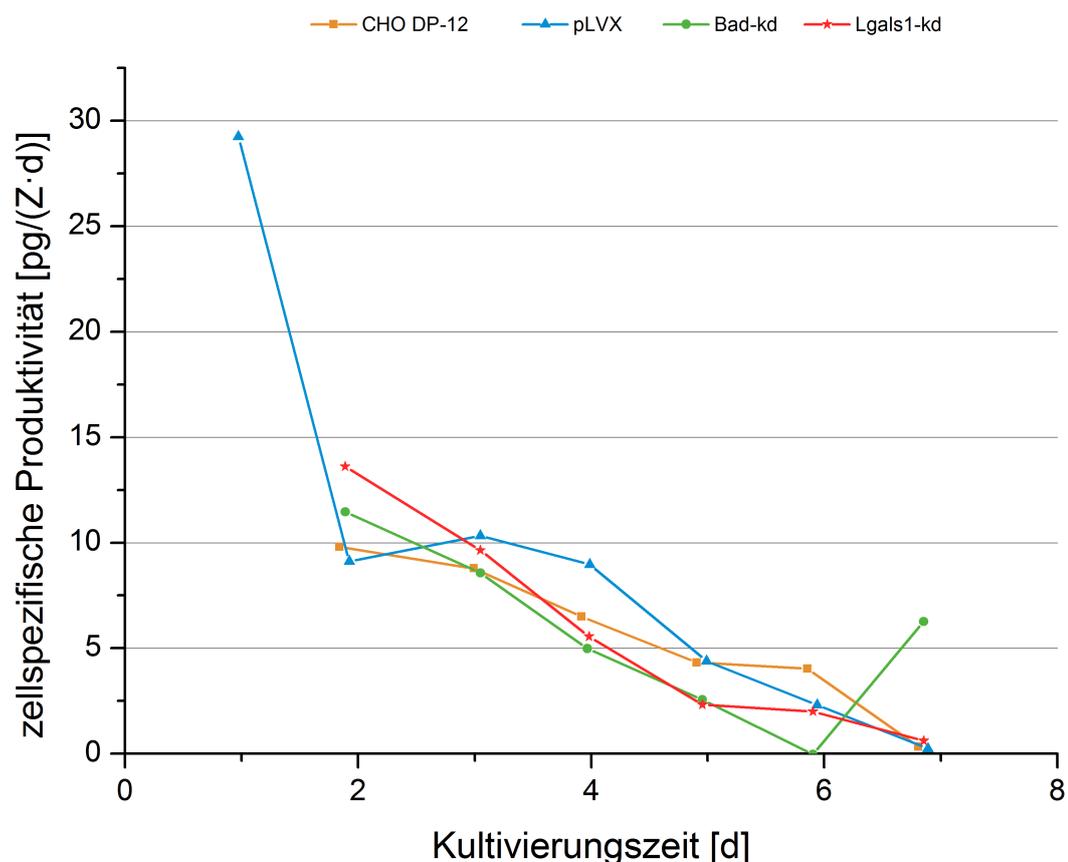


Abbildung 5.18: Verlauf der zellspezifischen Produktivität in $\text{pg}/(\text{Zelle} \cdot \text{d})$ während der Batch-Kultivierung der CHO DP-12-, pLVX-, *Bad-kd*- sowie der *Lgals1-kd*-Zellen. Aufgrund des bereits angesprochenen Detektionslimits für die Antikörperbestimmung, beginnen die Werte für die pLVX-Zellen bereits an Tag 1, da dort zu dem Zeitpunkt bereits Produkt gemessen werden konnte.

Auch der *Set-kd*-Zellpool wurde in einer Batch-Kultivierung in Bezug auf Wachstum und Produktivität hin untersucht. Dieser Versuchsansatz wurde in Kultivierungsröhrchen

durchgeführt (Abschnitt 4.3.2). Dazu wurden 15 mL Kultivierungsmedium, versetzt mit 5 µg/mL Puromycin, mit 4×10^5 Z/mL CHO DP-12-, pLVX- bzw. *Set-kd*-Zellen inokuliert. Die Kultivierungen wurden in zwei biologischen Replikaten durchgeführt, daher wurde auf eine Doppelbestimmung im Cedex verzichtet. In Abbildung 5.19 sind die Mittelwerte der Messungen während des Kultivierungsverlaufes dargestellt.

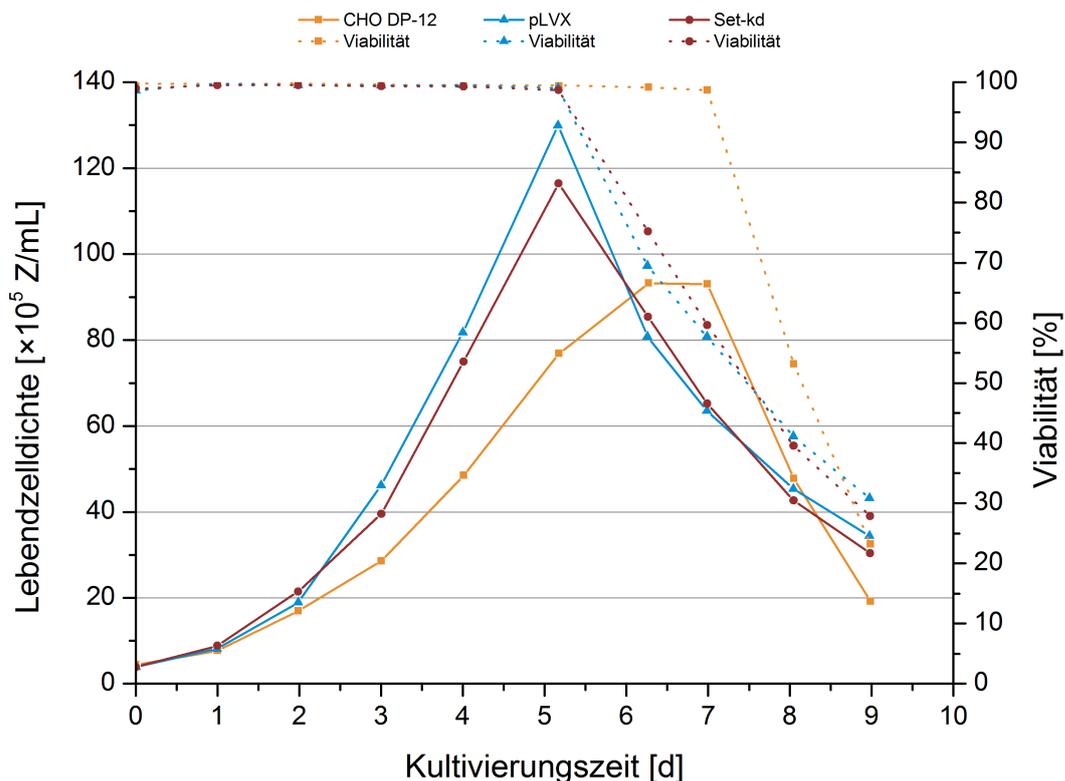


Abbildung 5.19: Lebendzelldichte und Viabilität der CHO DP-12- (orange), pLVX- (blau) und der *Set-kd*-Zellen (dunkelrot) während einer Batch-Kultivierung. Die modifizierten Zellen wuchsen auch hier zu höheren Lebendzelldichten als die Referenzkultur. Der Verlauf der Viabilität ist durch die farblich gekennzeichneten, gepunkteten Linien dargestellt.

Verglichen mit der Shaker-Kultivierung wuchs die CHO DP-12-Zelllinie etwa einen Tag länger. Dies kann auf das unterschiedliche Kultivierungssystem, oder auf die geringere Anfangszell-dichte zurückgeführt werden. Am Beispiel von Hybridomzellen konnte ein solcher Effekt bereits beschrieben werden (Ozturk & Palsson, 1990). Die Negativkontrolle erreichte auch in dieser Kultivierung nach 5,2 Kultivierungstagen ihre maximale Lebendzell-dichte. Das Absterbeverhalten unterschied sich ebenfalls von dem in der Shaker-Kultivierung. Zunächst sank die Lebendzell-dichte drastisch von 130×10^5 Z/mL auf 81×10^5 Z/mL gefolgt von

einer flachen Absterbekinetik. Dieser Verlust von ca. 50×10^5 viablen Zellen/mL innerhalb eines Tages ist in dieser Kultivierung deutlicher, als bei der Verwendung der Shaker als Kultivierungssystem. Dort verringerte sich die Lebendzell-dichte innerhalb des gleichen Zeitraums um lediglich ca. 33×10^5 Z/mL. Der Effekt ist daher wahrscheinlich auf die Unterschiede im Kultivierungssystem zurückzuführen.

Die *Set-kd*-Zellen wuchsen, ebenso wie die pLVX-Zellen, schneller und zu höherer maximaler Lebendzell-dichte als die Referenzkultur. Dennoch war die maximale Lebendzell-dichte des *Set-kd*-Zellpools mit 116×10^5 Z/mL geringer, als die der Negativkontrolle, die 130×10^5 Z/mL erreichte. Da das SET-Protein in die Histon-Acetylierung und nicht in Wachstumsprozesse involviert ist, war nicht zu erwarten, dass sich das Wachstumsverhalten von dem der Negativkontrolle unterschied (vgl. Abschnitt 3.4.1). Da die Leervektor-Transduktion oder die nachfolgende Puromycin-Selektion die Wachstumscharakteristik der modifizierten Zellen änderte, ist die erhöhte Lebendzell-dichte des *Set-kd*-Zellpools im Vergleich zur Parentalzelllinie normal. Allerdings könnte der *knockdown* von *Set* Einfluss auf die Produktivität der Zellen haben, was in den erzielten Produkttitern oder der zellspezifischen Produktivität (Abbildung 5.20) nachvollzogen werden könnte.

An den Tagen 2 und 3 wurden keine Proben für die Antikörperbestimmung eingefroren, aus diesem Grund fehlen dort die Datenpunkte. Die Entwicklung und die erreichten Antikörpertiter waren im Fall der Referenzkultur ähnlich zu denen der Shaker-Kultivierung. Im Gegensatz zur Shaker-Kultivierung stagnierte die Zunahme des Produkttiters jedoch nicht direkt mit dem Erreichen der maximalen Lebendzell-dichte. Sie erhöhte sich nach Tag 7 noch um 13 mg/L, von 143 mg/L auf den finalen Titer von 156 mg/L. Die erzielte Antikörperkonzentration des pLVX-Zellpools war mit 200 mg/L ebenfalls höher als die in der Shaker-Kultivierung erreichte Produktkonzentration (176 mg/L). Dies ist aber wahrscheinlich auf die etwa 21 % höhere maximale Lebendzell-dichte zurückzuführen und war somit zu erwarten. Interessanterweise verhielt sich der *Set-kd*-Zellpool in Bezug auf den Produkttiter und die zellspezifische Produktivität fast identisch zur Negativkontrolle. Auch dort lag der maximal erreichte Produkttiter bei 200 mg/L. Die Produktivität wies keine deutlichen Unterschiede zur Negativkontrolle auf.

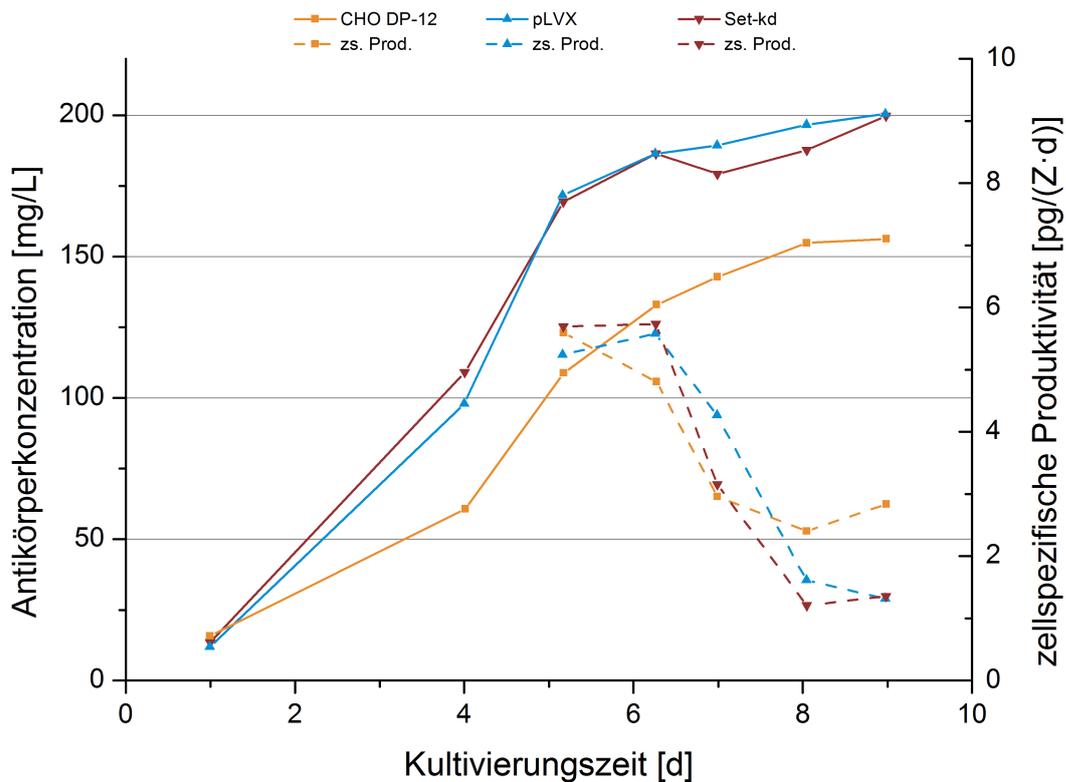


Abbildung 5.20: Antikörpertiter und zellspezifische Produktivität (zs. Prod.) der CHO DP-12-, pLVX- und *Set-kd*-Zellen während der durchgeführten Batch-Kultivierung. Aufgrund der nicht vorhandenen Datenpunkte an den Kultivierungstagen 2 und 3, wurde die zellspezifische Produktivität, dargestellt in gepunkteten Linien, erst ab Tag 5 berechnet (Abschnitt 4.6.2).

Im Zell-Zeit-Integral (Abbildung 5.21) erreichte die Referenzkultur die geringsten Werte im Vergleich zu den anderen beiden Kulturen. Das mit $536 \times 10^5 \text{ Z} \cdot \text{d} \cdot \text{mL}^{-1}$ höchste Integral, wurde von der Negativkontrolle produziert. Zwar war das Zell-Zeit-Integral der *Set-kd*-Zellen ebenfalls höher, als das der Referenzkultur, es war jedoch mit $506 \times 10^5 \text{ Z} \cdot \text{d} \cdot \text{mL}^{-1}$ geringer als das der Negativkontrolle.

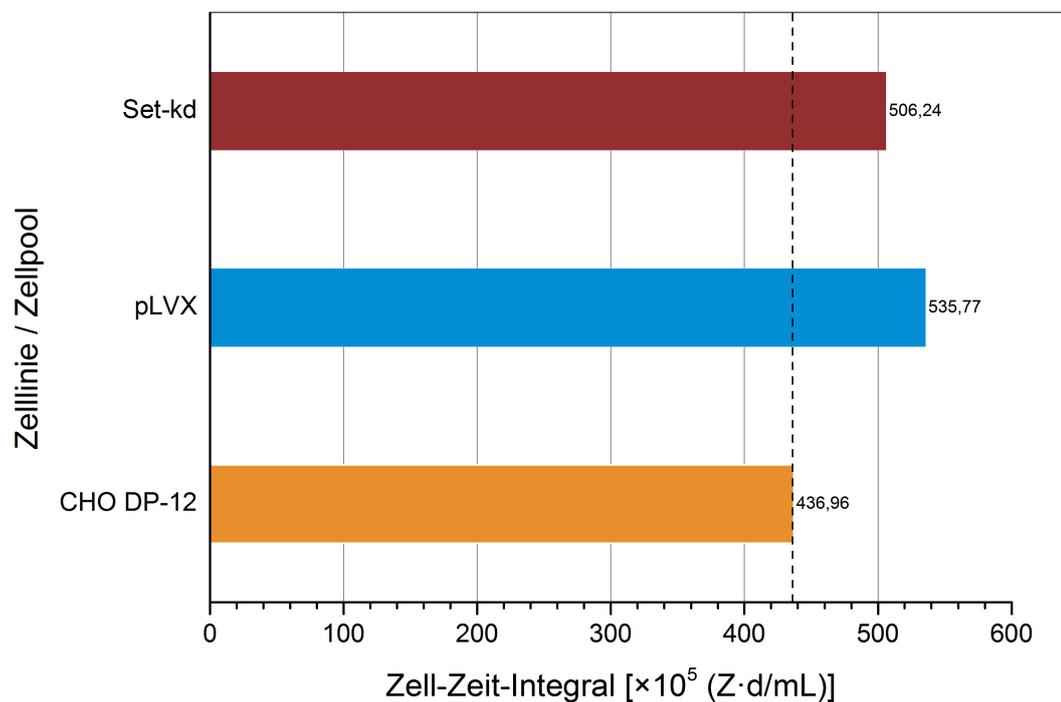


Abbildung 5.21: Integral der viablen Zellen über den gesamten Kultivierungsverlauf des Batches mit den CHO DP-12-, pLVX- und den *Set-kd*-Zellen. Die modifizierten Zellen erreichten insgesamt höhere Zell-Zeit-Integrale als die Referenzkultur. Das höchste Integral konnte die Negativkontrolle erreichen.

Im Verlauf einer Batch-Kultivierung kann es unter Umständen früh zu Limitierungen kommen, die möglicherweise verhindern, dass das volle Potential eines Gen-*knockdowns* beobachtet werden kann. Wong *et al.* (2006) beispielsweise konnten zwar bereits im Batch von mit siRNA-modifizierten CHO-Zellen Effekte des *knockdowns* beobachten, diese wurden jedoch durch den Fed-Batch deutlicher hervorgehoben. Das frühe Absterben der *Lgals1-kd*-Zellen könnte z. B. durch Limitierungen entstanden sein. Die zellspezifische Produktivität dieser Zellen war im Durchschnitt höher als die der Referenzkultur (vgl. Tabelle 5.3). Daher war es sinnvoll, die Wachstums- und Produktionsphase durch einen Fed-Batch zu verlängern. Die Ergebnisse der Fed-Batch-Kultivierung sind im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.2.6 Shaker-Fed-Batch-Parallelkultivierung der CHO DP-12-Parentalzelle, des pLVX-, *Set-kd*-, *Bad-kd*- und *Lgals1-kd*-Zellpools

Mit den erzeugten *knockdown*-Zellpools sowie der Negativkontrolle und der Referenzkultur wurde eine Fed-Batch-Kultivierung durchgeführt (Abschnitt 4.3.5). Damit sollten Limitierungen in der frühen Wachstumsphase vermieden werden, um mögliche Unterschiede zwischen den modifizierten Zellen und der Referenzkultur sichtbar werden zu lassen. Zu diesem Zweck wurden die *knockdown*-Zellen, die pLVX-Zellen und die CHO DP-12-Zellen aus der Kryokonservierung aufgetaut und für etwa zwei Wochen kultiviert (Abschnitte 4.3.4 und 4.3.2), damit keine Effekte durch die Kryokonservierung das Ergebnis des Fed-Batches beeinflussten. Nach einer Passagierung der Zellen auf eine Zelldichte von 5×10^5 Z/mL in 20 mL Kulturvolumen, supplementiert mit 5 mM Glutamin, begann die Fed-Batch-Kultivierung. Dabei wurde auch hier initial bei den transduzierten Zellen Puromycin in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ zugesetzt. Täglich wurden Doppelbestimmungen im Cedex durchgeführt (Abschnitt 4.3.3) sowie zellfreier Überstand zur Antikörper-, Aminosäure-, Glukose- und Laktatanalytik eingefroren. Da aus allen Shakern stets das gleiche Volumen entnommen wurde, bzw. die gleiche Menge *Feed* zugegeben wurde, sind an dieser Stelle die Lebendzellichten dargestellt. Eine separate Darstellung der Lebendzellzahlen ist in Grafik A.8 im Anhang abgebildet. Das Abbruchkriterium war das Erreichen einer Viabilität ≤ 40 %.

Der Verlauf der Fed-Batch-Kultivierung ist in Form der Lebendzellichte und der Viabilität in Grafik 5.22 abgebildet. Bis Tag 0,7 wuchsen alle Zellpools und die Referenzkultur noch identisch. Zu diesem Zeitpunkt wurde die manuelle Zufütterung gestartet (Abschnitt 4.3.5). Bereits nach einem weiteren Tag (Zeitpunkt 1,7) begannen sich die Lebendzellichten der verschiedenen Zellpools unterschiedlich zu entwickeln. Die *Lgals1-kd*-Zellen zeigten ab diesem Zeitpunkt, bis zu dem Beginn ihrer Absterbephase an Tag 8,8, kontinuierlich die höchste Lebendzellichte. Sie erreichten an Tag 7,7 mit 203×10^5 Z/mL ihre maximale viable Zelldichte und zugleich auch die höchste Lebendzellichte aller Zellpools dieser Parallelkultivierung. Nach Tag 8,8 sank die Lebendzellichte jedoch sehr sprunghaft von 191×10^5 Z/mL auf 123×10^5 Z/mL an Tag 9,8. Der Verlust an viablen Zellen in diesem Zeitraum ist bei den *Lgals1-kd*-Zellen am stärksten ausgeprägt. Die Zelldichten der übrigen Zellpools verringerten sich zwar ebenfalls, aber weniger drastisch als die der *Lgals1-kd*-Zellen. Somit erreichten sie auch etwa einen Tag vor den *Bad-kd*-Zellen und vor der Referenzkultur das Abbruchkriterium.

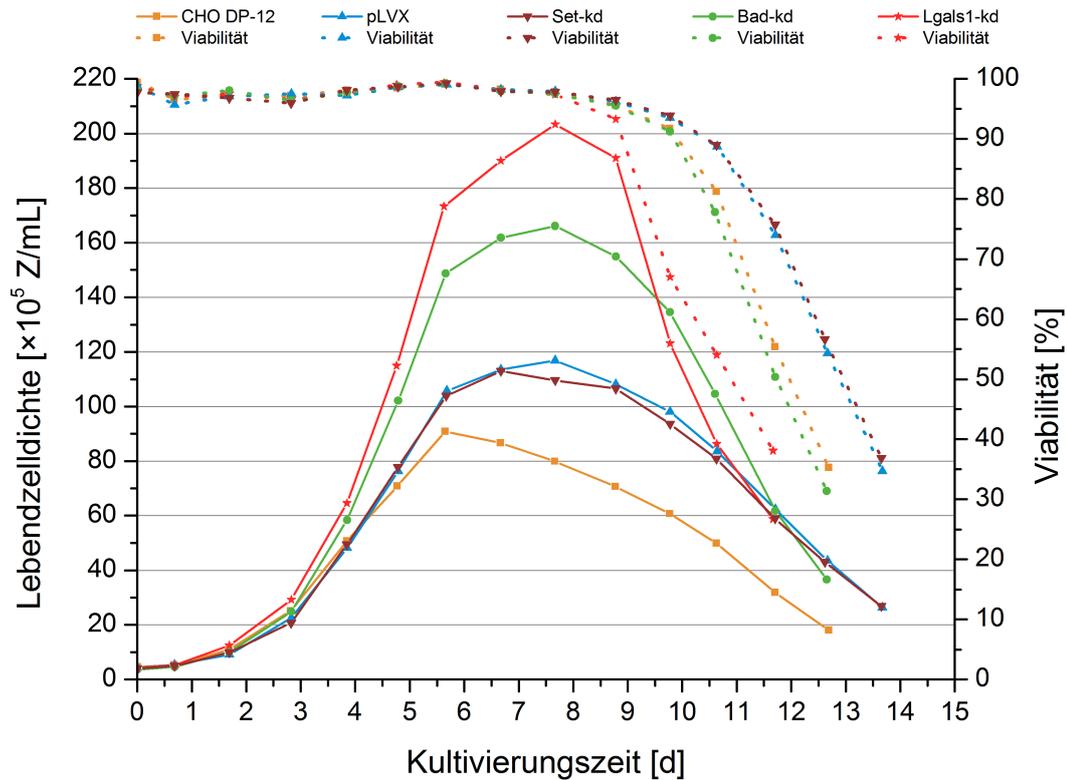


Abbildung 5.22: Shaker-Fed-Batch-Kultivierung der CHO DP-12- (orange), pLVX- (blau), *Set-kd*- (dunkelrot), *Bad-kd*- (grün) und *Lgals1-kd*-Zellen (rot). Dargestellt sind die Lebendzellichten in durchgezogenen und die Viabilitäten in gepunkteten Linien im Verlauf der Kultivierungszeit in Tagen. Die höchste Lebendzellichte wurde von den *Set-kd*-Zellen produziert, gefolgt von den *Bad-kd*-Zellen. Die Negativkontrolle und die *Set-kd*-Zellen wuchsen fast identisch und erzielten ebenfalls höhere Lebendzellichten als die Referenzkultur.

Die *Bad-kd*-Zellen ähnelten ihrem Verlauf nach zunächst den *Lgals1-kd*-Zellen. Allerdings war ihre Zelldichte auch in der Anfangsphase stets geringer als die der *Lgals1-kd*-Zellen. Bei beiden Zellpools reduzierte sich die Wachstumsgeschwindigkeit ab etwa Tag 5,7. Die Lebendzellichte der *Bad-kd*-Zellen nahm zwar noch bis auf ein Maximum von 166×10^5 Z/mL an Tag 7,7 zu, jedoch mit geringerer Geschwindigkeit als in der Anfangsphase des Fed-Batches. In der exponentiellen Phase zwischen Tag 1,7 und Tag 5,6 lag die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\varnothing} in der *Bad-kd*-Kultur bei $0,69 \text{ d}^{-1}$, in der *Lgals1-kd*-Kultur bei $0,70 \text{ d}^{-1}$. Damit besaßen die *Lgals1-kd*-Zellen nur eine unwesentlich höhere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit, erreichten aber dennoch eine höhere Maximalzellichte (vgl. Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: Berechnete maximale (μ_{\max}) und durchschnittliche (μ_{\emptyset}) Wachstumsgeschwindigkeiten [d^{-1}] der Referenzkultur und der Zellpools im Verlauf der Fed-Batch-Kultivierung (Abschnitt 4.6.1). Während μ_{\max} aus allen berechneten Wachstumsgeschwindigkeiten einer Kultur bestimmt wurde, bezieht sich μ_{\emptyset} auf die exponentielle Phase der jeweiligen Kultur, die zwischen den Tagen 1,7 und 5,6 lag.

	CHO DP-12	pLVX	<i>Set-kd</i>	<i>Bad-kd</i>	<i>Lgals1-kd</i>
μ_{\max}	0,73	0,80	0,85	0,83	0,85
μ_{\emptyset}	0,56	0,58	0,60	0,69	0,70

Die *Set-kd*-Zellen und die pLVX-Negativkontrolle wuchsen in der Fed-Batch-Kultivierung praktisch identisch sowohl was die Lebendzellichte, als auch die Viabilität betraf. Die Absterbephase der *Set-kd*-Zellen begann lediglich einen Tag früher, an Tag 6,7, als bei der Negativkontrolle. Ab Tag 8,8 war die Lebendzellichte aber wieder annähernd gleich. Wie im Batch-Experiment zuvor (Abschnitt 5.2.5) wuchsen Negativkontrolle und *Set-kd*-Zellpool erneut besser als die Referenzkultur. Die Verlängerung der Absterbephase durch Zugabe des *Feed*-Mediums wirkte sich dies auch auf das Zell-Zeit-Integral aus (Abbildung 5.23).

Der Vergleich der Zell-Zeit-Integrale der pLVX-Zellen und des *Set-kd*-Zellpools ergab mit $226 \times 10^7 \text{ Z} \cdot \text{d}$ und $220 \times 10^7 \text{ Z} \cdot \text{d}$ große Ähnlichkeit. Sie waren damit 48,5 % bzw. 44,4 % größer als das der Referenzkultur. Die Zell-Zeit-Integrale der *Bad-kd*- und der *Lgals1-kd*-Zellpools wiesen höhere Werte sowohl im Vergleich mit der Referenzkultur, als auch im Vergleich mit der Negativkontrolle auf. Bezogen auf die Parentalzelllinie erreichten die *Bad-kd*-Zellen ein 84,2 % höheres Zell-Zeit-Integral, die *Lgals1-kd*-Zellen ein um 92,2 % höheres Integral. Damit war die Ausbeute an viablen Zellen während der Fed-Batch-Kultivierung annähernd doppelt so hoch, wie bei der Kultivierung der CHO DP-12-Parentalzelllinie.

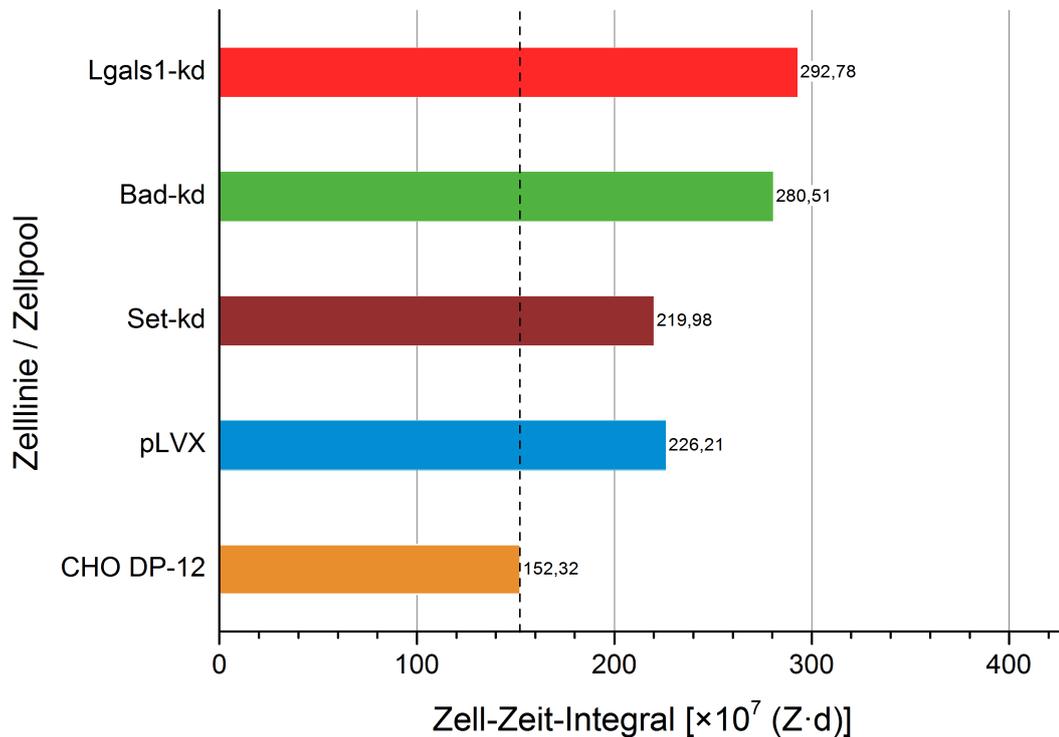


Abbildung 5.23: Darstellung der berechneten Zell-Zeit-Integrale der im Fed-Batch kultivierten Zellen. Die gestrichelte vertikale Linie dient als Markierung des Zell-Zeit-Integrals der Referenzkultur. Im Gegensatz zum Batch-Experiment erreichten die *Lgals1-kd*-Zellen annähernd doppelt so hohe Werte wie die Referenzkultur. Obwohl die Negativkontrolle ebenfalls ein höheres Integral besaß als die CHO DP-12-Zellen, war dies dennoch geringer als das der *Lgals1-kd*- und der *Bad-kd*-Zellen. Lediglich die *Set-kd*-Zellen wiesen ein geringeres Integral auf als die Negativkontrolle. Im Vergleich zu den Zell-Zeit-Integralen der Batch-Kultivierungen ist die Dimensionsänderung der Werte zu beachten. Da bei diesen Integralen die Änderungen des Kulturvolumens mit einbezogen wurden, ist die Dimension des jeweiligen Zell-Zeit-Integrals in $\times 10^7$ (Z·d) angegeben.

Der Verlauf der Produktkonzentration während des Fed-Batches ist in Abbildung 5.24 gezeigt. Der mit 176 mg/L geringste Produkttiter wurde von der Referenzkultur produziert. Dieser lag damit höher als in der Batch-Kultivierung (Abschnitt 5.2.5), was aber durch das längere Wachstum zu begründen war. Während der Batch-Kultivierung wurden Antikörperkonzentrationen von 133 mg/L bzw. 156 mg/L für die CHO DP-12-Zelllinie erzielt. Auch in der Fed-Batch-Kultivierung ist die Wachstumskopplung der Antikörperproduktion deutlich. Mit dem Erreichen der maximalen Zelldichte an Tag 6,7 nahm auch die Antikörperkonzentration ab.

tration nicht mehr zu. Gegen Ende der Kultivierungszeit nahm der Titer wieder ab. Dies ist vermutlich auf eine Degradation des Produktes, hervorgerufen durch die längere Kultivierungszeit, oder aber auch durch bei der Zellyse freigesetzte Proteasen zurückzuführen. Der Antikörpertiter des pLVX-Zellpools war mit 238 mg/L höher als in der vorherigen Batch-Kultivierung. Dies war ebenfalls auf die verlängerte Kultivierungsphase zurückzuführen. Die Produktkonzentration der *Set-kd*-Zellen entwickelte sich identisch zu der der Negativkontrolle. Dieses Verhalten war übereinstimmend mit den vorherigen Beobachtungen aus der Batch-Kultivierung. Im Fall des *knockdowns* von *Bad* verlief die Produktkonzentration trotz höherer Lebendzellichten im Vergleich zu der Negativkontrolle und der Referenzkultur ebenfalls fast identisch zu der der pLVX-Zellen.

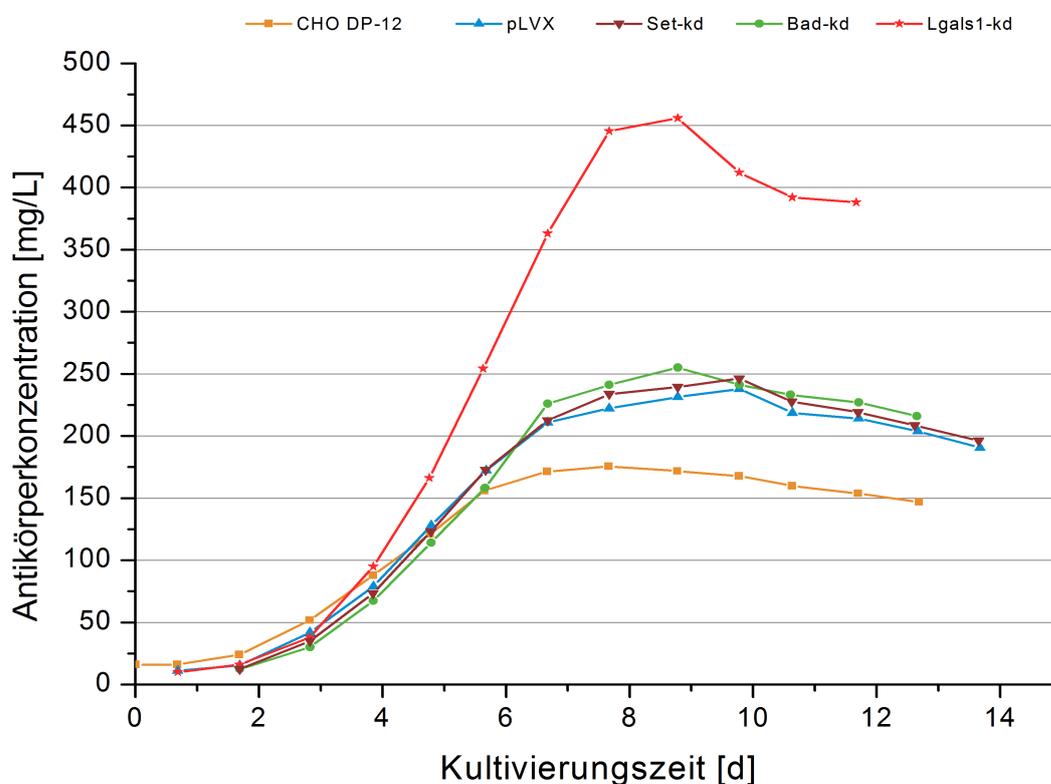


Abbildung 5.24: Entwicklung der Antikörperkonzentration der im Fed-Batch kultivierten Zellen. Alle Zellpools generierten höhere Produkttiter, als die Ausgangszelllinie. Jedoch war nur der Produkttiter der *Lgals1-kd*-Zellen auch deutlich höher als der der Negativkontrolle.

Einzig die Produktkonzentration des *Lgals1-kd*-Zellpools zeigte einen deutlichen Unterschied sowohl zu der Referenzkultur, als auch zu der Negativkontrolle. Dort wurde ein ma-

ximaler Titer von 456 mg/L an Kultivierungszeitpunkt 8,8 gemessen. Die erreichte Antikörperkonzentration lag damit 159,1 % über dem Maximalwert der Referenzkultur und 91,6 % über dem der Negativkontrolle. Es ist zu beachten, dass nach Erreichen des Maximalwertes an Tag 8,8, was ebenfalls mit dem Zeitpunkt der maximal erreichten Lebendzell-dichte korrespondierte, der Antikörpertiter innerhalb eines Tages um 44 mg/L sank. Auch an den darauffolgenden Tagen nahm die Produktkonzentration stetig ab. Diese Beobachtung korrelierte wiederum mit der Entwicklung der viablen Zelldichte bzw. der Viabilität (vgl. Abbildung 5.22). Nach Tag 8,8 sanken sowohl die Lebendzell-dichte, als auch die Viabilität um 68×10^5 Z/mL bzw. 26,3 %. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass das Produkt möglicherweise durch freigesetzte Proteasen degradiert wurde. Zusätzlich wurde die Kultur weiter mit *Feed* versorgt, was zu einer Verdünnung des Antikörpers bei stagnierender Produktion und möglicherweise Degradation führte.

Aus den Daten war abzuleiten, dass eine Erhöhung der maximalen Lebendzell-dichte nicht notwendigerweise mit der Erhöhung des Produkttiters korrelierte (vgl. Kulturverlauf und Produkttiter *Bad-kd*-Zellpool mit Referenzkultur und Negativkontrolle). Daher wurden die zellspezifischen Produktivitäten der einzelnen Zellpools während der Kultivierung bestimmt (Abbildung 5.25).

Die spezifische Produktivität der Referenzkultur ist während der Kultivierung bis auf wenige Ausnahmen an allen Zeitpunkten die geringste, verglichen mit den übrigen ermittelten Werten. Interessanterweise entwickelte sich die spezifische Produktivität der *Bad-kd*-Zellen vergleichbar zu der der Referenzkultur. Trotz des schnelleren Wachstums und der höheren viablen Zelldichte, war die Produktbildung von dem *knockdown* von *Bad* nicht positiv beeinflusst. Die zellspezifische Produktivität der pLVX- und der *Set-kd*-Zellen verlief während der Kultivierung ebenfalls fast identisch. Sie unterschieden sich kaum von der der Referenzkultur. Die zellspezifische Produktivität des *Lgals1-kd*-Zellpools war während der exponentiellen Phase des Wachstums höher als die der Referenzkultur und der pLVX-Negativkontrolle.

Zum besseren Vergleich wurden die durchschnittlichen zellspezifischen Produktivitäten bis zum Erreichen des maximalen Produkttiters berechnet. Die zellspezifische Produktivität der Referenzkultur lag bei $6,9 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$, die der Negativkontrolle bei $5,9 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$. Folglich beruhte der höhere Titer der Negativkontrolle lediglich auf der erhöhten Zelldichte und wahrscheinlich nicht auf einer Veränderung in der Produktivität. Wie zuvor bereits erwähnt, ist auch die Transduktion eines leeren Vektors eine Modifikation einer Zelllinie und kann ihre phänotypischen Eigenschaften verändern. Da der transduzierte Leervektor pLVX-shRNA1, abgesehen von der Puromycin-Resistenz, keinerlei weitere Eigenschaften vermittelt, ist eine Veränderung des Wachstums durch Integration und damit *knockout* von wachstumsinhibierenden Genen eine der Möglichkeiten der erzeugten Veränderung. Eine Integration in das

Produktgen, im Fall der CHO DP-12-Zelle entweder in die cDNA der schweren oder der leichten Kette, würde die generierte Produktmenge bzw. die zellspezifische Produktivität senken. Dies kann durch eine erhöhte Lebendzellzahl kompensiert werden, wodurch gleiche oder höhere Produkttiter im Vergleich zu der unbehandelten Referenz erreicht werden können.

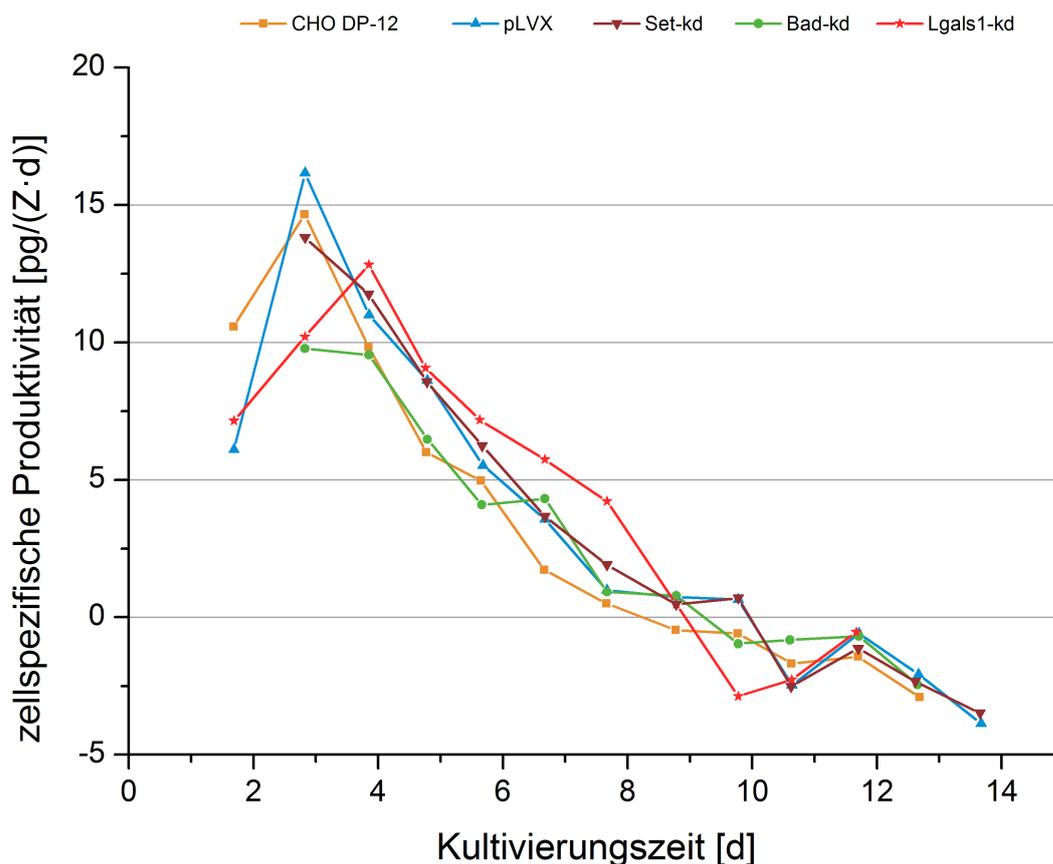


Abbildung 5.25: Zellspezifische Produktivität im Verlauf der Kultivierungszeit in Tagen während des Fed-Batches. Die Unterschiede in der zellspezifischen Produktivität zwischen den Zellpools und der Negativkontrolle sind vor allem während der exponentiellen Wachstumsphase zu beobachten. In dieser Zeit hatten die *Lgals1-kd*-Zellen die höchste zellspezifische Produktivität aller Zellen in der Vergleichskultivierung.

Zudem ist zu beachten, dass es sich bei der betrachteten Kultur um eine Population und nicht um eine klonale Zelllinie handelte. Alle diese Zellen waren resistent gegen Puromycin, aber der Integrationsort des Vektors variierte mit großer Wahrscheinlichkeit von Zelle zu Zelle. Das könnte bedeuten, dass Zellen in der Population vorhanden waren, die beispielsweise

durch Integration des Vektors in die Antikörper-cDNAs kaum noch Produkt gebildet haben. Auf andere Zellen der Population muss dies nicht notwendigerweise zugetroffen haben. Dadurch konnte das gesteigerte Wachstum, verbunden mit dem höheren Antikörpertiter und der geringeren durchschnittlichen zellspezifischen Produktivität erklärt werden.

Tabelle 5.5: Berechnete maximale ($q_{P_{\max}}$) und durchschnittliche ($q_{P_{\emptyset}}$) zellspezifische Produktivität [$\text{pg}/(\text{Z} \cdot \text{d})$] der verschiedenen Kulturen während des Fed-Batches. $q_{P_{\emptyset}}$ bezieht sich auf die Produktionsphase, bis zum Erreichen des maximalen Antikörpertiters. $q_{P_{\max}}$ ist aus allen Zeitpunkten der Kultivierung bestimmt.

	CHO DP-12	pLVX	<i>Set-kd</i>	<i>Bad-kd</i>	<i>Lgals1-kd</i>
$q_{P_{\max}}$	14,7	16,2	13,8	9,8	12,8
$q_{P_{\emptyset}}$	6,9	5,9	5,9	5,1	7,1

Die durchschnittlichen zellspezifischen Produktivitäten des *Bad*- und des *Set-kd*-Zellpools lagen bei $5,1 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$ bzw. $5,9 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$ (vgl. Tabelle 5.5). Damit waren auch sie niedriger, als die der unbehandelten Referenzkultur, aber ähnlich zu der Negativkontrolle, die eine durchschnittliche zellspezifische Produktivität von $5,9 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$ besaß. Die *Bad-kd*-Zellen schienen daher tatsächlich eine niedrigere durchschnittliche zellspezifische Produktivität aufzuweisen als die Referenzkultur und als die Negativkontrolle. BAD sollte als pro-apoptotisches Protein in der Apoptose-Kaskade keinerlei Rolle in der Produktbildung spielen. Lediglich über die Erhöhung des Zell-Zeit-Integrals bzw. der Zunahme der maximalen Lebendzellichte wäre dementsprechend eine Erhöhung des Produkttiters zu erwarten gewesen. Die möglicherweise geringere zellspezifische Produktivität mag ähnlich zu erklären sein wie die beobachteten Unterschiede der pLVX-Zellen zur Referenzkultur. Der *knockdown* von *Bad* hatte sich in einer Erhöhung der maximalen Zelldichte und des Zell-Zeit-Integrals ausgewirkt, jedoch lag die Zunahme des Produkttiters lediglich in den Dimensionen der Negativkontrolle. Möglicherweise waren auch hier die lentiviralen Genome in die Produkt-cDNAs integriert worden, so dass es stärker- und weniger stark-produzierende Zellen im *pool* gab. Zusammengenommen reichte die Produktivität der Population nicht aus, um eine deutliche Erhöhung des Antikörpertiters im Vergleich zur Negativkontrolle zu erzielen.

Mit $7,1 \text{ pg} \cdot (\text{Z} \cdot \text{d})^{-1}$ konnte in der Population der *Lgals1-kd*-Zellen eine leicht erhöhte durchschnittliche zellspezifische Produktivität berechnet werden. Das würde bedeuten, dass die Verringerung von *Lgals1* sowohl einen Einfluss auf die maximale Lebendzellichte und das Zell-Zeit-Integral, als auch auf die durchschnittliche zellspezifische Produktivität hatte. Auch hier ist wieder zu beachten, dass die Daten aus einem *pool* und keiner klonalen Zelllinie

stammten. So kann der Phänotyp einer Subpopulation der Zellen anders sein, als der hier betrachtete durchschnittliche Phänotyp.

5.2.7 Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse aus Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen

Im Folgenden sollen die verschiedenen Ergebnisse der Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen interpretiert werden. Zunächst war festzustellen, dass die transduzierten Zellen sowohl in der Batch-, als auch in der Fed-Batch-Kultivierung ein anderes Wachstumsverhalten besaßen als die Referenzkultur. Dies galt ebenfalls für die Negativkontrolle, in deren Fall ein leerer pLVX-shRNA1-Vektor transduziert worden war (Abschnitt 5.1.3). Die *Set-kd*-Zellen verhielten sich in Bezug auf das Wachstum, das Zell-Zeit-Integral, die Produktivität und den erreichten Produkttiter annähernd identisch zur Negativkontrolle. Die mit *anti-Bad*- und mit *anti-Lgals1*-shRNA-Expressionsvektoren transduzierten Zellen zeigten zu Beginn des Batches ein ähnliches Wachstumsverhalten, in dem sie zu höheren Lebendzellichten wuchsen, als die Referenzkultur und die Negativkontrolle. Dabei erreichten die *Bad-kd*-Zellen im Batch-Ansatz die höchste viable Zelldichte und das höchste Zell-Zeit-Integral (Abschnitt 5.2.5). Dies spiegelte sich allerdings weder in der Produktivität, noch im Antikörpertiter wider. Die Produktivität war vergleichbar zu der der Referenzkultur, zum Teil sogar niedriger. Der erreichte Produkttiter unterschied sich nicht zu dem der Ausgangszelllinie. Die *Lgals1-kd*-Zellen verloren früher als die übrigen Kulturen an Viabilität und viabler Zelldichte. Dies führte dazu, dass das Zell-Zeit-Integral geringer ausfiel, als das der Referenzkultur. Dennoch war der erreichte Produkttiter im Vergleich zu dem der CHO DP-12-Kultur höher. Eine Aussage über die Produktivität ist bei einem kurzen Zeitraum schwierig, da die Werte möglicherweise Schwankungen unterliegen und die Aussage dadurch verfälscht wird. Nichtsdestoweniger war die zellspezifische Produktivität der *Lgals1-kd*-Zellen während der exponentiellen Phase des Wachstums höher, als die der Referenzzellen (Abschnitt 5.2.5).

Im folgenden Fed-Batch-Experiment konnten einige der bereits im Batch gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden. Die *Set-kd*-Zellen entwickelten sich auch dort praktisch identisch zur pLVX-Negativkontrolle sowohl was das Wachstum, als auch die Produktbildung betraf. Der *Bad-kd*-Zellpool erreichte höhere maximale viable Zelldichten und ein größeres Zell-Zeit-Integral als die Negativkontrolle und die CHO DP-12-Parentalzelllinie. Allerdings wurde trotz höherer Zellzahl lediglich die gleiche Antikörperkonzentration wie die der pLVX-Negativkontrolle produziert. Die berechneten Produktivitäten waren durchschnittlich geringer, als die der Vergleichskulturen. Dessen ungeachtet entwickelte sich der *Lgals1-kd*-Zellpool unter Fed-Batch-Bedingungen anders, als durch das vorherige Batch-Experiment zu

vermuten gewesen wäre. Die maximale viable Zelldichte und das Zell-Zeit-Integral konnten durch den *knockdown* von *Lgals1* im Fed-Batch annähernd verdoppelt werden. Ebenso war der erreichte Antikörpertiter ca. 160 % bzw. 92 % höher als der der Referenzkultur bzw. der Negativkontrolle. Es konnten ebenfalls Auswirkungen auf die Produktivität vermutet werden, da die durchschnittliche Produktivität während der exponentiellen Phase bzw. bis zum Erreichen des maximalen Produkttiters höher war, als in der Referenzkultur und der Negativkontrolle (Abschnitt 5.2.6).

Zusammengenommen ermöglichen diese Ergebnisse eine Beurteilung der getesteten Zielgene für ihren Einsatz im Bereich der Zelllinienentwicklung. Der *knockdown* von *Set* hatte bei allen betrachteten Parametern wie Wachstum, Produktivität und Produktquantität keinen Einfluss auf die CHO DP-12-Zelle. Zwar waren der erzeugte Produkttiter und die erreichte Maximalzelldichte höher, als die der Ausgangszelllinie, allerdings waren sie fast identisch mit denen der Negativkontrolle. Da jede Manipulation an einer Zelle sich auf deren phänotypische Eigenschaften auswirken kann, erhöhte auch die Transduktion des Leervektors die Zelldichte und damit verbunden gegebenenfalls den Antikörpertiter. Dies bedeutet, dass die nachgewiesene Reduktion der *Set*-mRNA (Abschnitt 5.2.1.3) nicht verantwortlich für die im Vergleich zur Parentalzelllinie veränderten Wachstumseigenschaften und Produktquantitäten war.

Der Beitrag des SET-Proteins zur Produktivität einer Produktionszelllinie muss zudem noch aufgeklärt werden. Bisherige Studien haben gezeigt, dass SET in Verbindung mit MCPH1 (Microcephalin) die Kondensation der Chromosomen erhöht (Leung *et al.*, 2011). Weiterhin wurde gezeigt, dass es die Demethylierung von DNA inhibiert (Cervoni *et al.*, 2002). Dieser Effekt wird zusätzlich durch die Eigenschaft von SET unterstützt, die Acetylierung von Histonen zu inhibieren. Dies trägt zur Aufrechterhaltung des hypermethylierten Zustands der DNA bei, da eine Hyperacetylierung für eine Demethylierung notwendig ist (Cervoni & Szyf, 2001). Zusammengenommen sind dies alles Eigenschaften, die die Produktivität einer Zelle durch Verminderung des Zugangs der transkriptionellen Maschinerie zur DNA, durch Aufrechterhaltung eines methylierten Zustands, aber auch durch Inhibierung der Acetylierung, reduzieren sollte. Der *knockdown* von *Set* hätte dementsprechend die Produktivität erhöhen können. Letztlich können drei verschiedene Theorien aufgestellt werden, warum keine Produktivitätssteigerung detektiert wurde. Eine Erklärung wäre die Tatsache, dass es zwei Transkriptionsvarianten von *Set* gibt, die beide die Acetylierung von Histonen inhibieren. Die shRNA und ebenso die qRT-PCR Primer hätten allerdings keinen Unterschied zwischen diesen Varianten machen sollen, da sie sich lediglich im ersten Exon unterscheiden (vgl. orthologe *M. musculus*-Sequenz, Ensembl-ID: ENSMUSG00000054766). Möglicherweise konnte die shRNA aus einem ungeklärten Grund nur eine dieser beiden Va-

rianten *silencen*, oder die qRT-PCR Primer haben nur eine Transkript-Variante detektiert. Diese Möglichkeit ist unwahrscheinlich, müsste aber dennoch untersucht werden. Eine zweite Erklärung wäre die Tatsache, dass SET in einem Proteinkomplex, dem *inhibitor of acetyltransferases* (INHAT) Komplex, die Acetylierung der Histone blockiert (Seo *et al.*, 2001). Dies könnte bedeuten, dass die Verminderung von SET alleine nicht ausreichend ist, um die Inhibierung der Acetylierung zu blockieren. Die Notwendigkeit von SET für die Funktionalität des INHAT-Komplexes ist derzeit noch nicht gezeigt. Dennoch kann es sein, dass SET nicht vorhanden sein muss, um eine Aktivität des INHAT-Komplexes zu ermöglichen. Das würde dementsprechend bedeuten, dass weitere Komponenten herunter reguliert werden müssten, um einen Effekt bezüglich einer Produktivitätssteigerung zu erzielen. Zudem existieren noch weitere Enzyme, die die Histon-Acetylierung beeinflussen, so dass ein *knockdown* von *Set* möglicherweise von der Zelle kompensiert werden kann. Die dritte und simpelste Erklärung wäre, dass SET in der Regulation der Produktivität von CHO DP-12-Zellen keine übergeordnete Rolle spielt und ein *knockdown* damit keine Änderung des Phänotyps bewirken kann.

Basierend auf den beschriebenen Beobachtungen der *Set-kd*-Zellen, ist ein *Set-knockdown* in dieser Form nicht als Strategie zur Verbesserung der Produktions- oder Wachstumseigenschaften einer Zelllinie geeignet. Durch die oben genannten Untersuchungen bzw. Veränderungen im experimentellen Aufbau könnte sich *Set* jedoch als potentiell Zielgen erweisen, sofern es einen Einfluss auf die Produktivität in CHO-Zellen besitzt. Zusätzlich könnte in Verbindung mit dem *knockdown* weiterer Gene aus der Familie der Histondeacetylasen ein positiver Effekt für Produktionszelllinien erreicht werden (Seidel *et al.*, 2012). Ein kombinatorischer *knockdown* verschiedener Zielgene war zuvor bereits als Strategie zur Veränderung der Fucosylierungsstruktur gezeigt worden. Der alleinige *knockdown* eines einzelnen Gens hatte dabei nicht den gewünschten Effekt. Zwar konnte der Anteil an fucosylierten Antikörpern reduziert werden, erst aber der gleichzeitige *knockdown* von *Fut8* und *Gmd* sorgte für eine Produktion nicht-fucosylierter Antikörper (Imai-Nishiya *et al.*, 2007). Daher wäre ein solcher Ansatz auch für einen zukünftigen *knockdown* von *Set* bzw. Acetylierungsinhibitoren oder Histondeacetylasen denkbar.

Der *knockdown* von *Bad* resultierte in einer Zunahme der maximalen viablen Zelldichte und des Zell-Zeit-Integrals sowohl in Batch- als auch in Fed-Batch-Kultivierungen (Abschnitte 5.2.5 und 5.2.6). Die Produktkonzentration blieb hiervon jedoch unberührt. Sie erreichte ähnliche Werte wie die Negativkontrolle im Fed-Batch bzw. wie die Referenzkultur im Batch. Zusammen mit den berechneten zellspezifischen Produktivitäten lässt dies den Schluss zu, dass der *Bad-knockdown* sich zwar auf das Zellwachstum auswirkte, die Produktbildung allerdings nicht beeinflusst wurde. Da die durchschnittliche Produktivität anscheinend ge-

ringer war, als bei der Referenzkultur, ist das Erreichen des gleichen Antikörpertiters wie in der Negativkontrolle lediglich durch die höhere Zellzahl zu erklären. Möglicherweise führte die Integration des Vektors zu *knockouts* von Produktgenen, was die geringere Produktivität erklären würde, oder es wurden Gene ausgeschaltet, die die Transkription oder die Translation beeinflussten. Mithilfe von durchflusszytometrischen Methoden könnte eine intrazelluläre Antikörperdetektion durchgeführt werden. So könnte evaluiert werden, ob das Verhältnis von leichter Kette zu schwerer Kette durch *knockouts* gestört wurde (Pluschke *et al.*, 2011). Alternativ ist auch eine Messung der Transkriptmenge der leichten und schweren Kette im Vergleich zu der Parentalzelllinie mit qRT-PCR möglich. Eine Veränderung dieser Transkriptmengen durch eine Langzeitkultivierung konnte bereits nachgewiesen werden (Beckmann *et al.*, 2012).

BAD ist ein pro-apoptotisches Protein, das mit anti-apoptotischen Proteinen Heterodimere ausbildet und diese dadurch daran hindert, die Apoptose zu unterbinden (Abschnitt 3.4.2). Der *knockdown* von *Bad* sollte daher bewirken, dass weniger BAD-Bcl-XL-Heterodimere gebildet werden und dadurch die Aktivierung der Apoptosekaskade hinausgezögert wird. Durch den *knockdown* könnten weniger Zellen während der Kultivierung apoptotische Prozesse eingeleitet haben, was zu dem erhöhten Wachstum geführt hat. Zudem hätte eine Verlängerung des Wachstums durch ein verzögertes Einsetzen der Apoptose erwartet werden können. Die Zellen wuchsen jedoch genauso lange wie die Referenzkultur, bis sie das Abbruchkriterium erreichten. Auch die Viabilität war lediglich im Vergleich mit den *Lgals1-kd*-Zellen zum Ende der Kultivierung hin höher. In der Endphase des Fed-Batches war sie aber sogar niedriger als die der Referenzkultur. Das die Modifikation der Genexpression eines einzigen Gens zu einem deutlich anderen Phänotyp führt, ist im Falle einer komplexen Regulation wie der Apoptose jedoch unwahrscheinlich. Andere siRNA-*knockdowns* haben gezeigt, dass die Modifikation von zwei oder mehr Transkripten erforderlich ist, um eine Änderung des Phänotyps zu erzwingen. Lim *et al.* (2006) haben beispielweise einen kombinatorischen siRNA-*knockdown* von *Bak* und *Bax* durchgeführt, beides pro-apoptotische Proteine. Die so modifizierte Zelllinie zeigte ein verlängertes Wachstum und für einen längeren Zeitraum eine höhere Viabilität als die Leervektor-Kontrollzellen. Zumindest was das Erreichen einer höheren maximalen Lebendzellichte anbelangt, schien der *knockdown* von *Bad* damit erfolgreich gewesen zu sein und ist konsistent mit den Beobachtungen in anderen Apoptose-relevanten *knockdown*-Ansätzen (Lim *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2010). Wong *et al.* konnten durch den *knockdown* der pro-apoptotischen Zielgene *Requiem* und *Alg-2* eine höhere viable Zelldichte, wie auch eine verlängerte Wachstumsperiode im Vergleich zu einer Leervektor-Transfektion in Batch- und Fed-Batch-Experimenten nachweisen. Der kombinatorische *knockdown* dieser Transkripte führte ebenfalls zu einer er-

höhten maximalen Lebendzellichte und damit verbunden zu einem höheren Produkttiter (Lim *et al.*, 2010). Da die Apoptose-Regulation einer tierischen Zelle äußerst komplex ist, ist es wahrscheinlich, dass deutlichere Effekte erzielt werden können, wenn der *knockdown* von *Bad* mit einem *knockdown* anderer pro-apoptotischer Gene kombiniert werden würde.

In der Literatur werden BAD noch weitere Eigenschaften zugeschrieben. In Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression, nicht aber ein *knockdown*, sich positiv auf das Wachstum der Tumore auswirkt (Smith *et al.*, 2009). Auch T-Zellen transgener, BAD-überexprimierender Mäuse befanden sich zu einem größeren Anteil in der S-Phase der Mitose als die Kontrollgruppe (Mok *et al.*, 1999). Diese wachstumsfördernde Eigenschaft konnte auf eine Phosphorylierung von Serin 136 zurückgeführt werden. Eine Phosphorylierung dieses Serins ermöglicht ein Binden von BAD an die 14-3-3-Proteine (Maslyar *et al.*, 2001). Die Familie der 14-3-3-Proteine kontrolliert eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, darunter auch das Zellwachstum (Mhaweck, 2005). Die zunächst zu anderen Literaturquellen widersprüchlich erscheinende Beobachtung des gesteigerten Wachstums bei *Bad knockdown* anstelle einer *Bad*-Überexpression kann auf verschiedene Arten interpretiert werden. Es ist zu beachten, dass die verwendeten Zelltypen in der beschriebenen Literatur anderen Ursprungs waren als die hier verwendeten CHO-Zellen. Es handelte sich um modifizierte Tumore (Smith *et al.*, 2009) oder um Primärzellen embryonaler Fibroblasten vom Huhn (Maslyar *et al.*, 2001). Zwar sind auch die CHO-Zellen immortalisiert, jedoch unterscheidet sich deren zelluläre Regulation mit großer Wahrscheinlichkeit von der Regulation, der in der Literatur beschriebenen Zelltypen. Weiterhin wurde die positive Korrelation von BAD zum Zellwachstum auf eine Phosphorylierung und nicht auf die absolute intrazelluläre Proteinmenge zurückgeführt (Maslyar *et al.*, 2001). Demzufolge muss der *knockdown* von *Bad* nicht zwangsweise einen Wachstumsnachteil mit sich bringen. Möglicherweise sind die wachstumsfördernden Eigenschaften von BAD für eine CHO-Zellkultur nicht von Bedeutung. Die Verringerung von BAD alleine könnte schon ausreichend sein, um apoptotische Prozesse während der Wachstumsphase zu verringern, was das verbesserte Wachstumsprofil erklären könnte. Dementsprechend müssten weitere Analysen folgen, um die genauen Auswirkungen des *knockdowns* von *Bad* eruieren zu können. Zellzyklusanalysen während der Kultivierung von normalen Zellen und *Bad-kd*-Zellen, Apoptose-Assays, aber auch μ Arrays könnten Aufschluss über die genauen Auswirkungen des *knockdowns* liefern. Auch Informationen über den Phosphorylierungszustand des restlichen BADs könnten hilfreich für die Erklärung des Wirkmechanismus sein. Aufgrund der beobachteten Veränderungen in Wachstum und Produkttiter (Abschnitt 5.2.6) eignet sich der *knockdown* von *Bad* nur bedingt für einen Zelllinien-Modifikationsansatz. Möglicherweise wäre er eine Option, wenn er vor der stabilen Transfektion mit dem Produktgen erfolgt. Dann bestünde nicht länger

die Gefahr eines *knockouts* des Produktgens durch die nachträgliche Modifikation. Es ist allerdings zu beachten, dass diese Strategie lediglich die maximale Zelldichte erhöht, was bei einer industriellen Produktionszelllinie nicht unbedingt von Vorteil ist. Eine Kopplung mit *knockdowns* oder *knockouts* anderer Apoptose-relevanter Gene könnte das Wachstums- und Absterbeverhalten einer Zelllinie weiter optimieren.

Durch den *knockdown* von *Lgals1* in der CHO DP-12-Zelllinie konnte der ursprüngliche Phänotyp der CHO DP-12-Zelle in Bezug auf Wachstum und Produkttiter modifiziert werden. Diese Auswirkungen wurden jedoch erst im Fed-Batch vollständig sichtbar. Dort konnte die maximale viable Zelldichte, das Zell-Zeit-Integral, der Produkttiter und wahrscheinlich auch die zellspezifische Produktivität im Vergleich zur Parentalzelllinie und zum pLVX-Zellpool erhöht werden. Die Gründe für das abrupte Absterben nach Erreichen der maximalen viablen Zelldichte während der Kultivierung konnten noch nicht geklärt werden. Der Verlauf der Aminosäure- und der Glukosekonzentration zeigte keine Limitierungen auf (s. Anhang, Abschnitt A.3). Demzufolge wurde die Limitierung wahrscheinlich durch ein Substrat verursacht, das in der Standard-Analytik nicht erfasst wurde. Weitere analytische Methoden, eine Verbesserung des *Feeds*, oder eine Untersuchung der zellulären Metabolite könnten Aufschluss über die limitierenden Komponenten geben.

Wie bereits zuvor beschrieben, sind die bisherigen Erkenntnisse über die tatsächliche Funktion von Galectin-1 widersprüchlich (Abschnitt 3.4.3). Unter Berücksichtigung der hier gemachten Beobachtungen auf das Wachstumsverhalten der CHO DP-12-Zellen kann vermutet werden, dass LGALS1 in diesem Zelltyp einen antiproliferatorischen Effekt ausübt. Die Verbesserung des Wachstums könnte allerdings so begründet sein, wie Adams *et al.* (1996) es bereits nachweisen konnten: In geringen Konzentrationen wirkt LGALS1 proliferationsfördernd, während es in hohen Konzentrationen eine antiproliferatorische Wirkung hat. Da CHO-Zellen über eine hohe LGALS1-Konzentration verfügen (Cho & Cummings, 1995a), würde der *knockdown* demzufolge die proliferationsfördernde Wirkung des Galectin-1 begünstigen.

Weitere Erklärungen bezüglich der Funktionsweise von LGALS1, könnten in der Interaktion mit dem RAS-MEK-ERK-Pfad begründet sein. Es ist möglich, dass dieser durch LGALS1 inhibiert wird. Der Signaltransduktionspfad kann die Transkription und Translation innerhalb der Zelle regulieren. Die Inhibierung führt konsekutiv zu einer transkriptionellen Induktion von p27 und p21. Diese beiden Proteine wiederum inhibieren die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK2) was letztlich zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt (Fischer *et al.*, 2005). Demzufolge würde die Galectin-1-Expression das Wachstum der Zelle direkt beeinflussen. Da die molekularen Effekte von LGALS1 aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über dieses Protein nicht direkt vom beobachteten Phänotyp her abgeleitet

werden können (vgl. Abschnitt 3.4.3), sind für die exakte Klärung des Wirkmechanismus in CHO DP-12-Zellen sowie für die Auswirkungen des *knockdowns* umfangreichere Analysen notwendig. Dazu könnte auch eine Überexpression des Proteins wertvolle Hinweise liefern. Ein μ Array könnte an dieser Stelle die Veränderungen in der Regulation der Zelle aufzeigen, wenn *knockdown*-Zellen, Parentalzellen und Zellen mit überexprimiertem LGALS1 miteinander verglichen werden würden. Eine weitere Möglichkeit, die Veränderungen der Transkriptionsprofile zu analysieren, wäre die RNA-Sequenzierung (Ozsolak & Milos, 2011). Der Vorteil der RNA-Sequenzierung gegenüber einem μ Array liegt im geringeren Hintergrundrauschen bzw. in einer höheren Auflösung (Wang *et al.*, 2009). Auch eine differentielle Proteomanalyse würde Aufschluss über die modifizierten zellulären Vorgänge liefern. So könnten Veränderungen, wie z. B. eine modulierte Expression von p21 oder p27, eine Inhibierung des RAS-MEK-ERK-Pfades durch Galectin-1 bestätigen oder widerlegen. Nichtsdestoweniger ist die CHO DP-12-Parentalzelllinie auch mit der nativen LGALS1-Expression nicht durch ein dauerhaft schlechtes Wachstumsverhalten charakterisiert. Sollte der Effekt vom *Lgals1-knockdown* ausschließlich der Wegfall der Inhibierung des Signaltransduktionspfades RAS-MEK-ERK sein, so würde der *knockdown* des Proteins lediglich das natürliche, zelluläre Wachstumspotential dieser Zelllinie freischalten. Das würde jedoch nicht die Veränderungen im Produkttiter und die erhöhte durchschnittliche zellspezifische Produktivität der Zellen erklären. Möglicherweise ist Letztere so stark an das Wachstum der Zelle gekoppelt, dass die Förderung des Wachstums ausreichend ist, um diese Erhöhung zu bewirken. Dies würde jedoch im Gegensatz zu den bereits diskutierten Ergebnissen der *Bad-kd*-Zelllinie stehen. Auch dort wurde das Wachstum im Vergleich zur Parentalzelllinie deutlich verbessert. Für die *Bad-kd*-Zellen konnte jedoch weder ein erhöhter Produkttiter, noch eine erhöhte Produktivität gemessen werden. Im Gegenteil, die durchschnittliche zellspezifische Produktivität war sogar niedriger, als die der Referenzzellen (Abschnitt 5.2.6). Demzufolge kann die Erhöhung des Produkttiters und der durchschnittlichen Produktivität der *Lgals1-kd*-Zellen nicht ausschließlich auf das verbesserte Wachstum zurückgeführt werden.

Ein weiteres Protein, das mit LGALS1 intrazellulär interagiert, ist GEMIN4 (Park *et al.*, 2001). GEMIN4 ist Teil eines Komplexes, der für den Zusammenbau der snRNPs (*small nuclear ribonucleoprotein particles*) notwendig ist. Weiterhin regeneriert dieser Komplex die Splicisomen im Cytoplasma (Charroux *et al.*, 2000), was bedeutet, dass GEMIN4 notwendig für das pre-mRNA *splicing* ist. Da die Art der Interaktion zwischen LGALS1 und GEMIN4 bisher unbekannt ist, kann nicht vorhergesagt werden, wie sich die Reduktion des Galectins auf das GEMIN4 auswirkte. Es wäre möglich, dass das Galectin-1 die Aktivität von GEMIN4 inhibiert bzw. einschränkt. Eine Entfernung dieser Inhibierung könnte also zu einer generellen Erhöhung der *splicing*-Aktivität führen und damit die Proteinabundanz beeinflussen.

Auch für die Produktion des anti-IL8-Antikörpers der CHO DP-12-Zelle ist das *splicen* ein notwendiger Mechanismus. Das Design des Vektors basiert auf dem unvollständigen *splicen*. Dabei ist das *Dhfr*-Gen in ein Intron integriert worden, dass vor der schweren Kette des Antikörpers lokalisiert ist. Durch das unvollständige *splicen* wird in den meisten Fällen die schwere Kette gebildet und nur selten die DHFR. Dieser Mechanismus sollte der Erhöhung des Selektionsdrucks dienen (Lucas *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 2012). Eine veränderte *splicing*-Maschinerie könnte sich dementsprechend auf das *splicing* dieser Sequenzen auswirken, beispielweise durch vermehrte Erzeugung der schweren Kette basierend auf einer generellen Steigerung der *splicing*-Aktivität der Zelle. Bei ausreichender Verfügbarkeit der leichten Kette könnte das zu der erhöhten durchschnittlichen Produktivität und damit zu dem gesteigerten Produkttiter führen.

Ohne weitergehende Analysen die generelle Funktion von LGALS1 in den CHO-Zellen betreffend und im speziellen die Auswirkungen des *knockdowns*, können die beschriebenen Fälle lediglich als Vermutung geäußert werden. Obgleich an dieser Stelle die exakte Auswirkung des *Lgals1-knockdowns* nicht geklärt werden kann, belegten die Ergebnisse des Fed-Batches den Nutzen des *knockdowns* von Galectin-1 zur Erhöhung des Zellwachstums bzw. der durchschnittlichen Produktivität von CHO DP-12-Zellen. Es ist damit ein geeignetes Ziel für einen Produktionszelllinien-Optimierungsansatz, beispielsweise durch den hier durchgeführten *knockdown*.

5.2.8 Stabilitätstests der genetischen Modifikation einer Zelllinie durch lentiviralen Transfer

Obwohl eine lentivirale Transduktion als stabil gilt und in den transduzierten Kulturen stets Puromycin zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks verwendet wurde, wurde zusätzlich ein Stabilitätstest der genetischen Modifikation der Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden exemplarisch die *Lgals1-kd*-Zellen verwendet. Sie wurden aus der Kryokonservierung aufgetaut und in 10 mL Medium in einem Kultivierungsröhrchen über einen Zeitraum von 45 Tagen ohne Zusatz von Puromycin kultiviert (Abschnitte 4.3.4 und 4.3.2). Zu Beginn der Kultivierung, wie auch zum Ende, wurden je 5×10^6 Zellen in TRIzol[®] eingefroren, um die RNA isolieren zu können (Abschnitt 4.2.11). Daraus sollte mit einer qRT-PCR die relative mRNA-Menge des herunter regulierten *Lgals1* bestimmt werden. Sofern die Modifikation nach den 45 Tagen Kultivierungszeit noch stabil war, sollte es keine Erhöhung des Transkriptlevels von *Lgals1* im Vergleich zum ersten Probenahmezeitpunkt geben. Das Ziel dieses Experimentes war der Nachweis der Stabilität der lentiviralen Integration auch

ohne Selektionsdruck. Daraus konnte für die übrigen Zellen auch auf einen stabilen Phänotyp geschlossen werden.

Von der isolierten RNA wurde 1 μg in cDNA konvertiert und diente als *template* in einer qRT-PCR-Reaktion (Abschnitte 4.2.12 und 4.2.13). Dabei wurde der erste Probenahmezeitpunkt als Kalibrator verwendet. Für die Normalisierung wurden zwei *housekeeping*-Gene eingesetzt, β -Aktin und Vezatin.

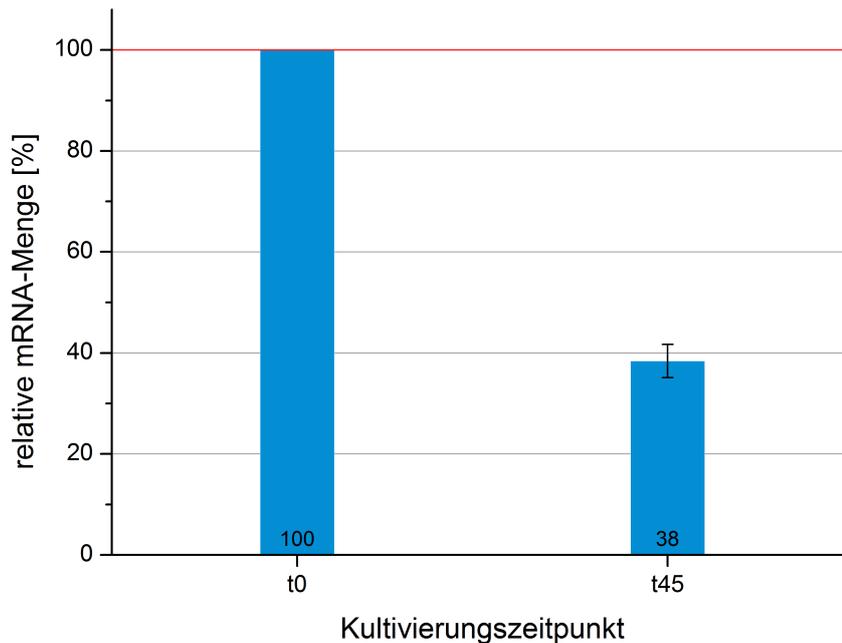


Abbildung 5.26: Ergebnisse der qRT-PCR zur Verifikation der Stabilität des *knockdowns* von *Lgals1* nach 45 Tagen Kultivierungszeit. Normalisiert wurde gegen β -Aktin und Vezatin, während die Probe zu Beginn des Stabilitätstests als Kalibrator definiert wurde. Sie ist mit t0 bezeichnet und liegt daher bei 100 % der relativen *Lgals1*-mRNA-Menge.

Grafik 5.26 zeigt die Resultate dieser qRT-PCR. Das Transkriptlevel des ersten Zeitpunkts wurde als Kalibrator verwendet und ergab damit eine *Lgals1*-mRNA-Menge von 100 %. Der zweite Zeitpunkt wurde auf den Kalibrator bezogen. Nach 45 Tagen Kultivierung war das mRNA-Level von *Lgals1* geringer als zu Beginn der Kultivierung. Da der erste Zeitpunkt in einem anderen Experiment bereits auf die mRNA-Menge von nicht-veränderten Parentalzellen bezogen wurde (Abschnitt 5.2.3.3, Abbildung 5.12), konnte durch eine Schlussfolgerung die relative Transkriptmenge auch auf die Ausgangszelllinie bezogen werden. Demzufolge hatte sich die Transkriptmenge der *Lgals1*-mRNA auch ohne Selektionsdruck während der Kultivierung über 45 Tage nicht wieder erhöht. Daraus ließ sich schließen, dass der durch das

lentivirale Transduktionssystem vermittelte *knockdown* aktiv und stabil war. Die Stabilität dieses Zellpools für diesen Zeitraum auch ohne Zugabe eines selektiven Agens konnte damit bestätigt werden.

Über den Vergleich mit der noch vorhandenen *Lgals1*-mRNA-Menge nach dem persistenten *knockdown* konnte die Reduktion der mRNA im zweiten Messzeitpunkt berechnet werden. Im ersten Zeitpunkt sollte die noch vorhandene mRNA-Menge von *Lgals1* etwa 7 % betragen haben (Abschnitt 5.2.3.3). Der zweite Zeitpunkt enthielt nur noch etwa 38 % dieser Menge. Damit war im Vergleich zur Parentalzelllinie noch etwa 2,7 % der ursprünglichen *Lgals1*-mRNA vorhanden. Über die Ursache dieser weiteren Reduktion kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Möglicherweise wurde die Transkription von *Lgals1* im Verlauf der Zeit weiter reduziert, da durch die künstliche, siRNA-vermittelte Verringerung der mRNA-Menge die nativen Effekte von LGALS1 geringer wurden. Durch dieses *feedback* könnten die Zellen die Expression des Gens weiter reduziert haben, da das LGALS1 in seiner geringen Menge für die Zellen keine essentielle Funktion mehr ausübte und die Expression somit unnötig wurde. Weiterhin könnte die native mRNA-Menge auch natürlichen Schwankungen unterlegen sein, so dass, je nach Zeitpunkt, mehr oder weniger *Lgals1*-mRNA in der Zelle vorliegt. Ohne weiterführende Analysen der Veränderungen des Transkriptoms und des Proteoms kann die Ursache für die zusätzliche Reduktion nicht geklärt werden.

5.3 Alternative Strategie zum *knockout* eines Gens mittels der ZFN-Technologie

Neben der Verringerung einer mRNA, also dem *knockdown*, kann es je nach Anwendung sinnvoll sein, die Expression eines Gens vollständig zu unterbinden. Dieses Verfahren wird *knockout* genannt. Klassisch kann ein Gen-*knockout* durch homologe Rekombination erfolgen. Dieses Verfahren ist jedoch zeit- und arbeitsintensiv, da die Frequenzen bei homologer Rekombination gering sind und zur Identifikation eines Klons mit gesuchtem Genotyp eine Vielzahl von Klonen analysiert werden müssen (Abschnitt 3.3). Die Zinkfinger-Nuklease-Technologie bietet eine Alternative mit erhöhter Rekombinationsfrequenz, so dass die Anzahl der zu analysierenden Klone deutlich reduziert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein solcher *knockout* mit ZF-Nukleasen am Beispiel der Glutamin-Synthetase (*GluI*) erprobt. Dieses Zielgen wurde ausgewählt, da durch dessen *knockout* ein effizientes Selektions- und Amplifikationssystem für CHO-Zellen nachgestellt werden könnte (Matasci *et al.*, 2008). Die grundsätzliche Möglichkeit das *GluI*^{-/-}-Selektionssystem mittels Zinkfinger-Nukleasen zu realisieren, wurde durch Verwendung von kommerziellen ZF-Nukleasen bereits gezeigt (Fan *et al.*, 2012). Da der Zugriff auf die ZFN-

Technologie durch Patente geschützt ist, musste auf eines der freien Systeme zur Erzeugung der ZF-Nukleasen zurückgegriffen werden, das *context-dependent assembly* (CoDA)-System (Sander *et al.*, 2011). Der Fokus dieser Experimente lag daher auf der Anwendbarkeit des CoDA-Systems. Zunächst wurde die Exon-Intron-Struktur der CHO cDNA-Sequenz von *GluI* (GenBank-Nr.: XM_003502861.1, Becker *et al.* (2011)) durch ein Orthologie-Alignment mit der entsprechenden Sequenz von *M. musculus* (Ensembl-ID: ENSMUST00000086199) erstellt. Die beiden orthologen Gene unterscheiden sich durch die hohe Konservierung nicht in der Anzahl der Exons, sondern lediglich in einigen Basen der kodierenden Sequenz. Da zu dem Zeitpunkt der Durchführung des Experimentes kein Zugriff auf die CHO-Genomdaten bestand, wurden die Intron-Sequenzen von *M. musculus* verwendet, um eine Pseudo-CHO-*GluI*-Exon-Intron-Sequenz zu generieren. Diese Sequenz wurde anschließend in das *ZiFiT-Tool* (Version 3.3, Zinc finger consortium (2012)) geladen, damit geeignete Bindestellen für die ZF-Nukleasen identifiziert werden konnten. Mit dem Programm konnten sechs mögliche Bindestellen für ZF-Nukleasen ermittelt werden, wie in Abbildung 5.27 dargestellt.



Abbildung 5.27: Grafische Darstellung des *GluI*-Gens, ab Exon 2, erzeugt mit der *ZiFiT*-Software (Version 3.3). Die murinen Intron-Sequenzen sind durch die Linien symbolisiert, die roten Kästchen entsprechen den Exons. Die blauen Rechtecke zeigen mögliche ZFN-Bindestellen in den Introns an, die grünen in den Exon-Sequenzen. Mit einem grünen Kreis ist die ZFN-Bindestelle markiert, die für die folgenden Experimente ausgewählt wurde.

Dargestellt sind nur die kodierenden Exons und die dazwischenliegenden Introns. Da das erste Exon von *GluI* nur 5'-UTR-Sequenzen enthält, beginnt die Grafik mit Exon 2. Drei der ZFN-Bindestellen waren in den Introns 2, 3 bzw. 4 lokalisiert. Sie konnten nicht verwendet werden, da die Intron-Sequenzen von der Maus stammten. Zwar gibt es zum Teil hochkonservierte Introns bei unterschiedlichen Spezies (Hare & Palumbi, 2003), diese Gegebenheit war für die murine und die CHO-Sequenz jedoch noch nicht bestätigt worden. Eine ZFN-Bindestelle lag in Exon 5 und zwei weitere in Exon 7. Als Bindestelle für die ZF-Nukleasen wurde die Sequenz im Exon 5 ausgewählt. In einer vergleichbaren Arbeit von Fan *et al.* (2012) wurden kommerziell erwerbliche ZF-Nukleasen (*CompoZr*[®] *Custom ZFN kit* (Sigma-Aldrich, USA)) verwendet, um *GluI* in CHO K1SV-Zellen auszuschalten. Dort

wurde eine ZFN-Bindestelle in Exon 6 als Zielsequenz ausgewählt. Da Fan *et al.* das erste Exon, welches nur 5'-UTR-Bereiche enthält, nicht mitgezählt haben, wurde die Bindestelle dort ebenfalls mit Exon 5 angegeben. Die mit *ZiFiT* ermittelte Bindestelle wurde von der Software in eine DNA-Sequenz umgewandelt, die in die ZFN-Vektoren pMLM290 bzw. pMLM292 (s. Anhang, Tabelle A.1) subkloniert werden konnte. Dazu wurden die 286 bp langen Sequenzen von einem Gensynthese-Anbieter hergestellt (Fa. GeneArt jetzt Life Technologies GmbH, Darmstadt) und in Form je eines Plasmids geliefert.

5.3.1 Erzeugung der ZFN-Expressionsvektoren

Die ZFN-Expressionsplasmide wurden von der Firma Addgene (USA) in Form zweier Bakterienkolonien auf Festagar geordert (Addgene-Plasmid #21872 und #21873). Die Kolonien wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und nach Inkubation über Nacht wurde je ein Klon der pMLM290- und der pMLM292-Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 5 mL LB-Medium resuspendiert (Abschnitt 4.1.1). Aus den Bakterien wurden die Plasmide mit einer DNA-Mini-Präparation isoliert (Abschnitt 4.2.10). Die Plasmide wurden für 10 min mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Bam*HI unter Zugabe von FastAPTM geschnitten (Abschnitt 4.2.5). Anschließend wurden die Enzyme 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert. Das herausgetrennte 16 bp große DNA-Fragment und die Enzyme wurden durch ein *PCR Purification Kit* entfernt (Abschnitt 4.2.9).

Die bei der Firma GeneArt synthetisierten und in Plasmide subklonierten ZF-Sequenzen wurden in lyophilisierter Form geliefert. Zu den Reaktionsgefäßen wurden 50 µL Tris-HCl pH 8,0 gegeben und diese 1 h bei Raumtemperatur gelöst. Die Plasmide wurden analog zu den Vektoren mit *Xba*I und *Bam*HI geschnitten, jedoch ohne Zusatz von FastAPTM (Abschnitt 4.2.5). Die Restriktionsansätze wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, die 286 bp großen Fragmente ausgeschnitten und aufgereinigt (Abschnitte 4.2.7 und 4.2.8). Das Fragment für den „linken“ ZF wurde mit dem linearisierten pMLM290-Vektor ligiert (pMLM290-L), das für den „rechten“ ZF mit dem pMLM292-Vektor (pMLM292-R) (Abschnitt 4.2.6). Die Plasmide wurden durch einen Hitzeschock in TOP10 *E. coli* transformiert und die auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichenen Bakterien über Nacht inkubiert (Abschnitte 4.1.3 und 4.3.2).

Mittels Kolonie-PCR wurde je ein Klon mit Plasmiden des pMLM290-L-Vektors bzw. des pMLM292-R-Vektors identifiziert, deren PCR-Reaktion Amplifikate mit Banden der Größe 452 bp lieferten (Abschnitt 4.2.1.2, Primer 27 und 28, Tabelle A.2). Aliquote dieser Reaktionen wurden mit ExoSAP-IT[®] gereinigt und anschließend in Vorwärts- und Rückwärtsorientierung sequenziert (Abschnitte 4.2.16 und 4.2.17). Die Sequenzintegrität wurde verifiziert,

woraufhin mit den Kolonien der sequenzierten Plasmide je 300 mL LB-Medium für eine DNA-Maxi-Präparation inokuliert und die Plasmide extrahiert wurden (Abschnitt 4.2.10).

5.3.2 Transfektion adhärenter CHO K1-Zellen mit ZFN-Expressionsplasmiden und Evaluation eines möglichen *knockouts*

Zunächst wurde eine geeignete Nukleofektionsstrategie für adhärenente CHO K1-Zellen entwickelt, um einen guten Transfer der ZFN-Expressionsplasmide in die Zielzellen gewährleisten zu können. Dazu wurden drei verschiedene Nukleofektionsprogramme in Verbindung mit den beiden Nukleofektionspuffern L und V getestet. Die adhärenenten Zellen wurden durch Trypsinieren vom Boden der Kulturflasche abgelöst und die Reaktion mit FCS-haltigem Medium abgestoppt. Mit dem Cedex wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt (Abschnitt 4.3.3). Anschließend wurden je 1×10^6 Zellen mit $2 \mu\text{g}$ pmaxGFP[®]-Plasmid in dem entsprechenden Nukleofektionspuffer resuspendiert und unter Verwendung der in der Tabelle 5.6 aufgeführten Programme transfiziert (Abschnitt 4.3.7). Nach 24-stündiger Inkubation in den *wells* einer 12-*well*-Zellkulturplatte befüllt mit 1,5 mL Kulturmedium, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abschnitte 4.3.2 und 4.3.6).

Tabelle 5.6: Geteste Nukleofektionsprogramme und Nukleofektionspuffer zur Transfektion adhärenter CHO K1-Zellen. Zusätzlich sind die mit der Durchflusszytometrie ermittelten Transfektionseffizienzen in Form des Anteils der transfizierten Zellen angegeben (Abschnitt 4.3.6).

Puffer	L			V		
	U-023	U-027	X-001	U-023	U-027	X-001
Anteil transfizierter Zellen [%]	91	79	64	89	87	67

Die höchste Transfektionsrate wurde mit dem Programm U-023 und dem Nukleofektionspuffer L erreicht. Diese Kombination wurde daher für die Transfektion der ZFN-Expressionsplasmide verwendet. Sowohl von pMLM290-L als auch von pMLM292-R (Abschnitt 5.3.1) wurden $5 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA zu 1×10^6 CHO K1-Zellen in Nukleofektionslösung L gegeben und diese mit Programm U-023 nukleofiziert (Abschnitt 4.3.7). Anschließend wurden die Zellen in ein *well* einer 12-*well*-Kulturplatte gegeben und für 48 h kultiviert (Abschnitt 4.3.2). Daraufhin wurde die genomische DNA dieser Zellen isoliert (Abschnitt 4.2.14). Hatte der *knockout* stattgefunden, so sollte dies auch in der Mischkultur messbar sein. Dazu wurde ein SURVEYOR[®]-Nuklease-Assay durchgeführt (Abschnitt 4.2.15).

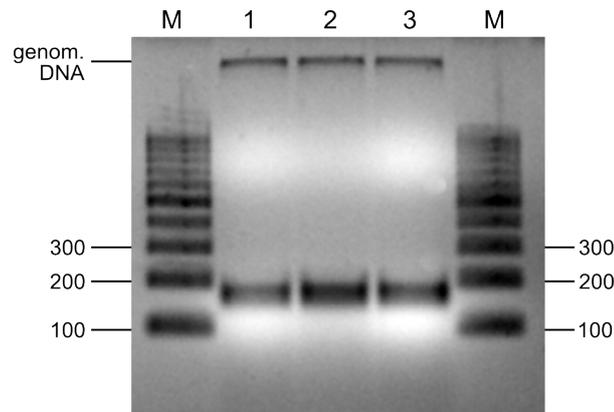


Abbildung 5.28: Bild einer Agarosegelelektrophorese des SURVEYOR[®]-Nuklease-Assays. Die Markerspuren sind mit M bezeichnet. Es wurde die Generuler[™] 100 bp DNA-Leiter verwendet. Spur 1 enthielt die Negativkontrolle, in der nur Wildtyp-PCR-Amplifikat hybridisiert wurde. Spur 2 enthielt die Reaktion, die aus Wildtyp-PCR-Amplifikat und der mit den Zinkfinger-Nukleasen behandelten DNA bestand. In Spur 3 wurde die „Probe“ aufgetragen. Diese bestand aus hybridisiertem PCR-Fragment der Zinkfinger-Nuklease behandelten DNA (vgl. Abschnitt 4.2.15). Die erwartete Bandengröße des PCR-Amplifikats lag bei etwa 140 bp. Zusätzliche, kleinere Banden wären ein Indiz für eine erfolgreiche Mutation gewesen.

Das Gelbild (Abbildung 5.28) zeigt die Ergebnisse des SURVEYOR[®]-Nuklease-Assays aufgetrennt in einem 2 %igen Agarosegel (Abschnitt 4.2.7). In Spur 1 ist die SURVEYOR[®]-Reaktion der genomischen CHO K1-DNA aufgetragen (vgl. Abschnitt 4.2.15 „Negativkontrolle“). Es konnte nur eine Bande mit einer Größe von etwa 140 bp detektiert werden. Tatsächlich sollte die erzeugte Bande eine Größe von 121 bp besitzen. Diese Verschiebung der Fragmentgröße ist darauf zurückzuführen, dass die mit dem SURVEYOR[®]-Nuklease-Assay behandelten Reaktionen mit Gelfarbstoff versetzt wurden, bevor sie auf das Agarosegel aufgetragen wurden. Da bei der Spaltung durch die SURVEYOR[®]-Nuklease möglicherweise Fragmente kleiner als 100 bp entstanden wären, wurden die Reaktionen vorgefärbt, um später im Gelbild besser sichtbar zu sein. Das Vermischen der PCR-Reaktion mit Farbstoff vor der Agarosegelelektrophorese führt zu einer etwa 15 % stärkeren Retardation der DNA-Fragmente durch das Gel (Green & Sambrook, 2012). Dadurch kann die scheinbare Größendifferenz zum eigentlichen Fragment von etwa 20 bp erklärt werden. Der Marker wurde nicht vorgefärbt, weshalb dieser normal im Gel migrierte.

Auch die Reaktion der aus den transfizierten Zellen isolierten DNA zeigte lediglich eine einzige Bande (Spur 3), genauso wie die Mischreaktion (Spur 2). Theoretisch hätten in beiden

Ansätzen bei erfolgreichem *knockout* mehrere Banden kleiner als 140 bp erwartet werden können. Da der *knockout* nur zu einem geringen Anteil stattfindet (Abschnitt 3.3.1), würde auch bei den transfizierten Zellen eine Mischpopulation genomischer DNA vorliegen, die nach der Hybridisierung zu einem spaltbaren DNA-Fragment angelagert werden würde (vgl. Abschnitt 4.2.15). Selbst bei vollständigem *knockout* hätte zumindest in der Mischreaktion (Spur 2), in der die Wildtyp-DNA mit der modifizierten DNA hybridisiert wurde, eine Spaltung stattgefunden. Dieses Experiment wurde mehrfach wiederholt, jedoch immer mit demselben Ausgang. Demzufolge war es nicht möglich, mit den durch das CoDA-System erstellten ZF-Nukleasen das *GluI*-Gen in den CHO K1-Zellen auszuschalten.

Verschiedene Faktoren könnten zum Scheitern des *knockouts* beigetragen haben. Die zunächst naheliegendsten Fehlerquellen könnten in der experimentellen Durchführung begründet sein. Sowohl die Sequenz der ZF-Nukleasen, wie auch die Transfektionseffizienz wurden durch Sequenzierung bzw. mittels Durchflusszytometrie bestätigt und bieten damit keine Erklärung für das Fehlschlagen des *knockouts*. Möglicherweise waren 5 µg je ZFN-Plasmid nicht ausreichend um einen *knockout* herbeizuführen. Die *knockout*-Frequenz in Abhängigkeit der transfizierten Plasmidmenge wurde sowohl von Santiago *et al.* (2008) in CHO S, als auch von Perez-Pinera *et al.* (2011) in verschiedenen murinen Zelllinien genauer untersucht. Dabei konnte tatsächlich eine Abhängigkeit der Mutationsfrequenz von der eingesetzten Plasmidmenge beobachtet werden. Santiago *et al.* konnten bereits bei 0,1 µg je ZFN-Plasmid eine NHEJ-Frequenz von etwa 10 % nachweisen. Diese ließ sich bei Einsatz von 2 µg je Plasmid auf etwa 16 % steigern. Auch Perez-Pinera *et al.* haben verschiedene Plasmidmengen für die Transfektion eingesetzt und die Mutationsfrequenz ermittelt. Bei 5, 10 bzw. 20 µg je ZFN-Plasmid wurden *knockout*-Frequenzen von 9, 14 bzw. 17 % erreicht. Der Test mit verschiedenen Zelllinien ergab zudem eine Abhängigkeit der Frequenz vom verwendeten Zelltyp (Perez-Pinera *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit verwendete Plasmidmenge von 5 µg je ZFN-Plasmid sollte demzufolge ausreichend gewesen sein, um einen *knockout* auszulösen. Der zweite Faktor, der das Ergebnis der Mutationsanalyse beeinflusst, ist der Zeitpunkt der Analyse selbst. Die transfizierten CHO K1-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion analysiert. Diese Zeit reichte möglicherweise nicht aus, um einen *knockout* hervorzurufen. Auch die Zeitabhängigkeit des *knockouts* wurde von Perez-Pinera *et al.* evaluiert. Dabei wurde festgestellt, dass bereits nach 16 h eine Mutationsfrequenz von 11 % detektiert werden konnte. Das Maximum des *knockouts* mit 18 % wurde nach 32 h gemessen (Perez-Pinera *et al.*, 2011). Damit scheidet auch eine zu kurze Zeit bis zur Analyse der transfizierten CHO K1-Zellen aus.

Die Funktionalität des SURVEYOR[®]-Nuklease-Assays wurde durch die mitgelieferten Kontroll-Reaktionen, wie auch durch selbstgenerierte Positivkontrollen verifiziert (Daten

nicht gezeigt). Damit kann ausgeschlossen werden, dass der nicht detektierte *knockout* auf einen Fehler in der Versuchsdurchführung zurückzuführen ist. Die Fehlerquelle könnte damit im verwendeten CoDA-System selbst liegen. Häufig werden für die Funktionalität der ZF-Nukleasen die Mutationsfrequenzen angegeben. Zwar sind diese hilfreich, um die Effektivität der ZF-Nukleasen beurteilen zu können, jedoch liefern sie keine Informationen dazu, wieviele ZFN-Paare generiert werden müssen, um ein Gen tatsächlich auszuschalten. Für das CoDA-System wurden dazu 38 Zielgene im Zebrafisch ausgewählt, von denen 19 mit einer Mutationsfrequenz von $\leq 1\%$ bis etwa 17% ausgeschaltet werden konnten (Sander *et al.*, 2011). Das bedeutet, dass 50% der getesteten Zielgene nicht durch eine vom CoDA-System generierte ZFN mutiert werden konnten. Da jeweils nur ein einziges ZFN-Paar pro Gen getestet wurde, wird durch die 50% ige Erfolgsquote dem CoDA-System generell eine gute Funktionalität bescheinigt. Ob es allerdings möglich ist, die restlichen 50% durch Generieren eines weiteren ZFN-Paares ebenfalls zu mutieren, wird damit nicht belegt. Zudem handelt es sich bei dem getesteten Modellorganismus nicht um eine Zellkultur und die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse ist damit ebenfalls nicht gewährleistet. Weiterhin ist die Stichprobenmenge von 38 Zielgenen verhältnismäßig klein gewählt. Es ist daher fraglich, ob die ermittelten Erfolgswahrscheinlichkeiten für das CoDA-System korrekt sind. Für modular zusammengesetzte ZF-Nukleasen konnte bereits eine deutlich höhere Fehlerrate nachgewiesen werden. Für 79 von 104 Zielsequenzen (ca. 76%) konnte mit dem modularen Zusammenbau kein funktionsfähiges ZFN-Paar erzeugt werden (Ramirez *et al.*, 2008). Weitere Experimente konnten für diese Art der ZFN-Generierung belegen, dass bis zu 94% der getesteten ZFN-Paare keinen *knockout* vermitteln (Joung *et al.*, 2010). Zwar muss bei dieser Betrachtung berücksichtigt werden, dass sich das CoDA-System vom modularen Zusammenbau der ZF-Nukleasen unterscheidet, dennoch wären weitere Experimente notwendig, um die tatsächliche Fehlerrate des Systems zu ermitteln. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zum *knockout* können nicht mit anderen CoDA-basierten *knockouts* verglichen werden, da bis zu diesem Zeitpunkt keine weitere Literatur zu einem erfolgreichen oder einem fehlgeschlagenen *knockout* mit diesem System vorhanden ist.

Eine weitere Fehlerquelle stellte die ZiFiT-Software dar, die die ZFN-Bindestellen ermittelt und in DNA-Sequenzen umwandelt. Sie hat die Option sowohl bei einer vorhandenen Exon-Intron-Struktur, als auch bei einer reinen Exon-Sequenz ZFN-Bindestellen zu identifizieren. Da sich die Basensequenzen der Exons nicht ändern, wenn die Introns nicht mit eingefügt werden, sollten bei Wegfall der Intron-Sequenzen die gleichen ZFN-Bindestellen in den Exons identifiziert werden wie mit vorhandenen Introns. Zum Zeitpunkt der Identifikation der ZFN-Bindestellen lieferte die Software jedoch unterschiedliche Ergebnisse bei eingefügten oder weggelassenen Intron-Sequenzen (Daten nicht gezeigt), weshalb zu dem

Zeitpunkt ebenfalls Zweifel an der Korrektheit der identifizierten ZFN-Bindestelle bestand. Mittlerweile ist eine neue Version des *ZiFiT-Tools* zugänglich (Version 4.1, *Zinc finger consortium* (2012)), in der diese Fehler behoben wurden. Bei einer nachträglichen Evaluation der von *ZiFiT* 3.3 generierten Sequenzen konnten diese durch *ZiFiT* 4.1 verifiziert werden. Ein letzter Grund für den gescheiterten *knockout* des *GluI*-Gens könnte noch die für die Erzeugung der ZFN-Paare genutzte *GluI*-CHO-Sequenz sein. Diese entstammte der CHO-Transkript-Sequenzierung (Becker *et al.*, 2011) und unterschied sich durch eine einzige Transition (C \rightarrow T) von einer anderen publizierten *GluI*-CHO-Sequenz (*GenBank*-Nr.: NM_001246770.1). Eine Sequenzierung der verwendeten adhärenen CHO K1-Zelle könnte Aufschluss über diese Unterschiede liefern. Letztlich wäre es dennoch unwahrscheinlich, dass eine einzelne, möglicherweise fehlerhafte, Base den *knockout* des Gens vollständig verhindern konnte. Mit großer Wahrscheinlichkeit waren die durch das CoDA-System generierten ZF-Nukleasen daher nicht funktionsfähig.

Trotz des gescheiterten *knockouts* des *GluI*-Gens mit dem CoDA-System besitzt die ZFN-Technologie großes Potential. Auch für CHO-Zellen konnten mit dieser Technik bereits mehrfach erfolgreich Gene ausgeschaltet werden. Santiago *et al.* (2008) haben in einer CHO S-Zelllinie die *Dhfr* ausgeschaltet und konnten damit ein weitverbreitetes Genamplifikationssystem nachstellen, DHFR^{-/-}-negative CHO DG44-Zellen. Sie werden häufig zur Generierung von Produktionszelllinien genutzt und können in Kombination mit einer MTX-Selektion hohe Produkttiter erzeugen (Wurm, 2004; Butler, 2005). Liu *et al.* (2010) führten, ebenfalls in CHO S-Zellen, einen Tripel-*knockout* durch. Sie schalteten zunächst *GluI*, gefolgt von *Dhfr* und *Fut8* aus und zeigten so, dass auch multiple Anwendungen unterschiedlicher ZF-Nukleasen sequentiell problemlos möglich sind. Weiterhin wendeten sie auch mehrere ZFN-Paare gleichzeitig an, was ebenfalls zu einem erfolgreichen *knockout* für jede Zielsequenz führte. Cost *et al.* (2010) schalteten *Bax* und *Bak* in einer CHO K1-Zelllinie aus. Die so generierten Zellen waren resistent gegen die Induktion von Apoptose durch Staurosporin bzw. zeigten während eines Kultivierungsverlaufes deutlich länger gleichbleibend hohe Viabilitäten als nicht mutierte CHO K1-Zellen. Auch die Beispiele des *GluI*-*knockouts* von Fan *et al.* (2012) oder des *knockouts* von *Fut8* durch Malphettes *et al.* (2010) demonstrierten die generelle Funktionalität des *knockouts* mit ZF-Nukleasen. Alle diese ZF-Nukleasen stammten von Sigma-Aldrich bzw. Sangamo Biosciences. Aber auch mit modularem Zusammenbau von ZF-Nukleasen konnten *knockouts* erzeugt werden, wie bereits zuvor diskutiert (Perez-Pinera *et al.*, 2011). Einzig die Möglichkeit einer kostengünstigen, aber auch effektiven Erzeugung wirksamer ZF-Nukleasen ist derzeit noch nicht vollständig gegeben. Verbesserungen der derzeit bestehenden, freien Methoden könnten in Zukunft zu einer breiteren Anwendung dieser Technik führen.

5.4 Herstellung von Erythropoetin- und Darbepoetin alfa-produzierenden CHO-Zellen

Damit die in dieser Arbeit untersuchten Auswirkungen der verschiedenen shRNAs (Abschnitt 5.2) in zukünftigen Arbeiten auch in anderen Zellen getestet werden können, wurden zwei verschiedene Zellpools generiert. Einer sollte die humane Variante des Proteins Erythropoetin (EPO) produzieren. Der andere Zellpool sollte ein verändertes EPO-Protein, das Darbepoetin alfa (DARBE) exprimieren (Abschnitt 3.4.6). Die Generierung dieser Zellen erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde der Promotor im eukaryotischen Expressionsvektor pcDNATM3.1(+) durch einen stärkeren Promotor ausgetauscht, damit die Expression des Zielgens gesteigert werden konnte. Mariati *et al.* (2010) konnten zeigen, dass der Austausch des CMV-Promotors des pcDNATM3.1(+)-Vektors gegen eine längere Variante mit dem ersten Exon des hCMV-MIE (*major immediate-early*-Gen des humanen Cytomegalievirus) Gens, sowie dem ersten Intron des hCMV-MIE-Gens zu einer etwa 2,3-fach höheren Expression von EPO in stabil transfizierten CHO K1-Zellen führte (Mariati *et al.*, 2010). Die Generierung der *Darbe*-Sequenz erfolgte durch Mutagenese der *Epo*-Sequenz. Die so generierten Sequenzen wurden dann in den zuvor erzeugten Expressionsvektor kloniert. Letztlich erfolgte die Transfektion dieser Konstrukte in CHO K1-Zellen und die Selektion zu einer stabilen Population.

5.4.1 Erzeugung des eukaryotischen Expressionsvektors pCMVMIE basierend auf pcDNATM3.1(+)

Neben verschiedenen *cis*- oder *trans*-aktiven Sequenzen und Proteinen wird die Expression eines Gens zu einem großen Teil durch den Promotor bestimmt. Da die Wechselwirkung zwischen Promotor und dem zu exprimierenden Gen den Produkttiter ebenfalls maßgeblich beeinflussen kann, ist die Wahl eines solchen Elements von hoher Bedeutung für eine gelungene Etablierung einer stabilen Produzentenzelllinie. Aus diesem Grund sollte der im pcDNATM3.1(+) vorliegende Standard-CMV-Promotor gegen eine optimierte Version dieses Promotors gefolgt vom Intron A des hCMV-MIE-Gens ausgetauscht werden. Für EPO konnte für die Nutzung dieser Promotor-Sequenzen bereits eine Steigerung der Expression im Vergleich zum Standard-CMV-Promotor nachgewiesen werden (Mariati *et al.*, 2010).

Zunächst wurde das Vektorrückgrat basierend auf pcDNATM3.1(+) vorbereitet. Dazu wurde das Ausgangsplasmid mit den Restriktionsenzymen *NruI* und *HindIII* geschnitten (Abschnitt 4.2.5). Dabei entstanden zwei Fragmente: der 703 bp große Promotor verbunden mit einem Teil der *multiple cloning site* (MCS) sowie das 4725 bp große Vektorrückgrat.

Der Restriktionsansatz wurde in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, wodurch Vektor und Promotor voneinander getrennt werden konnten (Abschnitt 4.2.7). Die Vektorbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Abschnitt 4.2.8). Das Plasmid gWizTM-SEAP diente als Quelle für die optimierte CMV-Intron A-Sequenz. Mittels einer PCR und den Primern 23 und 24 (Tabelle A.2) wurde die 1630 bp lange Sequenz amplifiziert (Abschnitt 4.2.1.1). Der PCR-Ansatz wurde durch Agarose-Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel getrennt und die Amplifikatbande aus dem Gel aufgereinigt (Abschnitte 4.2.7 und 4.2.8). Das aufgereinigte Fragment wurde mit *Hind*III verdaut (Abschnitt 4.2.5). Der *reverse*-Primer enthielt diese Schnittstelle, um das Insert kompatibel zum geschnittenen Vektor zu machen. Da *Nru*I *blunt-end* schneidet, war es für den *forward*-Primer nicht erforderlich, eine Schnittstelle einzubringen. Dem Restriktionsverdau folgte eine Aufreinigung des Fragmentes, um das *Hind*III-Enzym und die abgetrennten Nukleotide zu entfernen (Abschnitt 4.2.9). Anschließend wurden die beiden DNA-Stücke ligiert (Abschnitt 4.2.6). Der Ansatz wurde 20 min bei 22 °C inkubiert, hitzeinaktiviert, in kompetente TOP10 *E. coli* Bakterien transformiert und auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen (Abschnitte 4.1.3 und 4.1.1). Mit einer Kolonie-PCR und den Primern 29 und 30 (Tabelle A.2) wurden einige der Bakterienkolonien nach der Inkubation über Nacht auf die Integration des Fragments in den Vektor hin überprüft (Abschnitt 4.2.1.2). Eines der Plasmide mit integriertem hCMV MIE-Promotor wurde anschließend durch DNA-Mini-Präparation amplifiziert (Abschnitt 4.2.10). Es wird im Folgenden als pCMVMIE bezeichnet.

In einem nächsten Schritt sollte die Funktionalität des neuen Promotors verifiziert werden. Da durch eine Sequenzierung lediglich die korrekte Basenabfolge, nicht aber die generelle Funktionsfähigkeit des Promotors getestet werden kann, wurde ein leicht zu detektierendes Produkt in den Vektor inkloniert. Mit diesem Vektor transfizierte Zellen sollten anschließend auf die Expression des Produktes hin analysiert werden. Das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) ist zu diesem Zweck gut geeignet, da seine Expression über einfache Fluoreszenzmikroskopie oder auch mit durchflusszytometrischen Methoden nachgewiesen werden kann (Cormack *et al.*, 1996). Um das eGFP in den Expressionsvektor pCMVMIE zu klonieren, wurden der Vektor und das Plasmid peGFP-N1 mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten (Abschnitt 4.2.5). Aufgrund der geringeren Reaktionsgeschwindigkeit von *Not*I wurde der Verdau sequentiell durchgeführt. Zusätzlich wurde 1 µL FastAPTM zum pCMVMIE-Restriktionsverdau gegeben, um eine eventuelle Rezirkularisierung zu verhindern. Die Restriktionsansätze wurden nach Hitzeinaktivierung in einem 1 %igen Agarosegel separiert und die entsprechenden Banden aufgereinigt (Abschnitte 4.2.7 und 4.2.8). Der linearisierte pCMVMIE-Vektor und die eGFP-DNA wurden 1 h ligiert und anschließend transformiert (Abschnitte 4.2.6 und 4.1.3). Durch eine Kolonie-PCR mit den Primern 29 und 30

(Tabelle A.2) wurde die erfolgreiche Subklonierung verifiziert (Abschnitt 4.2.1.2). Ein Klon dieser Kolonie-PCR wurde für eine DNA-Mini-Präparation verwendet (Abschnitt 4.2.10).

Das eGFP-Expressionsplasmid (im Folgenden als pCMVMIE-eGFP bezeichnet) wurde in CHO DP-12-Zellen nukleofiziert (Abschnitt 4.3.7). Nach 24 h konnte die Expression des eGFP im FACS detektiert werden (Abschnitt 4.3.6). Dadurch war die Funktionalität des einklonierten CMV-MIE-Promotors bestätigt und das generierte Plasmid pCMVMIE konnte als Expressionsvektor verwendet werden.

5.4.2 Konstruktion von pCMVMIE-*Epo* und pCMVMIE-*Darbe*

Die humane *Epo*-cDNA-Sequenz wurde freundlicherweise vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, zur Verfügung gestellt und lag in einem pCR-Vektor der Firma Life Technologies (Darmstadt) vor. Zur Generierung des pCMVMIE-*Epo*-Vektors wurde die *Epo*-Sequenz mittels PCR und den Primern 25 und 26 (Tabelle A.2) mit dem pCR-*Epo*-Plasmid als *template* amplifiziert (Abschnitt 4.2.1.2). Anschließend wurde das Fragment aus einem 1 %igen Agarosegel aufgereinigt, mit *Apa*I und *Xho*I geschnitten und zur Entfernung der abgetrennten endständigen Basen erneut gereinigt (Abschnitte 4.2.7, 4.2.5 und 4.2.9). Der pCMVMIE-Vektor wurde analog dazu ebenfalls mit *Apa*I und *Xho*I unter Zugabe von FastAPTM geschnitten (Abschnitt 4.2.5). Nach einer Hitzeinaktivierung der Enzyme wurde der linearisierte pCMVMIE-Vektor aufgereinigt (Abschnitt 4.2.9). Anschließend wurden das *Epo*-Amplifikat und der Vektor für 3 h ligiert und die Ligase durch fünfminütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert (Abschnitt 4.2.6). Der ligierte Vektor wurde in TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert, die auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert wurden (Abschnitte 4.1.3 und 4.1.1). Klone, deren Plasmide ein *Epo*-Insert besaßen, wurden durch eine Kolonie-PCR mit den Primern 29 und 30 (Tabelle A.2) identifiziert (Abschnitt 4.2.1.2). Ein pCMVMIE-*Epo*-Klon mit korrekter Sequenz wurde anschließend durch Sequenzierung bestimmt (Abschnitt 4.2.17).

Die *Darbe*-Sequenz unterscheidet sich von der *Epo*-Sequenz in fünf Aminosäuren (Abschnitt 3.4.6). Um diese Sequenz zu generieren, wurde die *Epo*-cDNA-Sequenz mit einer Variante der Plasmid-Mutagenese verändert. Dazu wurde das pCR-*Epo*-Plasmid mutagenisiert (Abschnitt 4.2.1.3). Anschließend erfolgte der *Dpn*I-Verdau und die Hitzeschocktransformation mit 5 µL des *Dpn*I-verdauten PCR-Produktes (Abschnitt 4.1.3). Die Bakterien wurden auf einer mit Ampicillin versetzten Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C für 12 h inkubiert (Abschnitt 4.1.1). Von Übernachtskulturen von fünf der gewachsenen Klone wurde eine DNA-Minipräparation durchgeführt (Abschnitt 4.2.10). Die isolierten Plasmide wurden als *template* für eine PCR mit den Primern 29 und 30 (Tabelle A.2) verwendet (Abschnitt 4.2.1.2,

Tabellen 4.2 und 4.3), um PCR-Amplifikate der mutierten *Epo*-Sequenz zu erzeugen. Diese Amplifikate wurden mit ExoSAP-IT[®] behandelt und sequenziert (Abschnitte 4.2.16 und 4.2.17), wodurch ein Plasmid mit der *Darbe*-Sequenz bestimmt werden konnte. Da sich die mutierte Sequenz noch immer im pCR-Plasmid befand, wurde sie mit einer PCR vervielfältigt (Primer 25 und 26, Tabelle A.2) und in einem 1 %igen Agarosegel von der *template* DNA getrennt (Abschnitte 4.2.1.1 und 4.2.7). Die *Darbe*-DNA wurde aus dem Gel aufgereinigt, mit *Apa*I und *Xho*I verdaut und anschließend erneut gereinigt (Abschnitte 4.2.8, 4.2.5 und 4.2.9). Anschließend wurde die *Darbe*-DNA mit dem linearisierten pCMVMIE analog zur vorher durchgeführten *Epo*-pCMVMIE-Herstellung ligiert (Abschnitt 4.2.6). Nach der Hitzechocktransformation und der Inkubation der Bakterien über Nacht auf Ampicillin-haltigem Agar wurden Klone durch Kolonie-PCR identifiziert, deren Plasmide die *Darbe*-Sequenz inkorporiert hatten (Abschnitte 4.1.3, 4.1.1 und 4.2.1.2). Durch eine Sequenzierung wurde die korrekte Sequenz letztlich bestätigt (Abschnitt 4.2.17). Von den Plasmiden pCMVMIE-*Epo* und pCMVMIE-*Darbe* wurden DNA-Maxi-Präparationen angefertigt, um ausreichend Material für die späteren Transfektionen zu generieren (Abschnitt 4.2.10).

5.4.3 Ermittlung geeigneter Nukleofektionsparameter und *kill curve*-Experiment mit Geneticin in CHO K1-Zellen

Die Erzeugung stabiler EPO- bzw. DARBE-produzierender Zellen sollte durch Nukleofektion mit den zuvor konstruierten Expressionsplasmiden (Abschnitt 5.4.2) durchgeführt werden. Da die Nukleofektionsparameter für jede Zelllinie individuell ermittelt werden müssen, wurden 1×10^6 CHO K1-Zellen mit 5,5 μg des zuvor generierten pCMVMIE-*eGFP*-Plasmids transfiziert (Abschnitt 4.3.7). Es wurde die Nukleofektionslösung L in Kombination mit verschiedenen Programmen getestet. Zusätzlich wurde die Viabilität der nukleofizierten Zellen mit dem Cedex ermittelt (Abschnitt 4.3.3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Die höchste Transfektionsrate wurde mit Programm U-024 erreicht. Die Viabilität der Zellen lag dort bei 92 %. Generell konnte direkt nach der Transfektion mit den beiden U-Programmen eine Schaumbildung und Ablagerungen denaturierter Zellen bzw. Proteine beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde das schonendere X-001 Programm verwendet. Dies wies mit 42 % Transfektionsrate zwar eine geringere Effizienz auf, dafür war die Viabilität der Zellen nach der Transfektion mit ca. 97 % am höchsten. Eine hohe Transfektions-effizienz ist für die Generierung einer stabilen Zelllinie zwar von Vorteil, jedoch ist sie nicht notwendig, da im Normalfall eine Selektion durchgeführt wird, in der die nicht-transfizierten

Tabelle 5.7: Für die Transfektion von CHO K1-Suspensionszellen getestete Nukleofektionsprogramme. Alle Programme wurden mit der Nukleofektionslösung L verwendet. Der Anteil transfizierter Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer ermittelt, die Viabilität mit dem Cedex (Abschnitte 4.3.6 und 4.3.3).

Programm	Anteil transfizierter Zellen [%]	Viabilität [%]
U-023	82	91
U-024	86	92
X-001	42	97

Zellen aussortiert werden. Daher wurde für eine erste Transfektionsrunde Programm X-001 in Kombination mit Nukleofektionslösung L ausgewählt.

Wie bereits auch für die Puromycin-Selektion der transduzierten CHO DP-12-Zellen (Abschnitt 5.1.2), musste vor der Selektion von G418-resistenten Zellen eine zur Selektion geeignete Konzentration des Antibiotikums bestimmt werden. G418 gehört zu den Aminoglycosid-Antibiotika. Es stört die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen, indem die Elongation der Polypeptid-Kette inhibiert wird (Bar-Nun *et al.*, 1983). Eukaryotische Zellen haben je nach Zelltyp ein breites Toleranz-Spektrum gegenüber G418, welches von 200 bis 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reicht. Aus diesem Grund wurden sechs verschiedene G418-Konzentrationen in einem *kill curve*-Experiment mit CHO K1-Zellen eingesetzt. Dazu wurden in einem Parallelansatz mit 12 mL Kulturvolumen $4,5 \times 10^5$ Z/mL CHO K1 in Kultivierungsröhrchen angesetzt (Abschnitt 4.3.2). Die Röhrchen wurden mit 0, 50, 100, 200, 400, 600 bzw. 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 versetzt. Anschließend wurden die Kulturen täglich in Einfachbestimmung im Cedex gemessen (Abschnitt 4.3.3). Die einzusetzende G418-Konzentration sollte in der Lage sein, die viablen Zellen in einem Zeitraum von sieben Tagen abzutöten. In Abbildung 5.29 sind die Verläufe der Lebenszellichten und der Viabilitäten während der Kultivierung dargestellt.

Die Referenzkultur wuchs ohne Zugabe von G418 bis Tag 5 zu einer Zelldichte von 64×10^5 Z/mL heran und sank danach bei gleichzeitiger Verringerung der Viabilität wieder auf 46×10^5 Z/mL bis zum Abbruch der Kultivierung ab. Bereits ab einer G418-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ war die CHO K1-Kultur deutlich in ihrem Wachstum beeinflusst. Dennoch wuchsen die mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ versetzten Zellen bis zu einer maximalen viablen Zelldichte von 22×10^5 Z/mL an Tag 4 heran und waren auch zum Ende der Kultivierung mit ca. 33 % Viabilität noch nicht vollständig abgestorben. Die Kulturen mit 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 unterschieden sich bereits von der mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ supplementierten Kultur. Sie erreichten eine maximale Lebendzellichte von 8×10^5 Z/mL zum Zeitpunkt 2,7 bei den mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selektierten Zellen. Die mit 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selektierten Zellen wuchsen auf 7×10^5 Z/mL

an Zeitpunkt 1,7 heran. In beiden Kulturen konnten etwa ab Tag 7 kaum noch lebende Zellen detektiert werden. Die mit 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 behandelten Kulturen stagnierten direkt nach dem ersten Messpunkt in ihrem Wachstum. Die Viabilität sank in beiden Fällen direkt von Beginn an kontinuierlich ab, so dass nach ca. 3 Tagen praktisch keine viablen Zellen mehr nachgewiesen werden konnten. Zwar erfüllten die letzten beiden Konzentrationen damit die Anforderung, die nicht-resistenten Zellen in sieben Tagen zu töten, allerdings ist die drastische Reduktion in der Viabilität schon am ersten Messzeitpunkt ein Indiz dafür, dass diese Konzentrationen für eine anfängliche Selektion möglicherweise zu hoch wären.

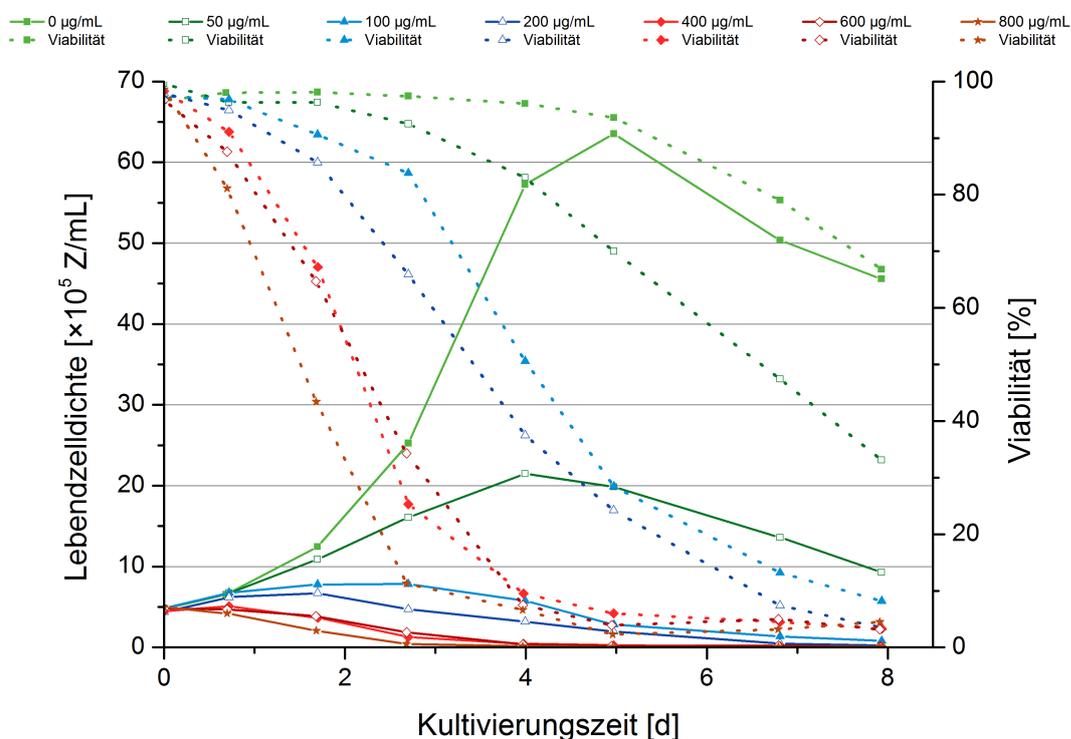


Abbildung 5.29: Lebendzellichten und Viabilitäten im Verlauf der Kultivierung von CHO K1-Suspensionszellen, versetzt mit verschiedenen Konzentrationen von G418.

Da davon auszugehen war, dass nach einer Transfektion mit einem linearisierten Plasmid dieses nicht umgehend in das Genom integriert wurde, war die Resistenzausbildung zu Beginn der Selektionsphase möglicherweise noch nicht optimal. Ein zu hoch angelegter Selektionsdruck kann in dieser kritischen Phase zu dem Absterben der gesamten Population trotz vorhandener Resistenz führen. Dies konnte in einigen Nukleofektionsexperimenten

beobachtet werden, in denen 600 µg/mL G418 als Antibiotikakonzentration getestet wurde. Aus diesem Grund wurde für die erste Selektion und zur Etablierung der Stabilität der Zelllinie eine Antibiotikakonzentration von 200 µg/mL gewählt.

5.4.4 Herstellung der stabilen CHO-EPO und CHO-DARBE-Zellpools

Zur Erzeugung der stabilen EPO- bzw. DARBE-produzierenden Zellpools wurden zunächst die Expressionsvektoren pCMVMIE-*Epo* und pCMVMIE-*Darbe* mit *Bgl*II linearisiert und anschließend gereinigt (Abschnitte 4.2.5 und 4.2.9). Dann wurden je 1×10^6 CHO K1-Zellen mit 6 µg linearisiertem pCMVMIE-*Epo* bzw. pCMVMIE-*Darbe* in Nukleofektionslösung L mit Programm X-001 transfiziert (Abschnitt 4.3.7). Nach der Transfektion wurden die Zellen in je ein *well* einer 12-*well*-Kulturplatte überführt (Abschnitt 4.3.2). Das Kultivierungsmedium wurde mit 5 % FCS versetzt. Nach 24 h wurde mit der G418-Selektion begonnen, indem 200 µg/mL Geneticin zu der Zellsuspension gegeben wurde. Die Entwicklung der Zellen während der Selektion wurde mit einem Lichtmikroskop kontrolliert. Vier Tage nach Zugabe des Geneticins waren die Zellen so weit gewachsen, dass es möglich war sie in eine 6-*well*-Kulturplatte umzusetzen. Auf eine weitere Zugabe von FCS wurde verzichtet. Nach weiteren 4 Tagen wurden die Kulturen im Cedex gemessen und anschließend in Kultivierungsröhrchen überführt, in denen die Selektion fortgeführt wurde (Abschnitte 4.3.3 und 4.3.2). Die Verläufe dieser Selektionen sind in den Abbildungen 5.30 und 5.31 dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist der Einbruch der Viabilität der CHO-EPO- und der CHO-DARBE-Zellen um ca. 40 % nach dem Transfer in die Kultivierungsröhrchen. Dieser Effekt kann zum einen auf die weitere Selektion zurückgeführt werden, zum anderen auf den Wechsel des Kultivierungssystems, oder auf eine Kombination dieser beiden. Der deutliche Einbruch der Viabilität bei einer Selektion wurde auch bei Puromycin-Selektionen beobachtet (Abschnitte 5.2.1.3, 5.2.2.3 und 5.2.3.3). Auffällig war, dass die Selektionseffekte häufig erst nach einer Verdünnung der Kultur einsetzten. Der Grund dafür könnte in der Art der Anwendung der Antibiotika liegen. Diese werden immer in Bezug auf das Kulturvolumen dosiert. Die Konzentration des Antibiotikums ist in einem Kulturvolumen zwar stets gleich, allerdings können in diesem Volumen mehr oder weniger Zellen in Suspension vorliegen. Trotz gleicher Antibiotikakonzentration ist die absolute Menge Antibiotikum pro Zelle höher, wenn nur wenige Zellen im Medium vorhanden sind.

Die erzeugten Zellpools wurden für etwa 20 Tage mit 200 µg/mL Geneticin kultiviert. Innerhalb dieser Zeit stieg die Viabilität wieder auf ca. 95 % an. Damit ein möglichst hoher Titer von EPO bzw. DARBE erzeugt werden konnte, wurde der Selektionsdruck sukzessive zunächst auf 600 µg/mL, dann auf 1200 µg/mL und schließlich auf 2000 µg/mL erhöht. Auf

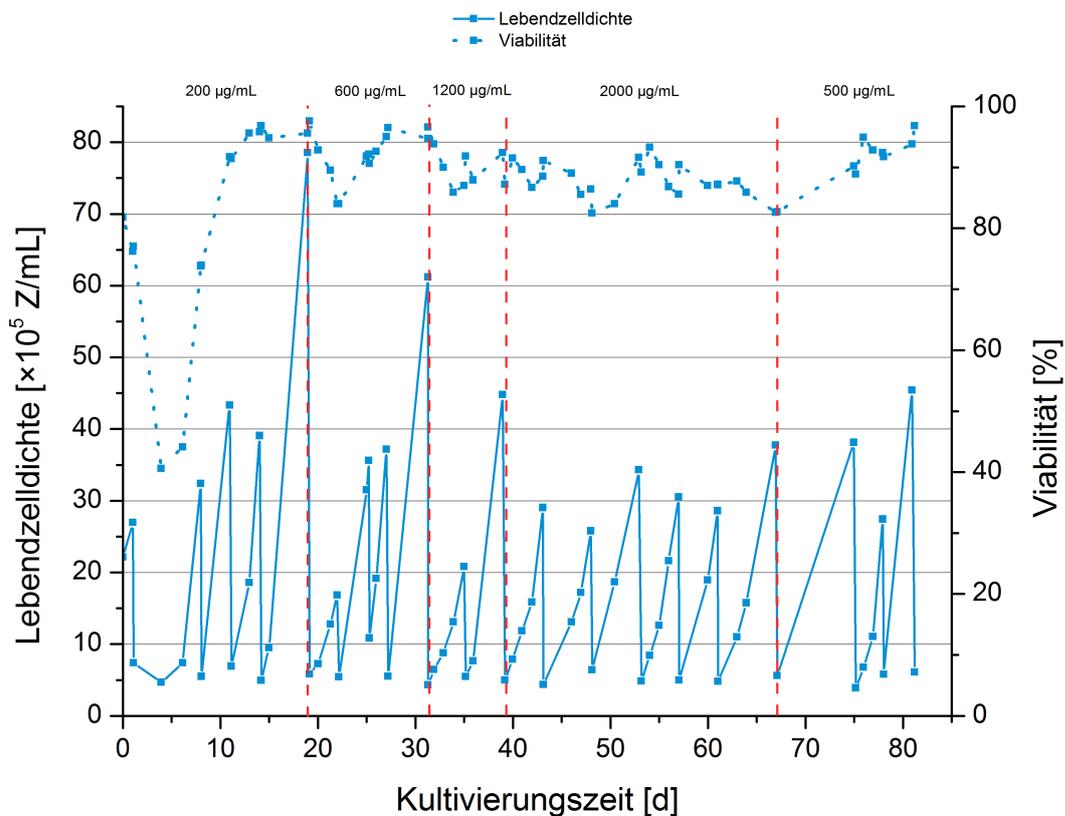


Abbildung 5.30: Selektion von G418-resistenten Zellen mit dem Ziel einen EPO-exprimierenden Zellpool zu generieren. Sowohl die Lebendzelldichte, als auch die Viabilität ist dargestellt. Die vertikalen, roten, gestrichelten Linien deuten eine Änderung der Konzentration des eingesetzten Geneticins an.

diese Weise sollten Zellen mit nur wenigen Integraten bzw. nur einer geringen Expression von Ziel- und Resistenzgen aussortiert werden. Direkt nach der Zugabe der nächsthöheren G418-Konzentration reagierten beide Zelllinien durch ein Absterben von Zellen, was in sich einer Verringerung der Viabilität äußerte. Sowohl 600 $\mu\text{g/mL}$ als auch 1200 $\mu\text{g/mL}$ schienen keinen deutlichen Einfluss auf die Kulturen zu haben, da sich das Zellwachstum und die Viabilität innerhalb von etwa 10 Tagen in etwa denen der mit 200 $\mu\text{g/mL}$ selektierten Zellen angepasst hatte. Bei weiterer Erhöhung auf 2000 $\mu\text{g/mL}$ sank die Viabilität in beiden Kulturen auf unter 90 %. Der starke Selektionsdruck sollte nicht über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden. Nach einer Geneticin-Selektion kann dieser auf 1/4 der Selektionskonzentration gesenkt werden. Der residuale Selektionsdruck soll den Verlust der integrierten Vektoren verhindern. Daher wurde nach 28 Tagen Selektion mit 2000 $\mu\text{g/mL}$

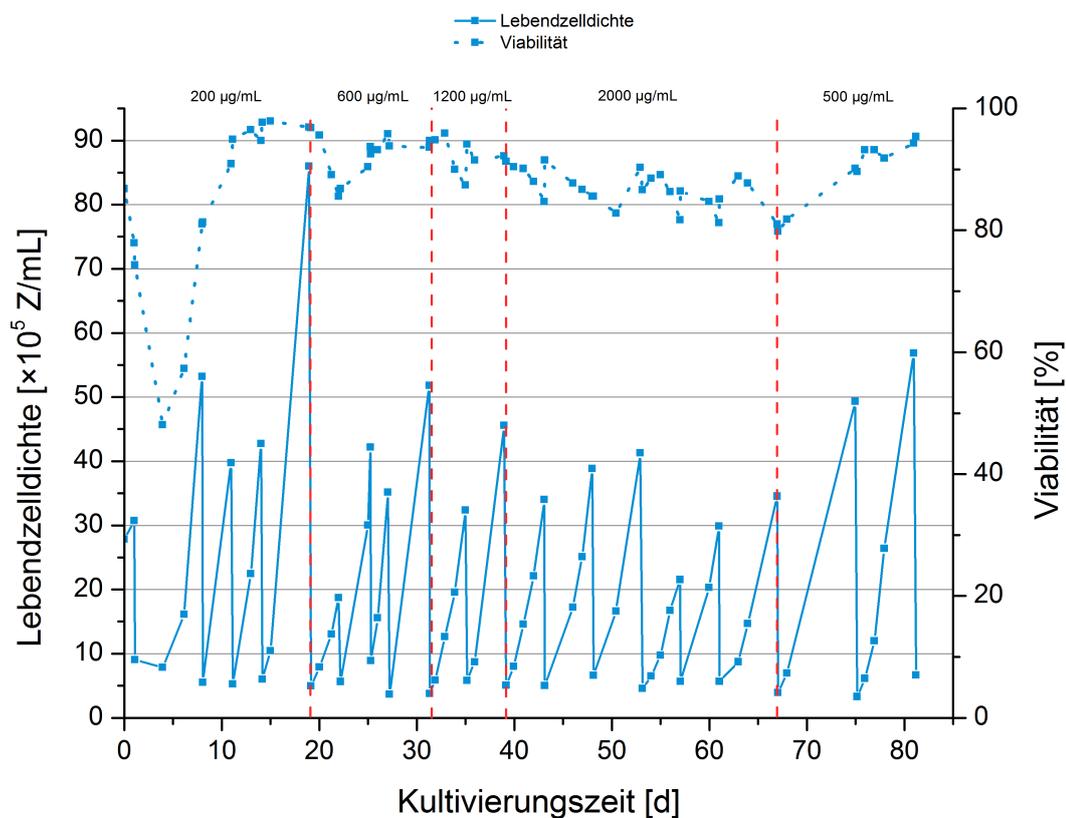


Abbildung 5.31: Selektionsverlauf für die G418-resistenten DARBE-Zellen, dargestellt durch die Lebendzellichte und die Viabilität. Analog zur vorherigen Grafik, zeigen die vertikalen, roten, gestrichelten Linien eine Änderung der Konzentration des selektiven Agens an.

die G418-Konzentration auf 500 $\mu\text{g/mL}$ reduziert. Die Viabilität beider Zelllinien regenerierte sich daraufhin wieder auf Werte um 95 %. Zur Abgrenzung der Bezeichnung von den später erzeugten Zellen, werden diese erzeugten Zellpools im Folgenden als CHO-EPO1 bzw. CHO-DARBE1 bezeichnet.

Mehrere Transfektionen können bei transienten Expressionen den erzeugten Produkttiter eines Zellpools erhöhen. Da sich dieser Effekt möglicherweise auf stabil-transfizierte Zellen übertragen lässt, wurden sowohl die CHO-EPO-, als auch die CHO-DARBE-Zellpools ein zweites Mal mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Dazu wurden pCMVMIE-EPO und pCMVMIE-DARBE erneut mit *Bgl*II linearisiert und gereinigt (Abschnitt 4.2.5 und 4.2.9). Anschließend wurden die Plasmide in zuvor mit 1200 $\mu\text{g/mL}$ selektionierte Zellpools nukleofiziert (Abschnitt 4.3.7). Bei dieser Transfektion wurde Programm U-023 in Nukleofektionslösung L verwendet (Abschnitt 5.4.3). Dieses Programm wies mit

82 % eine höhere Transfektionsrate auf, als Programm X-001 mit 42 %. Zwar führte dies ebenfalls zu einer stärkeren Belastung der Zellen, da diese aber bereits einmal transfiziert worden waren und somit der Effekt der Selektion nicht zu stark ausfallen sollte, wurde der dadurch auftretende Zellstress für diese Transfektion vernachlässigt. Die Zellen wurden nach der Transfektion wieder in die *wells* einer 12-*well*-Zellkulturplatte mit 2 mL Kulturvolumen überführt. Nach 24 h wurden 1800 µg/mL Geneticin zu den Kulturen hinzugefügt. Die Zellen wurden dann analog zur Vorgehensweise bei der ersten Transfektion zuerst in einer 6-*well*-Kulturplatte expandiert und anschließend in Kultivierungsröhrchen transferiert (Abschnitt 4.3.2). Der Selektionsdruck wurde auch für diese Zellen nach 14 Tagen auf 500 µg/mL reduziert. Die Zellpools dieser Transfektion werden nachfolgend CHO-EPO2 und CHO-DARBE2 genannt.

5.4.5 Batch-Parallelkultivierung der verschiedenen CHO-EPO- und CHO-DARBE-exprimierenden Zellpools

Damit die in der ersten und zweiten Transfektion erzeugten Zelllinien auf ihr Wachstumsverhalten und ihre Produktivität hin untersucht werden konnten, wurde eine Batch-Shaker-Parallelkultivierung der 4 verschiedenen Zellpools durchgeführt. Dazu wurden 50 mL Kultivierungsmedium, versetzt mit 500 µg/mL G418 und 5 mM Glutamin, mit einer Startzellendichte von 5×10^5 Z/mL inokuliert. Der Verlauf der Kultivierung wurde durch regelmäßige Doppelbestimmungen im Cedex kontrolliert (Abschnitt 4.3.3). Zusätzlich wurde zellfreier Überstand für die Bestimmung des Produkttiters eingefroren. Der initiale Selektionsdruck durch das Geneticin wurde im Laufe der Kultivierung nicht durch Zugabe von weiterem Geneticin aufrechterhalten. Abbildung 5.32 zeigt die Entwicklung der Lebendzellichte und der Viabilitäten während des Batches. Zum Kultivierungszeitpunkt 2 wurde keine Probe genommen. Die Daten diesbezüglich fehlen daher in der Grafik und den weiteren Analysen.

Die erzeugten Zellpools unterschieden sich in ihrem Wachstumsverhalten voneinander. Dabei variierten die Ergebnisse nicht nur zwischen den EPO- und den DARBE-exprimierenden Zellen, sondern auch zwischen den jeweiligen Produzenten der ersten und der zweiten Transfektionsrunde. Die geringste maximale viable Zelldichte im Vergleich der vier Parallelansätze erreichten die CHO-EPO1-Zellen mit 126×10^5 Z/mL. Die daraus hervorgegangenen Zellen CHO-EPO2 erreichten bereits eine Lebendzellichte von 152×10^5 Z/mL. Die DARBE-exprimierenden Zellen der ersten und der zweiten Generation erreichten wiederum höhere viable Zelldichten als die EPO-produzierenden Zellen. CHO-DARBE1 wuchs bis zu 148×10^5 Z/mL, CHO-DARBE2 bis 167×10^5 Z/mL. Die Viabilitäten aller Kulturen entwickelten sich bis zum Kultivierungstag 6,7 annähernd identisch. Allerdings waren

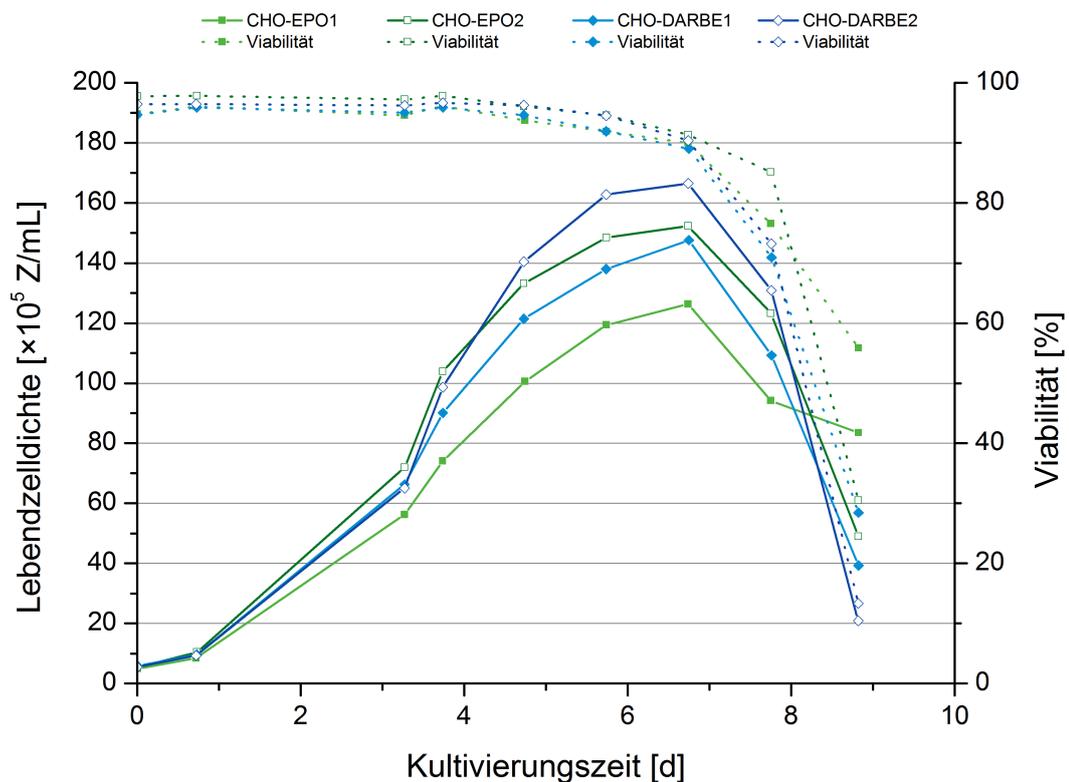


Abbildung 5.32: Kultivierungsverlauf der verschiedenen EPO- und DARBE-Zellpools in Form der Lebendzellichte und der Viabilität. Die EPO1- und EPO2-Zellen sind durch unterschiedliche Grüntöne visualisiert, die DARBE1- und DARBE2-Zellen durch Blauschattierungen.

die Viabilitäten der Zellen der zweiten Transfektionsrunde mit ca. 96 % etwas höher, als die der ersten Runde, die bei etwa 94 % lagen (Kultivierungszeitpunkt 4,7). Der Absterbeprozess der CHO-EPO1-Zellen verlief langsamer als der des CHO-EPO2-Zellpools. Zum Kultivierungszeitpunkt 8,8 lagen noch 84×10^5 Z/mL bei einer Kulturviabilität von 56 % im *pool* der CHO-EPO1-Zellen vor. Zum gleichen Zeitpunkt enthielt der CHO-EPO2-*pool* noch 49×10^5 Z/mL bei einer Viabilität von 31 %. Der Unterschied zwischen den Zellen der ersten und der zweiten Transfektionsrunde ist ebenfalls im Integral der Zellen über die Zeit nachzuverfolgen (Abbildung 5.33).

Das größte Zell-Zeit-Integral erreichten die CHO-DARBE2-Zellen. Verglichen mit den CHO-DARBE1-Zellen, aus denen die CHO-DARBE2-Zellen erzeugt wurden, war es mit $806,8 \times 10^5$ Z \cdot d \cdot mL $^{-1}$ etwa 11 % größer als das der Ursprungszellen. Das Integral des CHO-EPO2-Zellpools war 23 % größer als das der Ausgangszellen, der CHO-EPO1-Zellen. Da die Zellen etwa gleichlang kultiviert wurden, kann eine erhöhte Passagenzahl nicht der

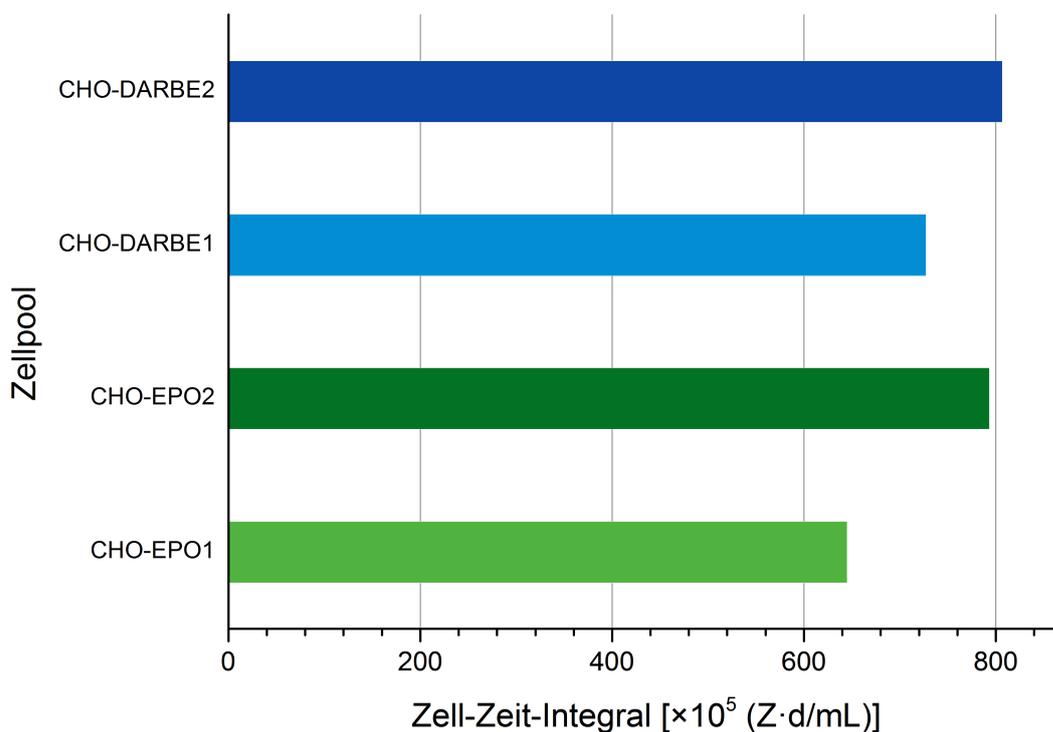


Abbildung 5.33: Darstellung der Zell-Zeit-Integrale berechnet aus den Batch-Kultivierungsdaten der EPO- und DARBE-Zellpools. Ähnlich wie bei den zuvor berechneten Zell-Zeit-Integralen der Batch-Kultivierungen der *knockdown*-Zellpools, wurde auch hier auf die Einbeziehung des Kulturvolumens verzichtet, weshalb es als Einheit in der Dimension des Integrals hinzugerechnet wird.

Grund für die Zunahme des Wachstums gewesen sein. Für die CHO DP-12-Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass eine *high passage*-Kultivierung das Wachstumsverhalten der Zelle im Vergleich zum ursprünglichen Phänotyp deutlich ändern kann (Beckmann *et al.*, 2012). Möglicherweise fand bei der zweiten Transfektion die Integration der Vektoren in Gene, deren Expression kontraproduktiv für ein erhöhtes Zellwachstum sind, statt. Vom Beginn der Modifikation bis zum Batch sind insgesamt ca. 100 Tage vergangen. In dieser Zeit adaptierte sich das Wachstum der Zellen an die Kultivierungsröhrchen bzw. die Shaker. Zudem wurden zwangsläufig Subpopulationen isoliert, die sich durch ein robustes und schnelles Wachstumsprofil auszeichneten, da sie die langsamer wachsenden Zellen in der Kultur überwucherten. Die erhöhte Maximalzelldichte könnte also zum einen auf unterschiedliche Kultivierungssysteme, auf die durchgeführte Transfektion, aber auch auf die längere Kultivierungszeit zurückgeführt werden. Für die Transfektion als Grund des verbesserten

Wachstums sprach als Indiz jedoch die Viabilität der Kulturen. Es war zu beobachten, dass die Viabilitäten der zweimal transfizierten Zellen höher waren als die der ersten Transfektion. Wenngleich diese Unterschiede lediglich etwa 2 % betragen, so mag dies dennoch auf eine erhöhte Anzahl an Resistenzgenen zurückzuführen sein, die eine bessere Inaktivierung des G418 in diesen Zellen ermöglichten. Dies ist vergleichbar mit der Erhöhung des Selektionsdrucks in der Selektionsphase. Auch dort wuchsen die Zellen mit einem höheren Selektionsdruck, z. B. 2000 µg/mL, weiter, jedoch mit geringerer Viabilität. Mithilfe einer qRT-PCR könnte geklärt werden, ob die zweite Transfektion tatsächlich zu einer erhöhten Anzahl an Produktgenen in der Zelle geführt hat. Dazu könnte sowohl das mRNA-Level der inklinierten *Epo*- bzw. *Darbe*-Sequenz vermessen, als auch die Anzahl der genomischen Integrate erfasst werden. So könnte zusätzlich zwischen einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität oder der tatsächlich höheren Anzahl an genomischen Integraten differenziert werden.

Wie auch bei der Selektion Puromycin-resistenter Zellklone (Abschnitt 5.2), erlaubt die Feststellung der Resistenz einer Zellpopulation gegen ein selektives Agens keinerlei Aussage über die damit verbundene Produktion des Zielgens. Daher wurden die während der Kultivierung eingefrorenen Proben durch RP-HPLC (Abschnitt 4.5.4) auf ihren Produkttiter hin untersucht. Abbildung 5.34 zeigt den Verlauf der EPO- bzw. DARBE-Konzentration während der durchgeführten Batch-Kultivierung.

Auch bei der Darstellung der Produkttiter ist zu beachten, dass an Kultivierungstag 2 keine Probe genommen wurde. An Kultivierungszeitpunkt 7,8 konnte die Probe des CHO-EPO1-Zellpools aus technischen Gründen nicht vermessen werden, daher fehlt der Wert an dieser Stelle. Generell stiegen die Produkttiter während der Kultivierung annähernd linear an. So sind die maximalen Titer in fast allen Fällen zum Ende des Batches an Zeitpunkt 8,8 zu finden. Der CHO-EPO1-Zellpool erreichte eine EPO-Konzentration von 38 mg/L Produkt, der CHO-EPO2-Zellpool produzierte 49 mg/L EPO. Damit erreichten die Zellen nach der zweiten Transfektion höhere Produkttiter als die nur einmal transfizierten Zellen. Ob dieser Effekt jedoch tatsächlich an der Transfektion und damit an einer höheren Anzahl an integrierten Plasmiden lag, kann an dieser Stelle lediglich vermutet werden. Die höhere Produktkonzentration könnte ebenfalls durch die höhere Lebendzellichte bzw. das höhere Zell-Zeit-Integral begründet sein. Das verbesserte Wachstumsverhalten könnte, wie bereits zuvor beschrieben, durch eine erhöhte Anzahl an Integraten bzw. Resistenz-vermittelnden Genen hervorgerufen werden, was letztlich den höheren Produkttiter wieder auf den Erfolg der zweiten Transfektion zurückführen würde.

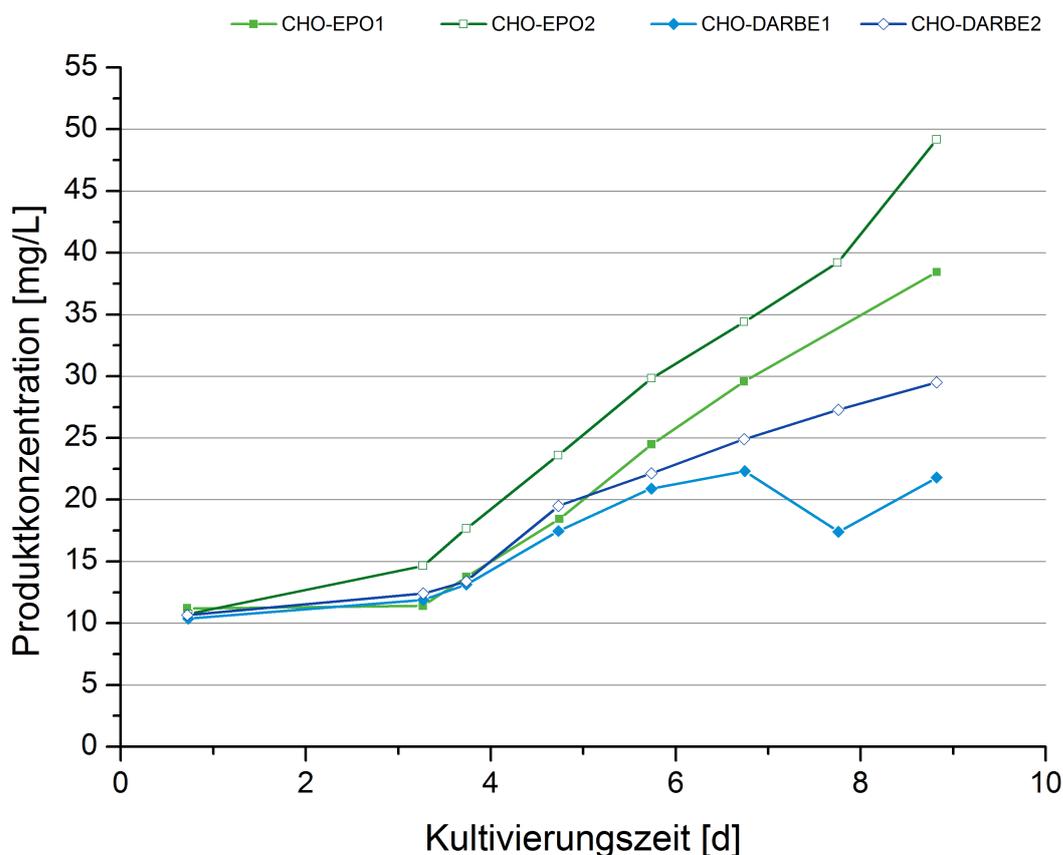


Abbildung 5.34: Entwicklung der Produktkonzentrationen von EPO und DARBE im Verlauf der Batch-Kultivierung der 4 verschiedenen Zellpools. Generell erzeugten die Zellpools nach der zweiten Transfektion mehr Produkt als nach nur einer Transfektion. Das Detektionslimit der Methode zur Bestimmung der EPO/DARBE-Konzentration (Abschnitt 4.5.4) lag bei etwa 10 mg/L. Erst nach Kultivierungstag 3 stiegen die Titer über diese Werte deutlich hinaus, so dass die gemessenen Konzentrationen sicher bestimmt werden konnten.

Die Produktkonzentrationen des DARBE waren geringer als die des EPO. Der CHO-DARBE1-Zellpool erreichte mit 22 mg/L eine maximale DARBE-Konzentration an Tag 6,8, der CHO-DARBE2-Zellpool hatte nach 8,8 Tagen 30 mg/L Darbepoetin alfa produziert. Dabei fiel auf, dass die DARBE-Konzentration des ersten Zellpools eine Reduktion des Produkttiters an Tag 7,6, gefolgt von einer erneuten Steigerung an Tag 8,8, aufwies. Dieses Verhalten wäre ungewöhnlich und ist aller Wahrscheinlichkeit nach einer Messungenauigkeit zuzuschreiben. Dadurch waren die CHO-DARBE1-Zellen die einzigen Zellen in dieser

Parallelkultivierung, deren Produktkonzentration nicht am letzten Kultivierungstag ihren höchsten Wert erreicht hatte.

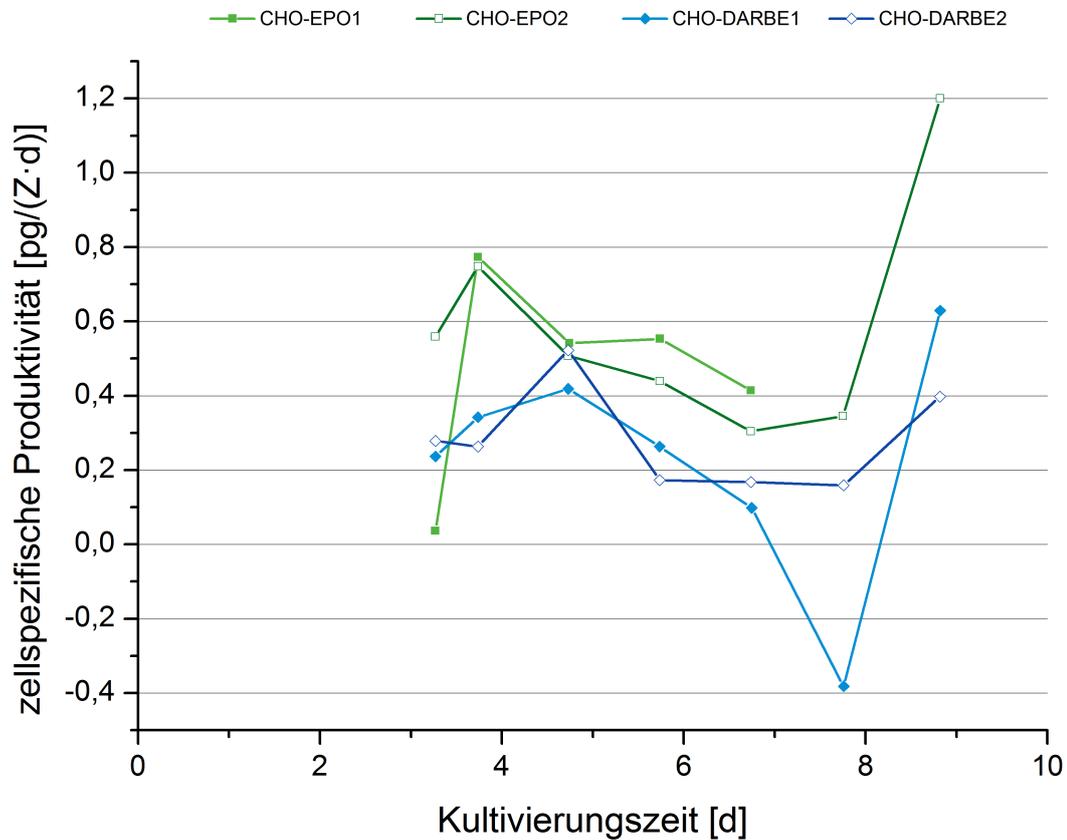


Abbildung 5.35: Entwicklung der zellspezifischen Produktivitäten der verschiedenen EPO- und DARBE-Zellpools während der Batch-Kultivierung. Die Berechnung der Produktivität beginnt erst nach Tag 3, da die ermittelten Produkttiter zu Beginn der Kultivierung am Detektionslimit bei etwa 10 mg/L gemessen wurden und somit nicht sicher bestimmbar waren.

Die Produktivitäten der EPO- und DARBE-Zellen (Abbildung 5.35) unterschieden sich von den für die CHO DP-12-Zellen gemessenen zellspezifischen Produktivitäten (Abschnitte 5.2.5 und 5.2.6). Während letztere praktisch kontinuierlich während des Kultivierungsverlaufs sanken, blieben die zellspezifischen Produktivitäten der EPO- und DARBE-Zellen eher konstant bzw. stiegen gegen Ende des Batches wieder an. Dieses Verhalten, zusammen mit dem stetigen Anstieg des Produkttiters, ohne eine Plateau-Phase zu erreichen, deutet auf eine nicht-wachstumsgekoppelte Produktivität hin. Ein direkter Vergleich der Produktivitäten zwischen den unterschiedlichen EPO- und DARBE-Zellpools erschien an dieser Stelle

nicht sinnvoll, da das Fehlen von Messwerten dazu führte, dass nicht alle Werte berechnet werden konnten. Eine solche Interpretation wäre damit eher spekulativ und könnte von den tatsächlichen Gegebenheiten abweichen.

In der Literatur werden die EPO-Titer zumeist mit einem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) bestimmt. Dadurch sind die meisten Angaben in IU/mL (*international units pro mL*) und können somit schlecht mit den hier gemessenen Werten verglichen werden. Sun *et al.* (2006) führten Transfektionsexperimente mit HEK293-EBNA1-Zellen durch, bei denen sie die EPO-Konzentration während eines Batches und eines Fed-Batches sowohl in mg/L als auch in IU/mL verfolgten. Dabei konnte bei der transienten Transfektion ein finaler EPO-Titer von etwa 18 mg/L erreicht werden. Im Fed-Batch lag die maximale Produktkonzentration bei etwa 34 mg/L. Die erzielten Produkttiter, sowohl des Batches, als auch des Fed-Batches, waren damit geringer als die in dieser Arbeit generierten Produkttiter (CHO-EPO2). Die DARBE-Konzentrationen waren ebenfalls höher als die der vergleichbaren Batch-Kultur, jedoch nicht so hoch wie in der Fed-Batch-Kultur. Es ist natürlich zu bedenken, dass es sich um ein anderes zelluläres System handelte und die CHO-Zellen nicht direkt mit HEK293-EBNA1-Zellen zu vergleichen sind. Dennoch erreichen transiente Transfektionen in der Regel höhere Produkttiter als stabile Modifikationen. Dies deutet auf eine gute Eignung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Zellpools als Produktionszellen hin. In einer anderen Arbeit wurden ebenfalls CHO-Zellen für die Expression von EPO genutzt (Ku *et al.*, 2007). Da die Fragestellung der Arbeit sich auf Transfektionseffekte und Produktsekretionssteigerungen bezog, wurden dort keine vollständigen Batch-Kultivierungen durchgeführt, sondern lediglich 2 Tage nach der Transfektion bzw. nach dem Medienwechsel bei stabilen Zellen der EPO-Produkttitel bestimmt. Je nach Modifikation der Zellen erreichten die transient transfizierten CHO K1-Zellen EPO-Titer zwischen ca. 0,24 mg/L und etwa 0,5 mg/L. Die stabil transfizierten EPO-Zellen produzierten lediglich 0,005 mg/L des Proteins (Ku *et al.*, 2007). Ein Unterschied durch verschiedene Zelltypen kann an dieser Stelle ausgeschlossen werden, da sowohl die in dieser Arbeit erzeugten Zellpools, als auch die beschriebenen Zellen auf der CHO K1-Zelllinie basierten. Obwohl die Kultivierung der Zellen nicht vollständig durchgeführt wurde, erreichten die in dieser Arbeit erzeugten EPO2-Zellen mit einem Titer von 15 mg/L nach drei Tagen Kultivierung eine 2920 % ($\Delta_{[\text{EPO}]}$ 14,5 mg/L) höhere EPO-Konzentration als die besten transient transfizierten CHO-Zellen von Ku *et al.* (2007). Der Produktunterschied zur stabilen Zelllinie zu diesen Zeitpunkten betrug 14,995 mg/L (292000 %).

Eine Umrechnung der in dieser Arbeit erreichten EPO-Konzentrationen in IU/mL mit dem von Sun *et al.* angegebenen Konversionsfaktor soll eine Vergleichbarkeit mit anderen Literaturquellen ermöglichen, in denen lediglich die EPO-Konzentration in IU/mL be-

stimmt wurde. Dabei ist zu beachten, dass dieser Wert fehlerbehaftet sein kann. Er dient damit lediglich einer ungefähren Einschätzung der Produktionsfähigkeit der generierten EPO/DARBE-Zellen. Der höchste EPO-Titer, der in dieser Arbeit erzeugt wurde, betrug 49 mg/L. Dies würde in etwa einer EPO-Menge von 6865 IU/mL entsprechen. Park *et al.* (2012) haben unterschiedliche EPO-produzierende CHO-Zellen erzeugt. Dazu wurde eine EPO-produzierende Zelllinie mit dem *Bombyx mori 30Kc19*-Gen transfiziert, welches sich positiv auf die Produktivität auswirken kann (Park *et al.*, 2012). Die Negativkontrolle (Zellen mit einem Leervektor transfiziert) produzierten in einer Batch-Kultivierung etwa 2900 IU/mL. Die genetisch modifizierten Zellen erreichten einen Titer von etwa 7000 IU/mL. Die nicht zusätzlich optimierten Zellen dieser Arbeit generierten etwa 136 % mehr Produkt als die vergleichbare Negativkontrolle und in etwa so viel, wie die bereits optimierte, *30Kc19*-überexprimierende Zelllinie (Park *et al.*, 2012). Demzufolge eignen sich die in dieser Arbeit erzeugten EPO- und DARBE-Zellen, alleine was die Produktivität der Zielproteine angeht, sehr gut zur Etablierung einer entsprechenden monoklonalen Zelllinie, da sie auch ohne genetische Modifikation hohe Titer generieren können.

Obleich die erreichten Produktkonzentrationen der in dieser Arbeit erzeugten EPO- und DARBE-exprimierenden Zellen deutlich höher waren als die vergleichbarer Zellen (Sun *et al.*, 2006; Ku *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2012), ist auch die Produktqualität ein entscheidender Faktor für die Beurteilung des Erfolgs der Erzeugung stabiler Produzenten. So konnte im Chromatogramm während der Produktquantifizierung im Laufe der Kultivierung eine Zunahme von zusätzlichen Peaks detektiert werden. Diese nahmen gegen Ende des Batches in ihrer Höhe zu. Ein Beispiel dieser Peaks ist in Abbildung 5.36 gezeigt.

Die Identifikation des DARBE-Peaks war zwar weiterhin eindeutig, jedoch schienen weitere Produkte mit zunehmender Kultivierungsdauer im Überstand zu akkumulieren. Dabei könnte es sich um DARBE-Isoformen, bedingt durch unterschiedliche Glykosylierungsstrukturen, handeln. Es müsste in nachfolgenden Arbeiten geklärt werden, ob es sich tatsächlich um Isoformen handelt und wie diese entstehen. Bisher erfolgte die Kultivierung in einem Zellpool. Es ist möglich, dass einzelne Isoformen lediglich von einer Subpopulation des Pools produziert wurden und daher im Verlauf der Kultivierung akkumulierten. Allerdings wäre es auch denkbar, dass alle Zellen des Pools diese Isoformen mehr oder weniger stark produzierten, die Akkumulation gegen Ende des Batches aber stärker war. Aus diesem Grund werden sowohl die Analyse der Glykostrukturen von EPO und DARBE empfohlen, als auch die Generierung einer monoklonalen Kultur aus den bisher vorliegenden Zellpools. Eine exakte Evaluierung der Produktqualität kann zusätzlich bei einer Prozessentwicklung für diese Zellen hilfreich sein, da die Qualität des Produktes bei sinkender Viabilität der Zellkultur ebenso reduziert sein kann. Eine Glykosylierungsanalytik könnte zudem die Schaffung der

beiden neuen N-Glykosylierungsstellen verifizieren. Die zusätzlichen Peaks wurden auch bei den EPO-Quantifizierungen detektiert.

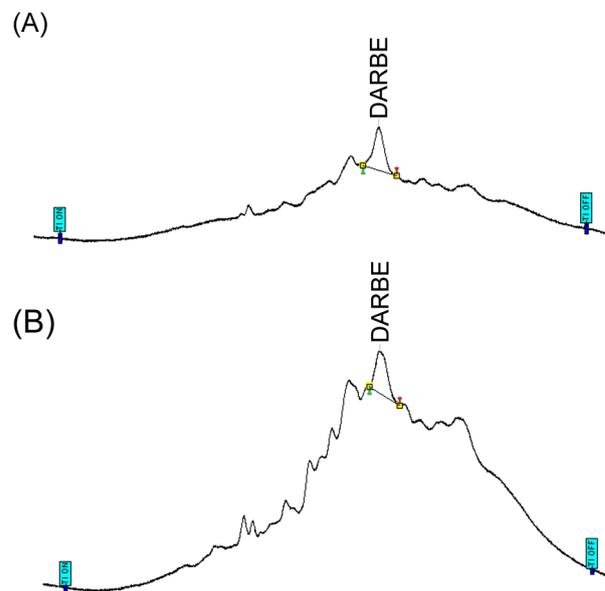


Abbildung 5.36: (A) Quantifizierung von DARBE1 aus der Probe von Kultivierungstag 7. (B) Quantifikation von DARBE1 des Kultivierungstags 10. Obwohl der DARBE-Peak in seiner Höhe zugenommen hat, waren auch die umliegenden Peaks deutlicher geworden. Die Markierungen an den Seiten zeigen den Beginn der Basislinie.

6 Ausblick

Die gezielte Modifikation einer Zelllinie kann dazu genutzt werden, um verschiedene Parameter, wie das Zellwachstum oder die Produktivität, zu beeinflussen. In dieser Arbeit wurde die RNA-Interferenz dazu verwendet, um die Auswirkungen des *knockdowns* auf den Phänotyp zu evaluieren. Dazu wurden die modifizierten Zellen sowohl in Batch-, als auch in Fed-Batch-Kultivierungen untersucht. Aus den gewonnenen Erkenntnissen ergaben sich weitere Fragestellungen, die in zukünftigen Arbeiten verfolgt werden sollten.

Zunächst ist zu bedenken, dass es sich bei allen erzeugten modifizierten Zellen um Zellpools und nicht um eine monoklonale Kultur handelte. Für eine Evaluierung eines *knockdown*-Effektes ist dies ausreichend, sollten die Zellen jedoch weiter genutzt werden, ist die Etablierung einer monoklonalen Kultur ratsam. Auf diese Weise werden Variabilitäten eliminiert, die auf der statistischen Verteilung z. B. der lentiviralen Integration beruhen und eine Auswertung erschweren, da in dem Zellpool Subpopulationen mit unterschiedlichen *silencing*-Stärken existieren. Die Etablierung kann traditionell durch *limited dilution* erfolgen. Der Arbeitsaufwand ist dabei relativ hoch, da die Verdünnungen meist manuell durchgeführt werden müssen und ein *screening* vieler Klone notwendig ist. Andere Systeme, wie das Sortieren mittels Durchflusszytometrie, können die Vereinzelung der Zellen deutlich beschleunigen, sind aber weniger schonend und führen häufig zu Viabilitätsverlusten. Zudem ersetzen diese Systeme, wie z. B. das LEAPTM (Fa. Intrexon, USA) oder das FACS Aria III (Fa. BD, USA), nicht das *screening* der erzeugten monoklonalen Kulturen. Das ClonePixTM-System (Fa. Molecular Devices, USA) erlaubt eine automatisierte Zellvereinzelung bei gleichzeitiger Evaluation der zellspezifischen Produktivität. Die Generierung einer monoklonalen Zelllinie aus den erzeugten Zellpools könnte damit vereinfacht werden.

Die Reduktion der mRNA durch die RNAi wurde in dieser Doktorarbeit mit Hilfe der qRT-PCR verifiziert. Jedoch wurde eine damit verbundene Reduktion der spezifischen Proteinabundanz nicht explizit nachgewiesen. In der bereits publizierten Literatur wurde ein solcher Nachweis bereits häufig erbracht, weshalb an dieser Stelle darauf verzichtet wurde. Dennoch könnte der Nachweis der Verringerung der Proteinmenge mittels SDS-Gelen oder Western-Blots die Auswirkungen der mRNA-Reduktion direkt aufzeigen. Weiterhin ist eine genauere Charakterisierung, vorzugsweise der monoklonalen Zelllinien, erforderlich. Für das Verständnis der veränderten Regulation der Zellen können weitere kultivierungsbeglei-

tende Analysen, wie z. B. Apoptose-Assays oder Zellzyklusanalysen, durchgeführt werden. Zudem sollten speziell für die *Lgals1-kd*-Zellen weitere Substrate während der Kultivierung erfasst und überprüft werden, um die mögliche Limitierung identifizieren und gegebenenfalls beheben zu können. Für alle erzeugten Zellpools einschließlich der Negativkontrolle würden cDNA- μ Arrays oder Proteomanalysen helfen, die Veränderungen des Phänotyps erklären zu können. So könnten einige der aufgestellten Hypothesen bezüglich einer veränderten Regulation durch den *knockdown* verifiziert oder widerlegt werden. Weiterhin ist auch die tatsächliche Anzahl der Provirus-Integrate und deren Integrationsort wichtig für das Verständnis der erfolgten Modifikation. Dies könnte durch FISH (*fluorescence in situ hybridization*) verbunden mit einer Sequenzierung geklärt werden.

In Hinblick auf eine weitere Verbesserung einer Zelllinie durch RNAi sollten doppelte *knockdowns* in Betracht gezogen werden. So könnte die Produktausbeute der *Lgals1-kd*-Zellen noch weiter gesteigert werden, wenn das frühe Absterben der Zellen hinausgezögert werden könnte. Auch das *Set*-Transkript könnte sich als guter Kandidat für die ZLE erweisen, wenn weitere Komponenten des INHAT-Komplexes reduziert werden. Dabei ist zu beachten, dass eine Sättigung der RNAi-Maschinerie durch die exogenen siRNAs vermieden wird. Dies kann zu starken *off-target*-Effekten, aber auch zu einer Verschlechterung des Wachstums- und Produktionsverhaltens führen, da die endogene Regulation der miRNAs oder der endo-siRNAs nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. In dem Fall müsste auf alternative Systeme, wie die ZF-Nukleasen zurückgegriffen werden. Weitere Tests des CoDA-Systems könnten aufzeigen, ob es generell ein nützliches *tool* für den *knockout* in CHO-Zellen darstellt und der in dieser Arbeit nicht nachgewiesene *knockout* in einer ungünstigen Sequenz für die ZF-Nukleasen begründet war.

Die Nutzung des lentiviralen Transduktionssystems zur Erzeugung der stabil modifizierten Zellpools hat sich als geeignetes System erwiesen. Dennoch bleibt zu bedenken, dass die Transduktion selbst ebenfalls die Eigenschaften der Zelle verändern kann. Dies konnte am Phänotyp der pLVX-Zellen nachvollzogen werden, der sich von der Parentalzelle unterschied. Die Generierung eines weiteren pLVX-Zellpools könnte zeigen, ob dieser Phänotyp reproduzierbar ist, oder ob sich die Eigenschaften der Negativkontrolle mit jeder Transduktion ändern. Generell konnte gezeigt werden, dass die RNAi-Technik eine geeignete Methode ist, um Zielgene für die Verbesserung der Eigenschaften einer Zelllinie zu identifizieren. Damit die Identifikation von geeigneten Genen schneller durchgeführt werden kann, sollten *screenings* mit einem höheren Durchsatz etabliert werden. Beispielsweise könnte dies durch ein Multititerplatten-Format mit vorgelegten siRNA-Sequenzen gegen unterschiedliche mRNAs und eine reverse Transfektion umgesetzt werden. Auf diese Weise könnten vielversprechende Gene schneller bearbeitet werden. Diese eher zufallsbasierte Herangehensweise kann und

sollte mit einer zielgerichteten Methode kombiniert werden. Aufgrund des unzureichenden *knockdowns* konnten die Ansätze des μ Arrays in dieser Arbeit nicht komplettiert werden. Weitere Studien müssen demnach zeigen, wie sinnvoll ein solches μ Array ist und wie das Experiment dazu aufgebaut sein muss, um die interessanten Transkripte identifizieren zu können.

Auch aus den erzeugten EPO- und DARBE-Zellpools sollten monoklonale Kulturen angelegt werden. Die Analytik der Glykostrukturen und der Isoformenverteilung macht erst dann Sinn, da so nicht geklärt werden kann, ob bestimmte Subpopulationen bevorzugt eine Isoform produzieren. Nach Etablierung der EPO- und DARBE-Zelllinien könnten diese dann z. B. mit den in dieser Arbeit evaluierten shRNAs transfiziert werden. Dadurch könnte zum einen eine generelle Nutzbarkeit der shRNA-Sequenzen in verschiedenen Zelllinien demonstriert werden, zum anderen könnten die Produktionseigenschaften der EPO- und DARBE-Zellen zusätzlich verbessert werden.

7 Literaturverzeichnis

- [Aasland *et al.* 1995] AASLAND, R ; GIBSON, T. J. ; STEWART, A. F.: The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. In: *Trends in Biochemical Sciences* **20(2)**, 56-59 (1995)
- [Adachi & Imai 2002] ADACHI, M. ; IMAI, K.: The proapoptotic BH3-only protein BAD transduces cell death signals independently of its interaction with Bcl-2. In: *Cell Death and Differentiation* **9(11)**, 1240–1247 (2002)
- [Adams & Cory 2001] ADAMS, J. M. ; CORY, S.: Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. In: *Trends in Biochemical Sciences* **26(1)**, 61–66 (2001)
- [Adams *et al.* 1996] ADAMS, L. ; SCOTT, G. K. ; WEINBERG, C. S.: Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. In: *Biochimica et Biophysica Acta* **1312**, 137–144 (1996)
- [Affymetrix 2012] AFFYMETRIX: *Change-ITTM Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit*. 2012
- [Agilent Technologies 2008] AGILENT TECHNOLOGIES: *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling), Version 5.7*. 2008
- [Al-Rubeai & Singh 1998] AL-RUBEAI, M. ; SINGH, R. P.: Apoptosis in cell culture. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* **9(2)**, 152–156 (1998)
- [Altschul *et al.* 1990] ALTSCHUL, S. F. ; GISH, W. ; MILLER, W. ; MYERS, E. W. ; LIPMAN, D. J.: Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology* **215(3)**, 403–410 (1990)
- [Ambion 2010] AMBION: http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html. Letzter Zugriff: November 2010 2010
- [Aravin *et al.* 2007] ARAVIN, A. A. ; HANNON, G. J. ; BRENNECKE, J.: The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. In: *Science* **318(5851)**, 761–764 (2007)
- [Arden & Betenbaugh 2006] ARDEN, N. ; BETENBAUGH, M. J.: Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. In: *Cytotechnology* **50**, 77–92 (2006)
- [Ariyoshi & Schwabe 2003] ARIYOSHI, M. ; SCHWABE, J. W.: A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. In: *Genes & Development* **17(15)**, 1909–1920 (2003)
- [Baker 2003] BAKER, S. J.: Small unstable apoptotic protein, an apoptosis-associated protein, suppresses proliferation of myeloid cells. In: *Cancer Research* **63(3)**, 705–712 (2003)
- [Bar-Nun *et al.* 1983] BAR-NUN, S. ; SHNEYOUR, Y. ; BECKMANN, J. S.: G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. In: *Biochim. Biophys. Acta* **741(1)**, 123–127 (1983)

- [Barondes *et al.* 1994] BARONDES, S. H. ; CASTRONOVO, V. ; COOPER, D. N. W. ; CUMMINGS, R. D. ; DRICKAMER, K. ; FELZI, T. ; GITT, M. A. ; HIRABAYASHI, J. ; HUGHES, C. ; KASAI, K.-I. ; LEFFLER, H. ; LIU, F.-T. ; LOTAN, R. ; MERCURIO, A. M. ; MONSIGNY, M. ; PILLAI, S. ; POIRER, F. ; RAZ, A. ; RIGBY, P. W. J. ; RINI, J. M. ; WANG, J. L.: Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins. In: *Cell* **76(4)**, 597–598 (1994)
- [Baulcombe 1999] BAULCOMBE, D.: Gene silencing: RNA makes RNA makes no protein. In: *Current Biology* **9**, R599–R601 (1999)
- [Becker *et al.* 2008] BECKER, E. ; FLORIN, L. ; PFIZENMAIER, K. ; KAUFMANN, H.: An XBP-1 dependent bottle-neck in production of IgG subtype antibodies in chemically defined serum-free Chinese hamster ovary (CHO) fed-batch processes. In: *Journal of Biotechnology* **135(2)**, 217–223 (2008)
- [Becker *et al.* 2010] BECKER, E. ; FLORIN, L. ; PFIZENMAIER, K. ; KAUFMANN, H.: Evaluation of a combinatorial cell engineering approach to overcome apoptotic effects in XBP-1(s) expressing cells. In: *Journal of Biotechnology* **146(4)**, 198–206 (2010)
- [Becker *et al.* 2011] BECKER, J. ; HACKL, M. ; RUPP, O. ; JAKOBI, T. ; SCHNEIDER, J. ; SZCZEPANOWSKI, R. ; BEKEL, T. ; BORTH, N. ; GOESMANN, A. ; GRILLARI, J. ; KALTSCHMIDT, C. ; NOLL, T. ; PÜHLER, A. ; TAUCH, A. ; BRINKROLF, K.: Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. In: *Journal of Biotechnology* **156(3)**, 227–235 (2011)
- [Beckmann 2012] BECKMANN, T. F.: *Differentielle Proteomanalyse tierischer Zellkulturen zur Charakterisierung von Hochproduzenten.*, Universität Bielefeld, Dissertation, 2012
- [Beckmann *et al.* 2012] BECKMANN, T. F. ; KRÄMER, O. ; KLAUSING, S. ; HEINRICH, C. ; THÜTE, T. ; BÜNTEMEYER, H. ; HOFFFROGGE, R. ; NOLL, T.: Effects of high passage cultivation on CHO cells: a global analysis. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **94(3)**, 659–671 (2012)
- [Bekel *et al.* 2009] BEKEL, T. ; HENCKEL, K. ; KÜSTER, H. ; MEYER, F. ; MITTARD RUNTE, V. ; NEUEWEGER, H. ; PAARMANN, D. ; RUPP, O. ; ZAKRZEWSKI, M. ; PÜHLER, A. ; STOYE, J. ; GOESMANN, A.: The Sequence Analysis and Management System - SAMS-2.0: data management and sequence analysis adapted to changing requirements from traditional sanger sequencing to ultrafast sequencing technologies. In: *Journal of Biotechnology* **140(1-2)**, 3–12 (2009)
- [Berger *et al.* 2004] BERGER, J. A. ; HAUTANIEMI, S. ; JÄRVINEN, A. K. ; EDGREN, H. ; MITRA, S. K. ; ASTOLA, J.: Optimized LOWESS normalization parameter selection for DNA microarray data. In: *BMC Bioinformatics* **5**, 194 (2004)
- [Bernstein *et al.* 2001] BERNSTEIN, E. ; CAUDY, A. A. ; HAMMOND, S. M. ; HANNON, G. J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. In: *Nature* **409(6818)**, 363–366 (2001)
- [Bertani 2004] BERTANI, G.: Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. In: *Journal of Bacteriology* **186(3)**, 595–600 (2004)
- [Bibikova *et al.* 2003] BIBIKOVA, M. ; BEUMER, K. ; TRAUTMAN, J. K. ; CARROLL, D.: Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. In: *Science* **300(5620)**, 764 (2003)

- [Bibikova *et al.* 2002] BIBIKOVA, M. ; GOLIC, M. ; GOLIC, K. G. ; CARROLL, D.: Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. In: *Genetics* **161**(3), 1169–1175 (2002)
- [Birnboim & Doly 1979] BIRNBOIM, H. C. ; DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Research* **7**(6), 1513–1523 (1979)
- [Bitinaite *et al.* 1998] BITINAITE, J. ; WAH, D. A. ; AGGARWAL, A. K. ; SCHILDKRAUT, I.: *FokI* dimerization is required for DNA cleavage. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(18), 10570–10575 (1998)
- [Büntemeyer 1988] BÜNTEMEYER, H.: *Entwicklung eines Perfusionsystems zur kontinuierlichen Kultivierung tierischer Zellen in Suspension.*, Hannover, Dissertation, 1988
- [Bork *et al.* 2007] BORK, K. ; REUTTER, W. ; WEIDEMANN, W. ; HORSTKORTE, R.: Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase containing a sialuria mutation in CHO cells. In: *FEBS Letters* **581**(22), 4195–4198 (2007)
- [Borth *et al.* 2005] BORTH, N. ; MATTANOVICH, D. ; KUNERT, R. ; H., H. K.: Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. In: *Biotechnology Progress* **21**(1), 106–111 (2005)
- [Brill *et al.* 1999] BRILL, A. ; TORCHINSKY, A. ; CARP, H. ; TODER, V.: The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. In: *J. Assist. Reprod. Genet.* **16**(10), 512–519 (1999)
- [Brummelkamp *et al.* 2002] BRUMMELKAMP, T. R. ; BERNARDS, R. ; AGAMI, R.: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. In: *Science* **296**, 550–553 (2002)
- [Burkhart *et al.* 2011] BURKHART, K. B. ; GUANG, S. ; BUCKLEY, B. A. ; WONG, L. ; BOCHNER, A. F. ; KENNEDY, S.: A pre-mRNA-associating factor links endogenous siRNAs to chromatin regulation. In: *PLoS genetics* **7**(8), e1002249 (2011)
- [Bushman 2003] BUSHMAN, F. D.: Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. In: *Cell* **115**, 135–138 (2003)
- [Butler 2005] BUTLER, M.: Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* (2005)
- [Camby *et al.* 2006] CAMBY, I. ; LE MERCIER, M. ; LEFRANC, F. ; KISS, R.: Galectin-1: a small protein with major functions. In: *Glycobiology* **16**(11), 137R–157R (2006)
- [Caplen *et al.* 2002] CAPLEN, N. J. ; ZHENG, Z. ; FALGOUT, B. ; MORGAN, Richard A.: Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference. In: *Molecular therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* **6**, 243–251 (2002)
- [Carlage *et al.* 2009] CARLAGE, T. ; HINCAPIE, M. ; ZANG, L. ; LYUBARSKAYA, Y. ; MADDEN, H. ; MHATRE, R. ; HANCOCK, W. S.: Proteomic profiling of a high-producing Chinese hamster ovary cell culture. In: *Analytical Chemistry* **81**(17), 7357–7362 (2009)
- [Caroll 2011] CAROLL, D.: Genome engineering with zinc-finger nucleases. In: *Genetics* **188**(4), 773–782 (2011)

- [Cathomen & Joung 2008] CATHOMEN, T. ; JOUNG, J. K.: Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. In: *Mol. Ther.* **16(7)**, 1200–1207 (2008)
- [Cervoni *et al.* 2002] CERVONI, N. ; DETICH, N. ; SEO, S. B. ; CHAKRAVARTI, D. ; SZYF, M.: The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. In: *Journal of Biological Chemistry* **277(28)**, 25026–25031 (2002)
- [Cervoni & Szyf 2001] CERVONI, N. ; SZYF, M.: Demethylase activity is directed by histone acetylation. In: *J. Biol. Chem.* **276(44)**, 40778–40787 (2001)
- [Chance & Frank 1993] CHANCE, R. E. ; FRANK, B. H.: Research, development, production, and safety of biosynthetic human insulin. In: *Diabetes Care* **16**, 133–142 (1993)
- [Chang *et al.* 2009] CHANG, C. I. ; YOO, J. W. ; HONG, S. W. ; LEE, S. E. ; KANG, H. S. ; SUN, X. ; ROGOFF, H. A. ; BAN, C. ; KIM, S. ; LI, C. J. ; LEE, D. K.: Asymmetric shorter-duplex siRNA structures trigger efficient gene silencing with reduced nonspecific effects. In: *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* **17(4)**, 725–732 (2009)
- [Charroux *et al.* 2000] CHARROUX, B. ; PELLIZZONI, L. ; PERKINSON, R. A. ; YONG, J. ; SHEVCHENKO, A. ; MANN, M. ; DREYFUSS, G.: Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. In: *The Journal of Cell Biology* **148(6)**, 1177–1186 (2000)
- [Cheetham *et al.* 1998] CHEETHAM, J. C. ; SMITH, D. M. ; AOKI, K. H. ; STEVENSON, J. L. ; R. S. SYED, T. J. H. abd ; EGRIE, J. ; HARVEY, T. S.: NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. In: *Nat Struct Biol.* **5(10)**, 861–866 (1998)
- [Chendrimada *et al.* 2005] CHENDRIMADA, T. P. ; GREGORY, R. I. ; KUMARASWAMY, E. ; NORMAN, J. ; COOCH, N. ; NISHIKURA, K. ; SHIEKHATTAR, R.: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. In: *Nature* **436(7051)**, 740–744 (2005)
- [Cho & Cummings 1995a] CHO, M. ; CUMMINGS, R. D.: Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. In: *The Journal of Biological Chemistry* **270(10)**, 5198–5206 (1995)
- [Cho & Cummings 1995b] CHO, M. ; CUMMINGS, R. D.: Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. In: *The Journal of Biological Chemistry* **270(10)**, 5207–5212 (1995)
- [Chomczynski & Sacchi 1987] CHOMCZYNSKI, P. ; SACCHI, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical Biochemistry* **162(1)**, 156–159 (1987)
- [Choudhuri 2009] CHOUDHURI, S.: Lesser known relatives of miRNA. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* **388(2)**, 177–180 (2009)
- [Choulika *et al.* 1995] CHOULIKA, A. ; PERRIN, A. ; DUJON, B. ; NICOLAS, J. F.: Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the *I-SceI* system of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and Cellular Biology* **15(4)**, 1968–1973 (1995)
- [Ciuffi 2008] CIUFFI, A.: Mechanisms Governing Lentivirus Integration Site Selection. In: *Current Gene Therapy* **8**, 419–429 (2008)

- [Ciuffi & Barr 2011] CIUFFI, A. ; BARR, S. D.: Identification of HIV integration sites in infected host genomic DNA. In: *Methods* **53**, 39–46 (2011)
- [Clemens 1997] CLEMENS, M. J.: PKR – a protein kinase regulated by double-stranded RNA. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **29(7)**, 945–949 (1997)
- [Clontech 2010] CLONTECH: *pLVX-shRNA1 Vector Information, PT4051-5, Juli 2010*. 2010
- [Clontech 2012a] CLONTECH: <http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/oligoDesigner.do>. Letzter Zugriff: Januar 2012. 2012
- [Clontech 2012b] CLONTECH: <http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/sirnaSequenceDesignInit.do>. Letzter Zugriff: Januar 2012. 2012
- [Clontech 2012c] CLONTECH: *Lenti-XTM Lentiviral Expression Systems User Manual, Version: 071612*. 2012
- [Cogoni & Macino 2000] COGONI, C. ; MACINO, G.: Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. In: *Current Opinion in Genetics & Development* **10**, 638–643 (2000)
- [Cooper & Barondes 1999] COOPER, D. N. ; BARONDES, S. H.: God must love galectins; he made so many of them. In: *Glycobiology* **9(10)**, 979–984 (1999)
- [Cormack *et al.* 1996] CORMACK, B. P. ; VALDIVIA, R. H. ; FALKOW, S.: FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). In: *Gene* **173(1)**, 33–38 (1996)
- [Cost *et al.* 2010] COST, G. J. ; FREYVERT, Y. ; VAFIADIS, A. ; SANTIAGO, Y. ; MILLER, J. C. ; REBAR, E. ; COLLINGWOOD, T. N. ; SNOWDEN, A. ; GREGORY, P. D.: BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. In: *Biotechnology and Bioengineering* **105(2)**, 330–340 (2010)
- [Dalmay *et al.* 2000] DALMAY, T. ; HAMILTON, A. ; RUDD, S. ; ANGELL, S. ; BAULCOMBE, D. C.: An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. In: *Cell* **101**, 343–353 (2000)
- [Dande *et al.* 2006] DANDE, P. ; PRAKASH, T. P. ; SIOUFI, N. ; GAUS, H. ; JARRES, R. ; BERDEJA, A. ; SWAYZE, E. E. ; GRIFFEY, R. H. ; BHAT, B.: Improving RNA interference in mammalian cells by 4'-thio-modified small interfering RNA (siRNA): effect on siRNA activity and nuclease stability when used in combination with 2'-O-alkyl modifications. In: *J Med Chem.* **49(5)**, 1624–1634 (2006)
- [Davis *et al.* 2004] DAVIS, H. E. ; ROSINSKI, M. ; MORGAN, J. R. ; YARMUSH, M. L.: Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. In: *Biophysical Journal* **86(2)**, 1234–1242 (2004)
- [Day *et al.* 2008] DAY, C. L. ; SMITS, C. ; FAN, F. C. ; LEE, E. F. ; FAIRLIE, W. D. ; HINDS, M. G.: Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. In: *Journal of Molecular Biology* **380(5)**, 958–871 (2008)
- [Desfarges & Ciuffi 2010] DESFARGES, S. ; CIUFFI, A.: Retroviral Integration Site Selection. In: *Viruses* **2**, 111–130 (2010)

- [Dewey *et al.* 1995] DEWEY, W. C. ; LING, C. C. ; MEYN, R. E.: Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **33**(4), 781–796 (1995)
- [Distler *et al.* 2005] DISTLER, J. H. ; JÜNGEL, A. ; KUROWSKA-STOLARSKA, M. ; MICHEL, B. A. ; GAY, R. E. ; GAY, S. ; DISTLER, O.: Nucleofection: a new, highly efficient transfection method for primary human keratinocytes. In: *Experimental Dermatology* **14**, 315–320 (2005)
- [Dondrup *et al.* 2003] DONDRUP, M. ; GOESMANN, A. ; BARTELS, D. ; KALINOWSKI, J. ; KRAUSE, L. ; LINKE, B. ; RUPP, O. ; SCZYRBA, A. ; PÜHLER, A. ; MEYER, F.: EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. In: *Journal of Biotechnology* **106**(2-3), 135–146 (2003)
- [Dudoit *et al.* 2002] DUDOIT, S. ; YANG, Y. H. ; CALLOW, M. J. ; SPEED, T. P.: Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. In: *Statistica Sinica* **12**, 111–139 (2002)
- [Durai *et al.* 2005] DURAI, S. ; MANI, M. ; KANDAVELOU, K. ; WU, J. ; PORTEUS, M. H. ; CHANDRASEGARAN, S.: Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. In: *Nucleic Acids Research* **33**(18), 5978–5990 (2005)
- [Eberhardter & Becker 2002] EBERHARTER, A. ; BECKER, P. B.: Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. In: *EMBO reports* **3**(3), 224–229 (2002)
- [Egrie & Browne 2001] EGRIE, J. C. ; BROWNE, J. K.: Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). In: *British Journal of Cancer* **84**, 3–10 (2001)
- [Egrie & Browne 2002] EGRIE, J. C. ; BROWNE, J. K.: Development and characterization of darbepoetin alfa. In: *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **16**(10 Suppl 11), 13–22 (2002)
- [Elbashir *et al.* 2001a] ELBASHIR, S. M. ; HARBORTH, J. ; LENDECKEL, W. ; YALCIN, A. ; WEBER, K. ; TUSCHL, T.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. In: *Nature* **411**, 494–8 (2001)
- [Elbashir *et al.* 2001b] ELBASHIR, S. M. ; LENDECKEL, W. ; TUSCHL, T.: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. In: *Genes & Development* **15**, 188–200 (2001)
- [Elbashir *et al.* 2001c] ELBASHIR, S. M. ; MARTINEZ, J. ; PATKANIOWSKA, A. ; LENDECKEL, W. ; TUSCHL, T.: Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. In: *EMBO J.* **20**(23), 6877–6888 (2001)
- [Elmore 2007] ELMORE, S.: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. In: *Toxicologic Pathology* **35**, 495–516 (2007)
- [Engels 2012] ENGELS, J. W.: Gene silencing by chemically modified siRNAs. In: *New Biotechnology* [Epub ahead of print] (2012)
- [Epinat *et al.* 2003] EPINAT, J. C. ; ARNOULD, S. ; CHAMES, P. ; ROCHAIX, P. ; DESFONTAINES, D. ; PUZIN, C. ; PATIN, A. ; ZANGHELLINI, A. ; PÂQUES, F. ; LACROIX, E.: A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. In: *Nucleic Acids Res.* **31**(11), 2952–2962 (2003)

- [Eulalio *et al.* 2007] EULALIO, A. ; BEHM-ANSMANT, I. ; IZAURRALDE, E.: P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **8**(3), 9–22 (2007)
- [Ewing *et al.* 1998] EWING, B. ; HILLIER, L. ; WENDL, M. C. ; GREEN, P.: Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. In: *Genome Research* **8**(3), 175–185 (1998)
- [Fan *et al.* 2012] FAN, L. ; KADURA, I. ; KREBS, L. E. ; HATFIELD, C. C. ; SHAW, M. M. ; FRYE, C. C.: Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. In: *Biotechnology and Bioengineering* **109**(4), 1007–1015 (2012)
- [Fan *et al.* 2005] FAN, T. J. ; HAN, L. H. ; CONG, R. S. ; LIANG, J.: Caspase family proteases and apoptosis. In: *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **37**(11), 719–727 (2005)
- [Fermentas 2011a] FERMENTAS: *DNase I, RNase-free, Product Information, #EN0521*. 2011
- [Fermentas 2011b] FERMENTAS: *FastAPTM Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Rev.6*. 2011
- [Fermentas 2011c] FERMENTAS: *GeneJETTM Genomic DNA Purification Kit, Rev. 6*. 2011
- [Fermentas 2011d] FERMENTAS: *GeneJETTM PCR Purification Kit*. 2011
- [Fermentas 2011e] FERMENTAS: *GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit*. 2011
- [Fermentas 2011f] FERMENTAS: *RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, Rev. 9*. 2011
- [Fermentas 2012] FERMENTAS: *GeneJETTM Gel Extraction Kit, Rev. 6*. 2012
- [Figueroa *et al.* 2007] FIGUEROA, B. Jr ; AILOR, E. ; OSBORNE, D. ; HARDWICK, J. M. ; REFF, M. ; BETENBAUGH, M. J.: Enhanced cell culture performance using inducible anti-apoptotic genes E1B-19K and Aven in the production of a monoclonal antibody with Chinese hamster ovary cells. In: *Biotechnology and Bioengineering* **97**(4), 877–892 (2007)
- [Filipowicz *et al.* 2008] FILIPOWICZ, W. ; BHATTACHARYYA, S. N. ; SONENBERG, M.: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? In: *Nature Reviews. Genetics* **9**, 102–114 (2008)
- [Fire *et al.* 1998] FIRE, A. ; XU, A. ; MONTGOMERY, M. K. ; KOSTAS, S. A. ; DRIVER, S. E. ; MELLO, C. C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* **391**, 806–811 (1998)
- [Fischer *et al.* 2005] FISCHER, C. ; SANCHEZ-RUDERISCH, H. ; WELZEL, M. ; WIEDENMANN, B. ; SAKAI, T. ; ANDRÉ, S. ; GABIUS, H. J. ; KHACHIGIAN, L. ; DETJEN, K. M. ; ROSEWICZ, S.: Galectin-1 interacts with the $\alpha 5\beta 1$ fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. In: *J. Biol. Chem.* **280**(44), 37266–37277 (2005)
- [Fischer *et al.* 2001] FISCHER, U. ; STRUSS, A. K. ; HEMMER, D. ; MICHEL, A. ; HENN, W. ; STEUDEL, W. I. ; MEESE, E.: PHF3 expression is frequently reduced in glioma. In: *Cytogenetics and Cell Genetics* **94**(3-4), 131–136 (2001)
- [Fisher 2003] FISHER, J. W.: Erythropoietin: physiology and pharmacology update. In: *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **228**(1), 1–14 (2003)

- [Flint *et al.* 2009] FLINT, S. J. ; ENQUIST, L. W. ; RACANIELLO, V. R. ; SKALKA, A. M.: *Principles of Virology*. 3rd Edition. Wiley John + Sons, Washington DC, 2009
- [Fukushige & Sauer 1992] FUKUSHIGE, S. ; SAUER, B.: Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**(17), 7905–7909 (1992)
- [Fussenegger *et al.* 1997] FUSSENEGGER, M. ; MAZUR, X. ; BAILEY, J. E.: A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. In: *Biotechnology and Bioengineering* **55**(6), 927–939 (1997)
- [García *et al.* 2006] GARCÍA, M. A. ; GIL, J. ; VENTOSO, I. ; GUERRA, S. ; DOMINGO, E. ; RIVAS, C. ; ESTEBAN, M.: Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. In: *Microbiology and molecular biology reviews* **70**(4), 1032–1060 (2006)
- [Golden *et al.* 2008] GOLDEN, D. E. ; GERBASI, V. R. ; SONTHEIMER, E. J.: An inside job for siRNAs. In: *Molecular Cell* **31**(3), 309–312 (2008)
- [Goodarzi *et al.* 1990] GOODARZI, G. ; GROSS, S. C. ; TEWARI, A. ; WATABE, K.: Antisense oligodeoxyribonucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus surface antigen. In: *Journal of General Virology* **71**, 3021–3025 (1990)
- [Goswami *et al.* 1999] GOSWAMI, J. ; SINSKEY, A. J. ; STELLER, H. ; STEPHANOPOULOS, G. N. ; WANG, D. I.: Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. In: *Biotechnology and Bioengineering* **62**(6), 632–640 (1999)
- [Graham *et al.* 1977] GRAHAM, F. L. ; SMILEY, J. ; RUSSELL, W. C. ; NAIRN, R.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. In: *The Journal of General Virology*. **36**, 59–74 (1977)
- [Green & Sambrook 2012] GREEN, M. R. ; SAMBROOK, J.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Fourth Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 2012
- [Gregory *et al.* 2005] GREGORY, R. I. ; CHENDRIMADA, T. P. ; COOCH, N. ; SHIEKHATTAR, R.: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. In: *Cell* **123**(4), 631–640 (2005)
- [Gresch & Altrogge 2012] GRESCH, O. ; ALTROGGE, L.: Transfection of difficult-to-transfect primary mammalian cells. In: *Methods Mol. Biol.* **801**, 65–64 (2012)
- [Grewal & Rice 2004] GREWAL, S. I. ; RICE, J. C.: Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. In: *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 230–238 (2004)
- [Grishok *et al.* 2000] GRISHOK, A. ; TABARA, H. ; MELLO, C. C.: Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. In: *Science* **287**, 2494–2497 (2000)
- [Guo & Kempthues 1995] GUO, S. ; KEMPHUES, K. J.: par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. In: *Cell* **81**(4), 611–620 (1995)
- [Hammond *et al.* 2000] HAMMOND, S. M. ; BERNSTEIN, E. ; BEACH, D. ; HANNON, G. J.: An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. In: *Nature* **404**, 293–296 (2000)

- [Han *et al.* 2011] HAN, Y. K. ; HA, T. K. ; LEE, S. J. ; LEE, J. S. ; LEE, G. M.: Autophagy and apoptosis of recombinant Chinese hamster ovary cells during fed-batch culture: effect of nutrient supplementation. In: *Biotechnology and Bioengineering* **108(9)**, 2182–2192 (2011)
- [Hare & Palumbi 2003] HARE, M. P. ; PALUMBI, S. R.: High intron sequence conservation across three mammalian orders suggests functional constraints. In: *Molecular Biology and Evolution* **20(6)**, 969–978 (2003)
- [Harrison *et al.* 1977] HARRISON, T. ; GRAHAM, F. ; WILLIAMS, J.: Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. In: *Virology* **77**, 319–329 (1977)
- [Hayes *et al.* 2010] HAYES, N. V. ; SMALES, C. M. ; KLAPPA, P.: Protein disulfide isomerase does not control recombinant IgG4 productivity in mammalian cell lines. In: *Biotechnology and Bioengineering* **105(4)**, 770–779 (2010)
- [Higashikawa & Chang 2001] HIGASHIKAWA, F. ; CHANG, L.: Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. In: *Virology* **280(1)**, 124–131 (2001)
- [Hirai & Wang 2001] HIRAI, I. ; WANG, H. G.: Survival-factor-induced phosphorylation of Bad results in its dissociation from Bcl-x(L) but not Bcl-2. In: *The Biochemical Journal* **359(Pt 2)**, 345–352 (2001)
- [Hosono *et al.* 2004] HOSONO, K. ; SASAKI, T. ; MINOSHIMA, S. ; SHIMIZU, N.: Identification and characterization of a novel gene family YPEL in a wide spectrum of eukaryotic species. In: *Gene* **340(1)**, 31–43 (2004)
- [Hsei *et al.* 2004] HSEI, V. ; KOUMENIS, I. ; LEONG, S. ; PRESTA, L. ; SHAHROKH, Z. ; ZAPATA, G.: Methods of treating inflammatory diseases with anti-IL-8 antibody fragment-polymer conjugates. In: *US Patent: 6468532* (2004)
- [Hughes 1999] HUGHES, R. C.: Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. In: *Biochimica et Biophysica Acta* **1473**, 172–185 (1999)
- [Humphrey *et al.* 1996] HUMPHREY, W. ; DALKE, A. ; SCHULTEN, K.: VMD: visual molecular dynamics. In: *J Mol Graph.* **14(1)**, 33–38 (1996)
- [Hwang & Lee 2008] HWANG, S. O. ; LEE, G. M.: Nutrient deprivation induces autophagy as well as apoptosis in Chinese hamster ovary cell culture. In: *Biotechnology and Bioengineering* **99(3)**, 678–685 (2008)
- [Imai-Nishiya *et al.* 2007] IMAI-NISHIYA, H. ; MORI, K. ; INOUE, M. ; WAKITANI, M. ; IIDA, S. ; SHITARA, K. ; SATOH, M.: Double knockdown of α 1,6-fucosyltransferase (FUT8) and GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) in antibody-producing cells: a new strategy for generating fully non-fucosylated therapeutic antibodies with enhanced ADCC. In: *BMC Biotechnology* **7**, 84 (2007)
- [Ingelbrecht *et al.* 1994] INGELBRECHT, I. ; VAN HOUDT, H. ; VAN MONTAGU, M. ; DEPICKER, A.: Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10502–10506 (1994)
- [Iversen *et al.* 2005] IVERSEN, N. ; BIRKENES, B. ; TORSDALEN, K. ; DJUROVIC, S.: Electroporation by nucleofector is the best nonviral transfection technique in human endothelial and smooth muscle cells. In: *Genet Vaccines Ther* **3(1)**, 2 (2005)

- [Iwaki & Umemura 2011] IWAKI, T. ; UMEMURA, K.: A single plasmid transfection that offers a significant advantage associated with puromycin selection, fluorescence-assisted cell sorting, and doxycycline-inducible protein expression in mammalian cells. In: *Cytotechnology* **63(4)**, 337–343 (2011)
- [Jacobs *et al.* 1985] JACOBS, K. ; SHOEMAKER, C. ; RUDERSDORF, R. ; NEILL, S. D. ; KAUFMAN, R. J. ; MUFSON, A. ; SEEHRA, J. ; JONES, S. S. ; HEWICK, R. ; FRITSCH, E. F. ; KAWAKITA, M. ; SHIMIZU, T. ; MIYAKE, T.: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. In: *Nature* **313**, 806–810 (1985)
- [Jayapal *et al.* 2007] JAYAPAL, K. P. ; WLASCHIN, K. F. ; HU, W.-S. ; YAP, M. G. S.: Recombinant Protein Therapeutics from Cho Cells - 20 Years and Counting. In: *CHO Consortium: SBE Special Edition* 40-47 (2007)
- [Jeon & Lee 2007] JEON, M. K. ; LEE, G. M.: Correlation between enhancing effect of sodium butyrate on specific productivity and mRNA transcription level in recombinant Chinese hamster ovary cells producing antibody. In: *J. Microbiol. Biotechnol.* **17(6)**, 1036–1040 (2007)
- [Johnson *et al.* 2011] JOHNSON, K. C. ; JACOB, N. M. ; NISSOM, P. M. ; HACKL, M. ; LEE, L. H. ; YAP, M. ; HU, W. S.: Conserved microRNAs in Chinese hamster ovary cell lines. In: *Biotechnology and Bioengineering* **108(2)**, 475–480 (2011)
- [Jorgensen 1990] JORGENSEN, R.: Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. In: *Trends in Biotechnology* **8**, 340–344 (1990)
- [Joung *et al.* 2010] JOUNG, J. K. ; VOYTAS, D. F. ; CATHOMEN, T.: Reply to „Successful genome editing with modularly assembled zinc finger nucleases“. In: *Nature Methods* **7(1)**, 91–92 (2010)
- [Kanda *et al.* 2007] KANDA, Y. ; IMAI-NISHIYA, H. ; KUNI-KAMOCHI, R. ; MORI, K. ; INOUE, M. ; KITAJIMA-MIYAMA, K. ; OKAZAKI, A. ; IIDA, S. ; SHITARA, K. ; SATOH, M.: Establishment of a GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) knockout host cell line: a new strategy for generating completely non-fucosylated recombinant therapeutics. In: *J Biotechnol.* **130(3)**, 300–310 (2007)
- [Kandavelou *et al.* 2005] KANDAVELOU, K. ; MANI, M. ; DURAI, S. ; CHANDRASEGARAN, S.: „Magic“ scissors for genome surgery. In: *Nature Biotechnology* **23(6)**, 686–687 (2005)
- [Kantardjieff *et al.* 2010] KANTARDJIEFF, A. ; JACOB, N. M. ; YEE, J. C. ; EPSTEIN, E. ; KOK, Y. J. ; PHILP, R. ; BETENBAUGH, M. ; HU, W. S.: Transcriptome and proteome analysis of Chinese hamster ovary cells under low temperature and butyrate treatment. In: *J Biotechnol.* **145(2)**, 143–159 (2010)
- [Kao *et al.* 1969] KAO, F. T. ; JOHNSON, R. T. ; PUCK, T. T.: Complementation analysis on virus-fused Chinese hamster cells with nutritional markers. In: *Science* **164(3877)**, 312–314 (1969)
- [Kao & Puck 1967] KAO, F. T. ; PUCK, T. T.: Genetics of somatic mammalian cells. IV. Properties of Chinese hamster cell mutants with respect to the requirement for proline. In: *Genetics* **55(3)**, 513–524 (1967)
- [Kao & Puck 1968] KAO, F. T. ; PUCK, T. T.: Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **60(4)**, 1275–1281 (1968)

- [Kawasaki & Taira 2003] KAWASAKI, H. ; TAIRA, K.: Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. In: *Nucleic Acids Research* **31(2)**, 700–707 (2003)
- [Kelley *et al.* 2010] KELLEY, K. D. ; MILLER, K. R. ; TODD, A. ; KELLEY, A. R. ; TUTTLE, R. ; BERBERICH, S. J.: YPEL3, a p53-regulated gene that induces cellular senescence. In: *Cancer Research* **70(9)**, 3566–3575 (2010)
- [Kelley & Sternberg 2009] KELLEY, L. A. ; STERNBERG, M. J.: Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. In: *Nat Protoc.* **4(3)**, 363–371 (2009)
- [Kim *et al.* 2012] KIM, J. Y. ; KIM, Y.-G. ; LEE, G. M.: CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **93(3)**, 917–930 (2012)
- [Kim & Kim 2011] KIM, S. ; KIM, J. S.: Targeted genome engineering via zinc finger nucleases. In: *Plant Biotechnology Reports* **5(1)**, 9–17 (2011)
- [Kim & Lee 2007] KIM, S. H. ; LEE, G. M.: Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **74(1)**, 152–159 (2007)
- [Kim *et al.* 1996] KIM, Y. G. ; CHA, J. ; CHANDRASEGARAN, S.: Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93(3)**, 1156–1160 (1996)
- [Kim & Chandrasegaran 1994] KIM, Y. G. ; CHANDRASEGARAN, S.: Chimeric restriction endonuclease. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91(3)**, 883–887 (1994)
- [Klausing *et al.* 2011] KLAUSING, S. ; KRÄMER, O. ; NOLL, T.: Bioreactor cultivation of CHO DP-12 cells under sodium butyrate treatment - comparative transcriptome analysis with CHO cDNA microarrays. In: *BioMed Central proceedings* **5**, 8:P98 (2011)
- [Kreiss *et al.* 1999] KREISS, P. ; CAMERON, B. ; RANGARA, R. ; MAILHE, P. ; AGUERRE-CHARRIOL, O. ; AIRIAU, M. ; SCHERMAN, D. ; CROUZET, J. ; PITARD, B.: Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. In: *Nucleic Acids Research* **27(19)**, 3792–3798 (1999)
- [Krejci *et al.* 2012] KREJCI, L. ; ALTMANNOVA, V. ; SPIREK, M. ; ZHAO, X.: Homologous recombination and its regulation. In: *Nucleic Acids Research* **40(13)**, 5795–5818 (2012)
- [Krämer *et al.* 2010] KRÄMER, O. ; KLAUSING, S. ; NOLL, T.: Methods in mammalian cell line engineering: from random mutagenesis to sequence-specific approaches. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **88(2)**, 425–436 (2010)
- [Küster *et al.* 2007] KÜSTER, H. ; BECKER, A. ; FIRNHABER, C. ; HOHNJEC, N. ; MANTHEY, K. ; PERLICK, A. M. ; BEKEL, T. ; DONDRUP, M. ; HENCKEL, K. ; GOESMANN, A. ; MEYER, F. ; WIPF, D. ; REQUENA, N. ; HILDEBRANDT, U. ; HAMPP, R. ; NEHLS, U. ; KRAJINSKI, F. ; FRANKEN, P. ; PÜHLER, A.: Development of bioinformatic tools to support EST-sequencing, in silico- and microarray-based transcriptome profiling in mycorrhizal symbioses. In: *Phytochemistry* **68(1)**, 19–32 (2007)

- [Ku *et al.* 2007] KU, S. C. ; NG, D. T. ; YAP, M. G. ; CHAO, S. H.: Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells. In: *Biotechnology and Bioengineering* **99(1)**, 155–164 (2007)
- [Kustikova *et al.* 2003] KUSTIKOVA, O. S. ; WAHLERS, A. ; KUHLCHE, K. ; STAHL, B. ; ZANDER, A. R. ; BAUM, C. ; FEHSE, B.: Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. In: *Blood* **102(12)**, 3934–3937 (2003)
- [Lai *et al.* 1986] LAI, P. H. ; EVERETT, R. ; WANG, F. F. ; ARAKAWA, T. ; GOLDWASSER, E.: Structural characterization of human erythropoietin. In: *The Journal of Biological Chemistry* **261(7)**, 3116–3121 (1986)
- [Lao & Toth 1997] LAO, M. S. ; TOTH, D.: Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. In: *Biotechnol Prog.* **13(5)**, 688–691 (1997)
- [Larkin *et al.* 2007] LARKIN, M. A. ; BLACKSHIELDS, G. ; BROWN, N. P. ; CHENNA, R. ; MCGETTIGAN, P. A. ; MCWILLIAM, H. ; VALENTIN, F. ; WALLACE, I. M. ; WILM, A. ; LOPEZ, R. ; THOMPSON, J. D. ; GIBSON, T. J. ; HIGGINS, D. G.: Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics* **23(21)**, 2947–2948 (2007)
- [Latt 1981] LATT, S. A.: Sister chromatid exchange formation. In: *Annual Review of Genetics* **15**, 11–55 (1981)
- [Lee *et al.* 2012] LEE, J. S. ; HA, T. K. ; LEE, S. J. ; LEE, G. M.: Current state and perspectives on erythropoietin production. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **95(6)**, 1405–1416 (2012)
- [Lee & Lee 2012a] LEE, J. S. ; LEE, G. M.: Effect of sodium butyrate on autophagy and apoptosis in Chinese hamster ovary cells. In: *Biotechnol Prog.* **28(2)**, 349–357 (2012)
- [Lee & Lee 2012b] LEE, J. S. ; LEE, G. M.: Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry. In: *Methods* **56**, 375–382 (2012)
- [Lee *et al.* 2003] LEE, Y. ; AHN, C. ; HAN, J. ; CHOI, H. ; KIM, J. ; YIM, J. ; LEE, J. ; PROVOST, P. ; RÅDMARK, O. ; KIM, S. ; KIM, V. N.: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. In: *Nature* **425(6956)**, 415–419 (2003)
- [Lee *et al.* 2004] LEE, Y. ; KIM, M. ; HAN, J. ; YEOM, K.-H. ; LEE, S. ; BAEK, S. H. ; KIM, V. N.: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *Embo* **23(20)**, 4051–4060 (2004)
- [Leung *et al.* 2011] LEUNG, J. W. ; LEITCH, A. ; WOOD, J. L. ; SHAW-SMITH, C. ; METCALFE, K. ; BICKNELL, L. S. ; JACKSON, A. P. ; CHEN, J.: SET nuclear oncogene associates with microcephalin/MCPH1 and regulates chromosome condensation. In: *J. Biol. Chem.* **286(24)**, 21393–21400 (2011)
- [Li *et al.* 1992] LI, L. ; WU, L. P. ; CHANDRASEGARAN, S.: Functional domains in *FokI* restriction endonuclease. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89(10)**, 4275–4279 (1992)
- [Liang *et al.* 2004] LIANG, C. ; RIEDER, E. ; HAHM, B. ; JANG, S. K. ; PAUL, A. ; WIMMER, E.: Replication of a novel subgenomic HCV genotype 1a replicon expressing a puromycin resistance gene in Huh-7 cells. In: *Virology* **333(1)**, 41–53 (2004)

- [Liang *et al.* 1998] LIANG, F. ; HAN, M. ; ROMANIENKO, P. J. ; JASIN, M.: Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95(9)**, 5172–5177 (1998)
- [Liao *et al.* 1994] LIAO, D. I. ; KAPADIA, G. ; AHMED, H. ; VASTA, G. R. ; HERZBERG, O.: Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91(4)**, 1428–1432 (1994)
- [Life Technologies 2010a] LIFE TECHNOLOGIES: *pcDNATM 3.1(+)*, User manual, Version K, November 2010. 2010
- [Life Technologies 2010b] LIFE TECHNOLOGIES: *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG Kit*, Rev: 01.06.2010. 2010
- [Lim 1986] LIM, C. K.: *HPLC of Small Molecules - A Practical Approach*. Oxford University Press, 1986
- [Lim *et al.* 2006] LIM, S. F. ; CHUAN, K. H. ; LIU, S. ; LOH, S. O. ; CHUNG, B. Y. ; ONG, C. C. ; SONG, Z.: RNAi suppression of Bax and Bak enhances viability in fed-batch cultures of CHO cells. In: *Metabolic Engineering* **8**, 509–522 (2006)
- [Lim *et al.* 2010] LIM, Y. ; MANTALARIS, A. ; YAP, M. G. ; WONG, D. C.: Simultaneous targeting of Reiquem & Alg-2 in Chinese hamster ovary cells for improved recombinant protein production. In: *Mol Biotechnol.* **46(3)**, 301–307 (2010)
- [Lin *et al.* 1985] LIN, F. K. ; SUGGS, S. ; LIN, C. H. ; BROWNE, J. K. ; SMALLING, R. ; EGRIE, J. C. ; CHEN, K. K. ; FOX, G. M. ; MARTIN, F. ; STABINSKY, Z.: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. In: *PNAS* **82(22)**, 7580–7584 (1985)
- [Liu *et al.* 2010] LIU, P. Q. ; CHAN, E. M. ; COST, G. J. ; ZHANG, L. ; WANG, J. ; MILLER, J. C. ; GUSCHIN, D. Y. ; REIK, A. ; HOLMES, M. C. ; MOTT, J. E. ; COLLINGWOOD, T. N. ; GREGORY, P. D.: Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases. In: *Biotechnology and Bioengineering* **106(1)**, 97–105 (2010)
- [Liu *et al.* 2012] LIU, Z. ; ZHANG, Q. ; PENG, H. ; ZHANG, W. Z.: Animal Lectins: Potential Antitumor Therapeutic Targets in Apoptosis. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* **Epub ahead of print** (2012)
- [Lois *et al.* 2002] LOIS, C. ; HONG, E. J. ; PEASE, S. ; BROWN, E. J. ; BALTIMORE, D.: Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. In: *Science* **295(5556)**, 868–872 (2002)
- [Lomonosova & Chinnadurai 2008] LOMONOSOVA, E. ; CHINNADURAI, G.: BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. In: *Oncogene* **27**, 2–19 (2008)
- [Lonza 2009a] LONZA: *Amaza[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit R - for HeLa cells [ATCC[®] CCL-2TM]*. Letzter Zugriff: September 2012. 2009
- [Lonza 2009b] LONZA: *Amaza[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V - for suspension CHO clones*. Letzter Zugriff: September 2012. 2009

- [López-Lucendo *et al.* 2004] LÓPEZ-LUCENDO, M. F. ; SOLÍS, D. ; ANDRÉ, S. ; HIRABAYASHI, J. ; KASAI, K. ; KALTNER, H. ; GABIUS, H. J. ; ROMERO, A.: Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. In: *J Mol Biol.* **343(4)**, 957–970 (2004)
- [Lucas *et al.* 1996] LUCAS, B. K. ; GIERE, L. M. ; DEMARCO, R. A. ; SHEN, A. ; CHISHOLM, V. ; CROWLEY, C. W.: High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. In: *Nucleic Acids Research* **24(9)**, 1774-1779 (1996)
- [Luger *et al.* 1997] LUGER, K. ; MÄDER, A. W. ; RICHMOND, R. K. ; SARGENT, D. F. ; RICHMOND, T. J.: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. In: *Nature* **389(6648)**, 251–260 (1997)
- [Macherey-Nagel 2011] MACHEREY-NAGEL: *Total RNA Isolation NucleSpin® RNA II User manual, Rev. 13.* 2011
- [MacRae *et al.* 2008] MACRAE, I. J. ; MA, E. ; ZHOU, M. ; ROBINSON, C. V. ; DOUDNA, J. A.: In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105(2)**, 512–517 (2008)
- [Malphettes *et al.* 2010] MALPHETTES, L. ; FREYVERT, Y. ; CHANG, J. ; LIU, P. Q. ; CHAN, E. ; MILLER, J. C. ; ZHOU, Z. ; NGUYEN, T. ; TSAI, C. ; SNOWDEN, A. W. ; COLLINGWOOD, T. N. ; GREGORY, P. D. ; COST, G. J.: Highly efficient deletion of FUT8 in CHO cell lines using zinc-finger nucleases yields cells that produce completely nonfucosylated antibodies. In: *Biotechnology and Bioengineering* **106(5)**, 774–783 (2010)
- [Maniataki & Mourelatos 2005] MANIATAKI, E. ; MOURELATOS, Z.: A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. In: *Genes & Development* **19(24)**, 2979–2990 (2005)
- [Mao *et al.* 2008] MAO, Z. ; BOZZELLA, M. ; SELUANOV, A. ; GORBUNOVA, V.: Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. In: *DNA Repair* **7(10)**, 1765–1771 (2008)
- [Mariati *et al.* 2010] MARIATI ; NG, Y. K. ; CHAO, S. H. ; YAP, M. G. ; YANG, Y.: Evaluating regulatory elements of human cytomegalovirus major immediate early gene for enhancing transgene expression levels in CHO K1 and HEK293 cells. In: *Journal of Biotechnology* **147(3-4)**, 160–163 (2010)
- [Martin *et al.* 2012] MARTIN, S. J. ; HENRY, C. M. ; CULLEN, S.P.: A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. In: *Molecular Cell* **46(4)**, 387–397 (2012)
- [Maslyar *et al.* 2001] MASLYAR, D. J. ; AOKI, M. ; VOGT, P. K.: The growth-promoting activity of the Bad protein in chicken embryo fibroblasts requires binding to protein 14-3-3. In: *Oncogene* **20(37)**, 5087–5092 (2001)
- [Matasci *et al.* 2008] MATASCI, M. ; HACKER, D. L. ; BALDI, L. ; WURM, F. M.: Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects. In: *Drug Discovery Today: Technologies* **5(2-3)**, e37–e42 (2008)
- [Matzke & Matzke 2004] MATZKE, M. ; MATZKE, A. J. M.: Planting the seeds of a new paradigm. In: *PLoS Biology* **2**, E133 (2004)

- [Maucksch *et al.* 2009] MAUCKSCH, C. ; BOHLA, A. ; HOFFMANN, F. ; SCHLEEF, M. ; ANEJA, M. K. ; ELFINGER, M. ; HARTL, D. ; RUDOLPH, C.: Transgene expression of transfected supercoiled plasmid DNA concatemers in mammalian cells. In: *J Gene Med.* **11**(5), 444–453 (2009)
- [MGI 2011] MGI: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>. September 2011
- [Mhawech 2005] MHAWECH, P.: 14-3-3 proteins—an update. In: *Cell Research* **15**(4), 228–236 (2005)
- [Micka *et al.* 2000] MICKA, B. ; TROJANECK, B. ; NIEMITZ, S. ; LEFTEROVA, P. ; KRUPIS, S. ; HUHN, D. ; WITTIG, B. ; SCHADENDORF, D. ; SCHMIDT-WOLF, I. G.: Comparison of non-viral transfection methods in melanoma cell primary cultures. In: *Cytokine* **12**(6), 828–833 (2000)
- [Miller *et al.* 2007] MILLER, J. C. ; HOLMES, M. C. ; WANG, J. ; GUSCHIN, D. Y. ; LEE, Y. L. ; RUPNIEWSKI, I. ; BEAUSEJOUR, C. M. ; WAITE, A. J. ; WANG, N. S. ; KIM, K. A. ; GREGORY, P. D. ; PABO, C. O. ; REBAR, E. J.: An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. In: *Nature Biotechnology* **25**(7), 778–785 (2007)
- [Miyake *et al.* 1977] MIYAKE, T. ; KUNG, C. K. ; GOLDWASSER, E.: Purification of human erythropoietin. In: *The Journal of Biological Chemistry* **252**(15), 5558–5564 (1977)
- [Mizzen & Allis 1998] MIZZEN, C. A. ; ALLIS, C. D.: Linking histone acetylation to transcriptional regulation. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**(1), 6–20 (1998)
- [Mladenov & Iliakis 2011] MLADENOV, E. ; ILIAKIS, G.: Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. In: *Mutation research* **711**(1-2), 61–72 (2011)
- [Mohan *et al.* 2008] MOHAN, C. ; KIM, Y. G. ; KOO, J. ; LEE, G. M.: Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. In: *Biotechnology Journal* **3**(5), 624–630 (2008)
- [Mohan *et al.* 2007] MOHAN, C. ; PARK, S. H. ; CHUNG, J. Y. ; LEE, G. M.: Effect of doxycycline-regulated protein disulfide isomerase expression on the specific productivity of recombinant CHO cells: thrombopoietin and antibody. In: *Biotechnology and Bioengineering* **98**(3), 611–615 (2007)
- [Mok *et al.* 1999] MOK, C. L. ; GIL-GÓMEZ, G. ; WILLIAMS, O. ; COLES, M. ; TAGA, S. ; TOLAINI, M. ; NORTON, T. ; KIOUSSIS, D. ; BRADY, H. J.: Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. In: *J. Exp. Med.* **189**(3), 575–586 (1999)
- [Mol *et al.* 1990] MOL, J. N. ; VAN DER KROL, A. R. ; VAN TUNEN, A. J. ; VAN BLOKLAND, R. ; DE LANGE, P. ; STUITJE, A. R.: Regulation of plant gene expression by antisense RNA. In: *FEBS letters* **268**(2), 427–430 (1990)
- [Molina & Adjei 2006] MOLINA, J. R. ; ADJEI, A. A.: The Ras/Raf/MAPK pathway. In: *Journal of Thoracic Oncology* **1**(1), 7–9 (2006)
- [Mori *et al.* 2004] MORI, K. ; KUNI-KAMOCHI, R. ; YAMANE-OHNUKI, N. ; WAKITANI, M. ; YAMANO, K. ; IMAI, H. ; KANDA, Y. ; NIWA, R. ; IIDA, S. ; UCHIDA, K. ; SHITARA, K. ; SATOH, M.: Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize effector function of produced antibodies using FUT8 siRNA. In: *Biotechnol Bioeng.* **88**(7), 901–908 (2004)

- [Muto *et al.* 2006] MUTO, S. ; SENDA, M. ; AKAI, Y. ; SATO, L. ; SUZUKI, T. ; NAGAI, R. ; SENDA, T. ; HORIKOSHI, M.: Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(11), 4285–4290 (2006)
- [Naldini *et al.* 1996] NALDINI, L. ; BLOMER, U. ; GALLAY, P. ; ORY, D. ; MULLIGAN, R. ; GAGE, F. H. ; VERMA, I. M. ; TRONO, D.: *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. In: *Science* **272**, 263–267 (1996)
- [Nett *et al.* 2012] NETT, J. H. ; GOMATHINAYAGAM, S. ; HAMILTON, S. R. ; GONG, B. ; DAVIDSON, R. C. ; DU, M. ; HOPKINS, D. ; MITCHELL, T. ; MALLEM, M. R. ; NYLEN, A. ; SHAIKH, S. S. ; SHARKEY, N. ; BARNARD, G. C. ; COPELAND, V. ; LIU, L. ; EVERS, R. ; LI, Y. ; GRAY, P. M. ; LINGHAM, R. B. ; VISCO, D. ; FORREST, G. ; DEMARTINO, J. ; LINDEN, T. ; POTGIETER, T. I. ; WILDT, S. ; STADHEIM, T. A. ; D'ANJOU, M. ; LI, H. ; SETHURAMAN, N.: Optimization of erythropoietin production with controlled glycosylation-PEGylated erythropoietin produced in glycoengineered *Pichia pastoris*. In: *Journal of Biotechnology* **157**(1), 198–206 (2012)
- [Ngantung *et al.* 2006] NGANTUNG, F. A. ; MILLER, P. G. ; BRUSHETT, F. R. ; TANG, G. L. ; WANG, D. I.: RNA interference of sialidase improves glycoprotein sialic acid content consistency. In: *Biotechnology and Bioengineering* **95**(1), 106–119 (2006)
- [Noll & Biselli 1998] NOLL, T. ; BISELLI, M.: Dielectric spectroscopy in the cultivation of suspended and immobilized hybridoma cells. In: *Journal of Biotechnology* **63**(3), 187–198 (1998)
- [Nykänen *et al.* 2001] NYKÄNEN, A. ; HALEY, B. ; ZAMORE, P. D.: ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. In: *Cell* **107**, 309–321 (2001)
- [Okamura & Lai 2008] OKAMURA, K. ; LAI, E. C.: Endogenous small interfering RNAs in animals. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**(9), 673–678 (2008)
- [Omasa *et al.* 2008] OMASA, T. ; TANAKA, R. ; DOI, T. ; ANDO, M. ; KITAMOTO, Y. ; HONDA, K. ; KISHIMOTO, M. ; OHTAKE, H.: Decrease in antithrombin III fucosylation by expressing GDP-fucose transporter siRNA in Chinese hamster ovary cells. In: *J Biosci Bioeng.* **106**(2), 168–173 (2008)
- [Opel *et al.* 2010] OPEL, C. F. ; LI, J. ; AMANULLAH, A.: Quantitative modeling of viable cell density, cell size, intracellular conductivity, and membrane capacitance in batch and fed-batch CHO processes using dielectric spectroscopy. In: *Biotechnology Progress* **26**(4), 1187–1199 (2010)
- [Ozsolak & Milos 2011] OZSOLAK, F. ; MILOS, P. M.: RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. In: *Nature Reviews. Genetics* **12**(2), 87–98 (2011)
- [Ozturk & Palsson 1990] OZTURK, S. S. ; PALSSON, B. O.: Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production. In: *Journal of Biotechnology* **16**(3–4), 259–278 (1990)
- [Panja *et al.* 2008] PANJA, S. ; AICH, P. ; JANA, B. ; BASU, T.: How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? In: *Molecular Membrane Biology* **25**(5), 411–422 (2008)
- [Park *et al.* 2012] PARK, J. H. ; WANG, Z. ; JEONG, H. J. ; PARK, H. H. ; KIM, B. G. ; TAN, W. S. ; CHOI, S. S. ; PARK, T. H.: Enhancement of recombinant human EPO production and glycosylation in serum-free suspension culture of CHO cells through expression and supplementation of 30Kc19. In: *Appl Microbiol Biotechnol.* **96**(3), 671–683 (2012)

- [Park *et al.* 2001] PARK, J. W. ; VOSS, P. G. ; GRABSKI, S. ; WANG, J. L. ; PATTERSON, R. J.: Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. In: *Nucleic Acids Research* **29(17)**, 3595–3602 (2001)
- [Pascual *et al.* 2000] PASCUAL, J. ; MARTINEZ-YAMOUT, M. ; DYSON, H. J. ; WRIGHT, P. E.: Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor. In: *Journal of Molecular Biology* **304(5)** 723-729 (2000)
- [Paz *et al.* 2001] PAZ, A. ; HAKLAI, R. ; ELAD-SFADIA, G. ; BALLAN, E. ; KLOOG, Y.: Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. In: *Oncogene* **20(51)**, 7486–7493 (2001)
- [PDB 2012] PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Letzter Zugriff: September 2012. 2012
- [PeqLab 2011] PEQLAB: *peqGOLD XChange Plasmid Maxi Kit - Instruction Manual, V.1011*. 2011
- [PeqLab 2012] PEQLAB: *Instruction Manual, KAPAHiFiTM PCR Kit, v1210e*. 2012
- [Perez-Pinera *et al.* 2011] PEREZ-PINERA, P. ; OUSTEROUT, D. G. ; BROWN, M. T. ; GERSBACH, C. A.: Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. In: *Nucleic Acids Research* **40(8)**, 3741–3752 (2011)
- [Pestka 1971] PESTKA, S.: Inhibitors of ribosome functions. In: *Annu. Rev. Microbiol.* **25**, 487–562 (1971)
- [Peterson & Laniel 2004] PETERSON, C. L. ; LANIEL, M. A.: Histones and histone modifications. In: *Current Biology* **14(14)**, R546–551 (2004)
- [Pfaffl 2004] PFAFFL, M. W.: *Quantification strategies in real-time PCR*. S. 87–112. In: *A-Z of Quantitative PCR*, Intl Univ Line, 2004
- [Phyre2 2012] PHYRE2: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>. Letzter Zugriff: September 2012; (Kelley & Sternberg, 2009). 2012
- [Pingoud & Jeltsch 2001] PINGOUD, A. ; JELTSCH, A.: Structure and function of type II restriction endonucleases. In: *Nucleic Acids Research* **29(18)**, 3705–3727 (2001)
- [Pirt 1985] PIRT, S. J.: *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Science Ltd, 1985
- [Plessis *et al.* 1992] PLESSIS, A. ; PERRIN, A. ; HABER, J. E. ; DUJON, B.: Site-specific recombination determined by *I-SceI*, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. In: *Genetics* **130(3)**, 451–460 (1992)
- [Pluschke *et al.* 2011] PLUSCHKE, J. ; KLAUSING, S. ; HASELOFF, A. ; SCHRÖDER, B. ; HÜBEL, T.: Determination of intracellular antibody production, cell density, and viability of recombinant CHO-DG44 cells using the MACSQuant[®] Analyzer. In: *BioMed Central Proceedings* **5**, Suppl 8:P97 (2011)
- [Porteus & Carroll 2008] PORTEUS, M. H. ; CARROLL, D.: Gene targeting using zinc finger nucleases. In: *Nature Biotechnology* **23(8)**, 967–973 (2008)

- [POV-Ray™ 2012] POV-RAY™: <http://www.povray.org/>. Letzter Zugriff: September 2012. 2012
- [Powell & Gurk-Turner 2002] POWELL, J. ; GURK-TURNER, C.: Darbepoetin alfa (Aranesp). In: *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. **15(3)**, 332–335 (2002)
- [Proud 1995] PROUD, C. G.: PKR: a new name and new roles. In: *Trends in Biochem. Sciences* **20**, 241–246 (1995)
- [Ramirez et al. 2008] RAMIREZ, C. L. ; FOLEY, J. E. ; WRIGHT, D. A. ; MÜLLER-LERCH, F. ; RAHMAN, S. H. ; CORNU, T. I. ; WINFREY, R. J. ; SANDER, J. D. ; FU, F. ; TOWNSEND, J. A. ; CATHOMEN, T. ; VOYTAS, D. F. ; JOUNG, J. K.: Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. In: *Nature Methods* **5(5)**, 374–375 (2008)
- [Rand et al. 2005] RAND, T. A. ; PETERSEN, S. ; DU, F. ; WANG, X.: Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. In: *Cell* **123**, 621–629 (2005)
- [Rio et al. 1985] RIO, D. C. ; CLARK, S. G. ; TJIAN, R.: A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. In: *Science* **227(4682)**, 23–28 (1985)
- [Rivas et al. 2005] RIVAS, F. V. ; TOLIA, N. H. ; SONG, J.J. ; ARAGON, J.P. ; LIU, J. ; HANNON, G. J. ; JOSHUA-TOR, L.: Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 340–349 (2005)
- [Rémy et al. 2010] RÉMY, S. ; TESSON, L. ; MÉNORET, S. ; USAL, C. ; SCHARENBERG, A. M. ; ANEGON, I.: Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. In: *Transgenic Research* **9(3)**, 363–371 (2010)
- [Rouet et al. 1994] ROUET, P. ; SMIH, F. ; JASIN, M.: Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. In: *Molecular and Cellular Biology* **14(12)**, 8096–8106 (1994)
- [Roxström-Lindquist & Faye 2001] ROXSTRÖM-LINDQUIST, K. ; FAYE, I.: The Drosophila gene Yippee reveals a novel family of putative zinc binding proteins highly conserved among eukaryotes. In: *Insect Molecular Biology* **10(1)**, 77–86 (2001)
- [Rudin et al. 1989] RUDIN, N. ; SUGARMAN, E. ; HABER, J. E.: Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* **122(3)**, 519–534 (1989)
- [Saiki et al. 1985] SAIKI, R. K. ; SCHARF, S. ; FALOONA, F. ; MULLIS, K. B. ; HORN, G. T. ; ERLICH, H. A. ; ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science* **230**, 1350–1354 (1985)
- [Sambrook & Russell 2001] SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D. W.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 2001
- [Sander et al. 2011] SANDER, J. D. ; DAHLBORG, E. J. ; GOODWIN, M. J. ; CADE, L. ; ZHANG, F. ; CIFUENTES, D. ; CURTIN, S. J. ; BLACKBURN, J. S. ; THIBODEAU-BEGANNY, S. ; QI, Y. ; PIERICK, C. J. ; HOFFMAN, E. ; MAEDER, M. L. ; KHAYTER, C. ; REYON, D. ; DOBBS, D. ; LANGENAU, D. M. ; STUPAR, R. M. ; GIRALDEZ, A. J. ; VOYTAS, D. F. ; PETERSON, R. T. ; YEH, J. R. ; JOUNG, J. K.: Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). In: *Nature Methods* **8(1)**, 67–69 (2011)

- [SantaLucia 1998] SANTA LUCIA, J. Jr.: A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(4), 1460–1465 (1998)
- [Santiago *et al.* 2008] SANTIAGO, Y. ; CHAN, E. ; LIU, P. Q. ; ORLANDO, S. ; ZHANG, L. ; URNOV, F. D. ; HOLMES, M. C. ; GUSCHIN, D. ; WAITE, A. ; MILLER, J. C. ; REBAR, E. J. ; GREGORY, P. D. ; KLUG, A. ; COLLINGWOOD, T. N.: Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. In: *PNAS* **105**(15), 5809–5814 (2008)
- [Sasaki *et al.* 1987] SASAKI, H. ; BOTHNER, B. ; DELL, A. ; FUKUDA, M.: Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. In: *The Journal of Biological Chemistry* **262**(25), 12059–12076 (1987)
- [Schramke & Allshire 2004] SCHRAMKE, V. ; ALLSHIRE, R.: Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin. In: *Current Opinion in Genetics & Development* **14**, 174–180 (2004)
- [Schwarz *et al.* 2003] SCHWARZ, D. S. ; HUTVÁGNER, G. ; DU, T. ; XU, Z. ; ARONIN, N. ; ZAMORE, P. D.: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. In: *Cell* **115**, 199–208 (2003)
- [Segal 2011] SEGAL, D. J.: Zinc-finger nucleases transition to the CoDA. In: *Nat Methods*. **8**(1), 53–55 (2011)
- [Seidel *et al.* 2012] SEIDEL, C. ; SCHNEKENBURGER, M. ; DICATO, M. ; DIEDERICH, M.: Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature. In: *Genes & Nutrition* **7**(3), 357–367 (2012)
- [Seo *et al.* 2001] SEO, S. B. ; MCNAMARA, P. ; HEO, S. ; TURNER, A. ; LANE, W. S. ; CHAKRAVARTI, D.: Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. In: *Cell* **104**(1), 119–130 (2001)
- [Sijen *et al.* 2001] SIJEN, T. ; FLEENOR, J. ; SIMMER, F. ; THIJSEN, K. L. ; PARRISH, S. ; TIMMONS, L. ; PLASTER, R. H. A. ; FIRE, A.: On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. In: *Cell* **107**, 465–476 (2001)
- [Simone & Saverino 2009] SIMONE, R. ; SAVERINO, D.: Effect of lentiviral vectors on the phenotypical and functional maturation of human dendritic cells: implications for gene therapy. In: *The Open Vaccine Journal* **2**, 68–76 (2009)
- [Simpson *et al.* 1998] SIMPSON, N. H. ; SINGH, R. P. ; PERANI, A. ; GOLDENZON, C. ; AL-RUBEAI, M.: In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by the expression of the bcl-2 gene. In: *Biotechnology and Bioengineering* **59**(1), 90–98 (1998)
- [Siomi & Siomi 2009] SIOMI, H. ; SIOMI, M. C.: On the road to reading the RNA-interference code. In: *Nature* **457**(7228), 396–404 (2009)
- [Smith *et al.* 2009] SMITH, A. J. ; KARPOVA, Y. ; D’AGOSTINO, R. Jr ; WILLINGHAM, M. ; KULIK, G.: Expression of the Bcl-2 protein BAD promotes prostate cancer growth. In: *PLoS One* **4**(7), e6224 (2009)
- [Sánchez-Pulido *et al.* 2004] SÁNCHEZ-PULIDO, L. ; ROJAS, A. M. ; VAN WELY, K. H. ; MARTINEZ-A, C. ; VALENCIA, A.: SPOC: a widely distributed domain associated with cancer, apoptosis and transcription. In: *BMC Bioinformatics* **5**, 91 (2004)

- [Stark *et al.* 1998] STARK, G. R. ; KERR, I. M. ; WILLIAMS, B. R. ; SILVERMAN, R. H. ; SCHREIBER, R. D.: How cells respond to interferons. In: *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 227–64 (1998)
- [Struhl 1998] STRUHL, K.: Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. In: *Genes & Development* **12**, 599–606 (1998)
- [Sun *et al.* 2006] SUN, X. ; GOH, P. E. ; WONG, K. T. ; MORI, T. ; YAP, M. G.: Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. In: *Biotechnology Letters* *28*(11), 843–848 (2006)
- [Sung *et al.* 2007] SUNG, Y. H. ; LEE, J. S. ; PARK, S. H. ; KOO, J. ; LEE, G. M.: Influence of co-down-regulation of caspase-3 and caspase-7 by siRNAs on sodium butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. In: *Metabolic Engineering* **9**, 452–464 (2007)
- [Svoboda *et al.* 2000] SVOBODA, P. ; STEIN, P. ; HAYASHI, H. ; SCHULTZ, R. M.: Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. In: *Development* **127**, 4147–4156 (2000)
- [Takeuchi *et al.* 1988] TAKEUCHI, M. ; TAKASAKI, S. ; MIYAZAKI, H. ; KATO, T. ; HOSHI, S. ; KOCHIBE, N. ; KOBATA, A.: Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* **263**(8), 3657–3663 (1988)
- [Tennant 1964] TENNANT, J. R.: Evaluation of the Trypan Blue technique for determination of cell viability. In: *Transplantation* **2**, 685–694 (1964)
- [Tigges & Fussenegger 2006] TIGGES, M. ; FUSSENEGGER, M.: Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. In: *Metabolic Engineering* **8**(3), 264–272 (2006)
- [Trapani & Smyth 2002] TRAPANI, J. A. ; SMYTH, M. J.: Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. In: *Nat. Rev. Immunol.* **2**(10), 735–747 (2002)
- [Tsujimoto & Shimizu 2000] TSUJIMOTO, Y. ; SHIMIZU, S.: VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. In: *Cell Death and Differentiation* **7**(12), 1174–1181 (2000)
- [Urnov *et al.* 2005] URNOV, F. D. ; MILLER, J. C. ; LEE, Y. L. ; BEAUSEJOUR, C. M. ; ROCK, J. M. ; AUGUSTUS, S. ; JAMIESON, A. C. ; PORTEUS, M. H. ; GREGORY, P. D. ; HOLMES, M. C.: Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. In: *Nature* **435**(7042), 646–651 (2005)
- [Vara *et al.* 1986] VARA, J. A. ; PORTELA, A. ; ORTÍN, J. ; JIMÉNEZ, A.: Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin resistance. In: *Nucleic Acids Research* **14**(11), 4617–4624 (1986)
- [Vasquez *et al.* 2001] VASQUEZ, K. M. ; MARBURGER, K. ; INTODY, Z. ; WILSON, J. H.: Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(15), 8403–8410 (2001)
- [VMD 2012] VMD: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>. Letzter Zugriff: September 2012; (Humphrey *et al.*, 1996). 2012

- [Vyakarnam *et al.* 1997] VYAKARNAM, A. ; DAGHER, S. F. ; WANG, J. L. ; PATTERSON, R. J.: Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. In: *Molecular and Cellular Biology* **17(8)**, 4730-4737 (1997)
- [Walsh 2010] WALSH, G.: Biopharmaceutical benchmarks 2010. In: *Nature Biotechnology* **28(9)**, 917-924 (2010)
- [Walsh & Jefferis 2006] WALSH, G. ; JEFFERIS, R.: Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. In: *Nat Biotechnol.* **24(10)**, 1241-1252 (2006)
- [Wang *et al.* 2009] WANG, Z. ; GERSTEIN, M. ; SNYDER, M.: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. In: *Nature Reviews. Genetics* **10(1)**, 57-63 (2009)
- [Wells & Mollucci 1991] WELLS, V. ; MALLUCCI, L.: Identification of an autocrine negative growth factor: mouse beta-galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator. In: *Cell* **64(1)**, 91-97 (1991)
- [Wianny & Zernicka-Goetz 2000] WIANNY, F. ; ZERNICKA-GOETZ, M.: Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. In: *Nature Cell Biology* **2**, 70-75 (2000)
- [Wolfe *et al.* 2000] WOLFE, S. A. ; NEKLUDOVA, L. ; PABO, C.O.: DNA recognition by Cys₂His₂ zinc finger proteins. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **29**, 183-212 (2000)
- [Wong *et al.* 2006] WONG, D. C. F. ; WONG, K. T. K. ; NISSOM, P. M. ; HENG, C. K. ; YAP, M. G. S.: Targeting early apoptotic genes in batch and fed-batch CHO cell cultures. In: *Biotechnology and Bioengineering* **95(3)**, 350-361 (2006)
- [Woods *et al.* 2003] WOODS, N. B. ; MUESSIG, A. ; SCHMIDT, M. ; FLYGARE, J. ; OLSSON, K. ; SALMON, P. ; TRONO, D. ; VON KALLE, C. ; KARLSSON, S.: Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. In: *Blood* **101(4)**, 1284-1289 (2003)
- [Wu 2009] WU, S.-C.: RNA interference technology to improve recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells. In: *Biotechnology Advances* **27**, 417-422 (2009)
- [Wu *et al.* 2008] WU, S. C. ; HONG, W. W. ; LIU, J. H.: Short hairpin RNA targeted to dihydrofolate reductase enhances the immunoglobulin G expression in gene-amplified stable Chinese hamster ovary cells. In: *Vaccine* **26(38)**, 4969-4974 (2008)
- [Wurm 2004] WURM, F. M.: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. In: *Nature Biotechnology* **22(11)**, 1393-1398 (2004)
- [Yamane-Ohnuki *et al.* 2004] YAMANE-OHNUKI, N. ; KINOSHITA, S. ; INOUE-URAKUBO, M. ; KUSUNOKI, M. ; IIDA, S. ; NAKANO, R. ; WAKITANI, M. ; NIWA, R. ; SAKURADA, M. ; UCHIDA, K. ; SHITARA, K. ; SATOH, M.: Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. In: *Biotechnology and Bioengineering* **87(5)**, 614-622 (2004)
- [Yamaoka *et al.* 1991] YAMAOKA, K. ; OHNO, S. ; KAWASAKI, H. ; SUZUKI, K.: Overexpression of a beta-galactoside binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* **179(1)**, 272-279 (1991)

- [Yang *et al.* 1995] YANG, E. ; ZHA, J. ; JOCKEL, J. ; BOISE, L. H. ; THOMPSON, C. B. ; KORSMEYER, S. J.: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. In: *Cell* **80(2)**, 285–291 (1995)
- [Yang & Liu 2003] YANG, R. Y. ; LIU, F. T.: Galectins in cell growth and apoptosis. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* **60(2)**, 267–276 (2003)
- [Yoda *et al.* 2010] YODA, M. ; KAWAMATA, T. ; PAROO, Z. ; YE, X. ; IWASAKI, S. ; LIU, Q. ; TOMARI, Y.: ATP-dependent human RISC assembly pathways. In: *Nature Structural & Molecular Biology* **17(1)**, 17–23 (2010)
- [Yoon *et al.* 2003] 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. In: *Biotechnology and Bioengineering* **82(3)**, 289–298 (2003)
- [Yuan *et al.* 2004] YUAN, B. ; LATEK, R. ; HOSSBACH, M. ; TUSCHL, T. ; LEWITTER, F.: siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. In: *Nucleic Acids Research* **32(Web Server issue)**, 130–4 (2004)
- [Zamore *et al.* 2000] ZAMORE, P. D. ; TUSCHL, T. ; SHARP, P. A. ; BARTEL, D. P.: RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. In: *Cell* **101**, 25–33 (2000)
- [Zeng & Cullen 2002] ZENG, Y. ; CULLEN, B. R.: RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. In: *RNA* **8(7)**, 855–860 (2002)
- [Zeng *et al.* 2003] ZENG, Y. ; CULLEN, B. R. ; YI, R.: MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9779–9784 (2003)
- [Zha *et al.* 1997] ZHA, J. ; HARADA, H. ; OSIPOV, K. ; JOCKEL, J. ; WAKSMAN, G. ; KORSMEYER, S. J.: BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. In: *The Journal of Biological Chemistry* **272(39)**, 24101–24104 (1997)
- [Zha *et al.* 1996] ZHA, J. ; HARADA, H. ; YANG, E. ; JOCKEL, J. ; KORSMEYER, S. J.: Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). In: *Cell* **87(4)**, 619–628 (1996)
- [Zhang *et al.* 2007] ZHANG, B. ; WANG, Q. ; PAN, X.: MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. In: *Journal of Cellular Physiology* **210(2)**, 279–289 (2007)
- [Zhang *et al.* 2010] ZHANG, M. ; KOSKIE, K. ; ROSS, J. S. ; KAYSER, K. J. ; CAPLE, M. V.: Enhancing glycoprotein sialylation by targeted gene silencing in mammalian cells. In: *Biotechnol Bioeng.* **105(6)**, 1094–1105 (2010)
- [Zhou *et al.* 2011] ZHOU, M. ; CRAWFORD, Y. ; NG, D. ; TUNG, J. ; PYNNE, A. F. ; MEIER, A. ; YUK, I. H. ; VIJAYASANKARAN, N. ; LEACH, K. ; JOLY, J. ; SNEDECOR, B. ; SHEN, A.: Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. In: *J Biotechnol.* **153(1-2)**, 27–34 (2011)

-
- [Zhou *et al.* 2001] ZHOU, P. ; LEE, J. ; MOORE, P. ; BRASKY, K. M.: High-efficiency gene transfer into rhesus macaque primary T lymphocytes by combining 32 degrees C centrifugation and CH-296-coated plates: effect of gene transfer protocol on T cell homing receptor expression. In: *Human Gene Therapy* **12(15)**, 1843–1855 (2001)
- [Zinc finger consortium 2012] *Zinc finger consortium*: <http://zifit.partners.org/ZiFiT/>. Letzter Zugriff: September 2012. 2012
- [Zipper *et al.* 2004] ZIPPER, H. ; BRUNNER, H. ; BERNHAGEN, J. ; VITZTHUM, F.: Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. In: *Nucleic Acids Research* **32(12)**, e103 (2004)

A Anhang

A.1 Exemplarische Kolonie-PCR zur Identifikation von Klonen mit shRNA-Insert

Abbildung A.1 zeigt die Ergebnisse einer Kolonie-PCR zur Identifikation von bakteriellen Klonen, deren Plasmide ein shRNA-Insert integriert hatten. Das abgebildete Gel ist ein Beispiel der Kolonie-PCR zur Identifikation von Klonen mit integrierter *Lgals1*-shRNA-Sequenz (Abschnitt 5.2.3.1). Die Auftrennung erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel (Abschnitt 4.2.7). In den Spuren 1–7 ist ein PCR-Amplifikat mit etwa 273 bp Größe zu erkennen. In diesem Beispiel war lediglich die Reaktion 8 nicht erfolgreich. Das in der PCR-Reaktion 8 erzeugte DNA-Fragment wies mit etwa 231 bp eine geringere Größe auf, als die Fragmente mit erfolgreicher Integrierung der shRNA-Oligos. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei Reaktion 8 um einen religierten oder unvollständig geschnittenen Vektor handelte. Das entsprechende Plasmid war daher für weitere Experimente ungeeignet.

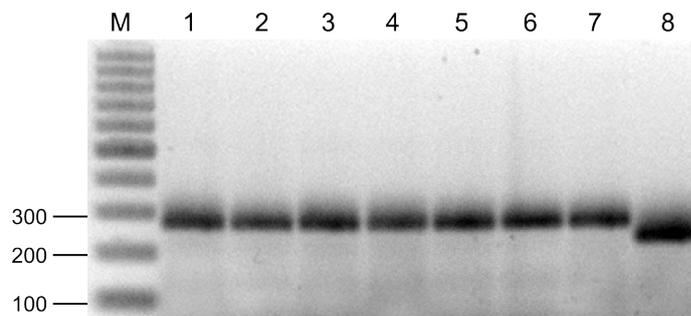


Abbildung A.1: Kolonie-PCR von bakteriellen *Lgals1*-shRNA-Klonen, aufgetrennt in einem 2 %igen Agarosegel. M enthält den DNA-Längenstandard, in diesem Fall die GenerulerTM 100 bp DNA-Leiter. In den Spuren 1–8 sind verschiedene PCR-Reaktionen der Kolonie-PCR aufgetragen. Eine erfolgreiche Integrierung der shRNA-Sequenz erzeugte eine etwa 273 bp große Bande, eine Vektorreligation erzeugte mit etwa 231 bp ein Fragment geringerer Größe.

A.2 Differentieller μ Array zur Identifikation von Zielgenen für die ZLE

Die Identifikation von geeigneten Zielgenen für eine ZLE ist von entscheidender Bedeutung. So gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten, diese Zielgene zu identifizieren: rational oder durch einen gerichteten Ansatz. Bei einer rationalen Bestimmung von Zielgenen werden in verschiedenen Stoffwechselwegen Gene ermittelt, deren Proteine kontraproduktiv für das angestrebte Ziel der ZLE sein könnten. Je nach Zielsetzung könnten dies, wie auch in dieser Arbeit, die Erhöhung der viablen Zelldichte, oder aber auch die Erhöhung des Produkttiters sein. In einem gerichteten Ansatz wird mit verschiedenen Methoden der Expressionszustand von Genen oder Proteinen identifiziert, die im Zusammenhang mit einem bestimmten Phänotyp, z. B. der Hyperproduktivität, oder einem verändertem Wachstumsverhalten stehen. Dieser Phänotyp soll durch *knockdown* oder Überexpression auf die Zielzellen übertragen werden. Verschiedene Methoden sind zur Identifikation geeignet, z. B. ein differentieller Proteomansatz (Carlage *et al.*, 2009; Beckmann, 2012) oder aber auch der Vergleich der Transkripte mittels qRT-PCR oder μ Array (Kantardjieff *et al.*, 2010; Klausning *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde ein μ Array-Experiment durchgeführt, um die Unterschiede in der Transkription zwischen Natriumbutyrat (NaBu)-induzierten Zellen und nicht-induzierten Zellen zu bestimmen. NaBu-Induktion bewirkt in Zellkulturen eine Produktivitätssteigerung, wodurch der Produkttiter erhöht wird (Jeon & Lee, 2007). Gleichzeitig stagniert das Wachstum und es setzen apoptotische Prozesse ein.

Die Generierung von Proben für den μ Array durch eine Bioreaktorkultivierung sowie dessen Durchführung und Auswertung wurden in Zusammenarbeit mit Frau Sandra Klausning ausgeführt (Abschnitte 4.4.1 und 4.4.3). Dazu wurden zwei Biostat MD-Stationen und zwei Aplus-Bioreaktoren verwendet. Das Kulturvolumen betrug 1,2 L, die Startzelldichte 4×10^5 Z/mL CHO DP-12. Das Medium war mit 5 mM Glutamin supplementiert. Der Verlauf der Lebendzelldichte und der Viabilität wurde durch Triplikat-Messungen im Cedex zweimal täglich kontrolliert (Abschnitt 4.3.3). Nach 67 h, in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen, wurden drei der Bioreaktoren mit 2 mM NaBu induziert (Abschnitt 4.4.2). Der vierte Bioreaktor wurde nicht induziert und sollte als Referenz während des Experimentes dienen. Für die Analyse der Genexpression wurden wiederholt Proben für eine RNA-Extraktion genommen (Abschnitt 4.4.2). Die Entwicklung der Lebendzelldichte, sowie die der Via-

bilität der Kulturen, die Produkttiter und die zellspezifischen Produktivitäten sind in den Abbildungen A.2 bis A.4 dargestellt.

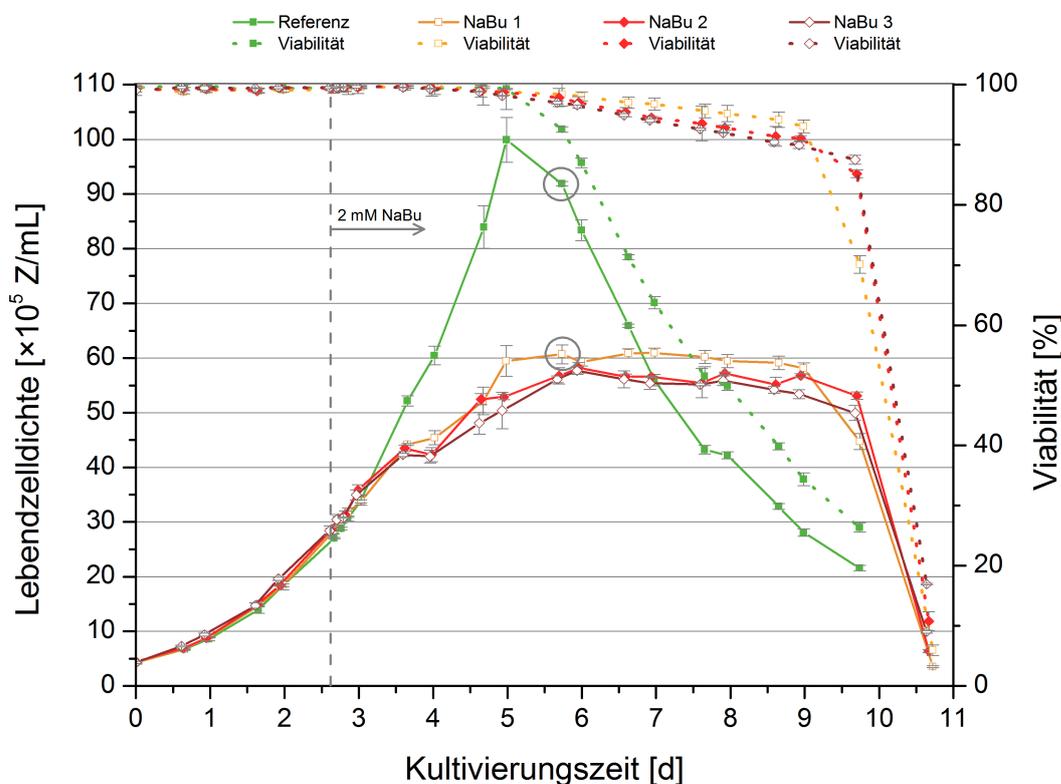


Abbildung A.2: Lebendzellichten und Viabilitäten der induzierten und nicht-induzierten CHO DP-12-Zellen während der Bioreaktorkultivierung. Der Zeitpunkt der NaBu-Induktion ist durch einen Pfeil und die vertikale, gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die beiden Kreise markieren die Zeitpunkte und Proben, die anschließend mittels des μ Arrays analysiert wurden (Abschnitt 4.4.3).

Die Unterschiede in der Entwicklung des Zellwachstums nach der NaBu-Induktion sind deutlich zu beobachten. Während die Referenzkultur normal weiterwuchs und ein Maximum von 100×10^5 viablen Zellen/mL nach ca. 5 Tagen Kultivierungszeit erreichte, stagnierte das Wachstum der induzierten Zellen nach der Zugabe des Natriumbutyrate. Die induzierten Zellen wuchsen zwar noch bis auf eine Zelldichte von ca. 60×10^5 Z/mL, erreichten damit aber eine Plateau-Phase, die nach ca. 6 Tagen durch eine Reduktion der Viabilität gekennzeichnet war. Gegen Ende der Kultivierung nahmen die Viabilität und auch die Lebendzellichte innerhalb eines Tages rapide ab.

Sie fielen von 45×10^5 Z/mL auf 4×10^5 Z/mL und von 70 % Viabilität auf 6 %. Die nicht-induzierten Zellen nahmen nach dem Erreichen des Maximums, verglichen mit den behandelten Zellen, stetiger und langsamer in Lebendzell-dichte und Viabilität ab. Die Auswirkungen der NaBu-Induktion spiegelten sich auch im Produkt-titer und der zellspezifischen Produktivität wider. Während die nicht-induzierten CHO DP-12-Zellen einen Titer von etwa 108 mg/L Antikörper generierten, lag das Maximum der induzierten Zellkulturen zwischen 165 mg/L und 176 mg/L. Nach 5,7 Kultivierungstagen war der größte Unterschied in der zellspezifischen Produktivität messbar. Die unbehandelte Referenz produzierte zu diesem Zeitpunkt mit $1,2 \text{ pg}/(\text{Z} \times \text{d})$, die induzierten Zellen mit etwa $4,1 \text{ pg}/(\text{Z} \times \text{d})$, was einer Erhöhung der Produktivität um den Faktor 3,6 entsprach. Dieser Zeitpunkt (72 h nach Induktion) wurde daher auch für die Analyse mit dem μ Array ausgewählt.

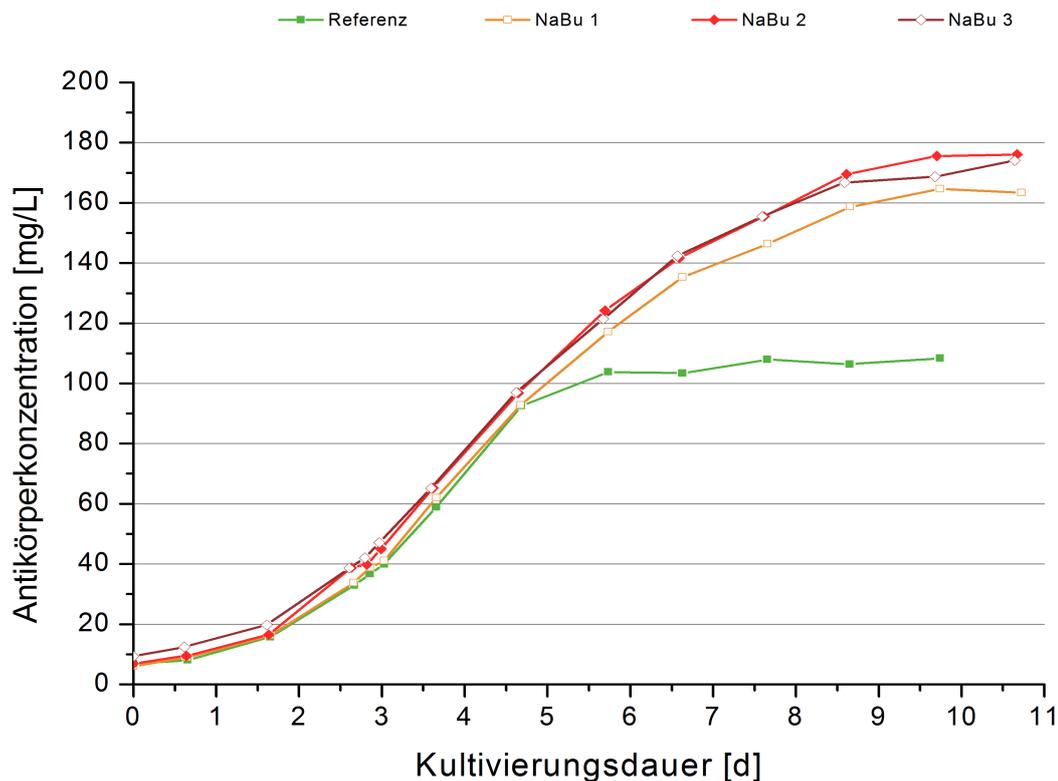


Abbildung A.3: Entwicklung der Antikörperkonzentration während der Bioreaktorkultivierung der mit NaBu induzierten und nicht-induzierten CHO DP-12-Zellen. Alle Kultivierungen mit induzierten Zellen erzielten höhere finale Produkttiter als die nicht-induzierte Referenz.

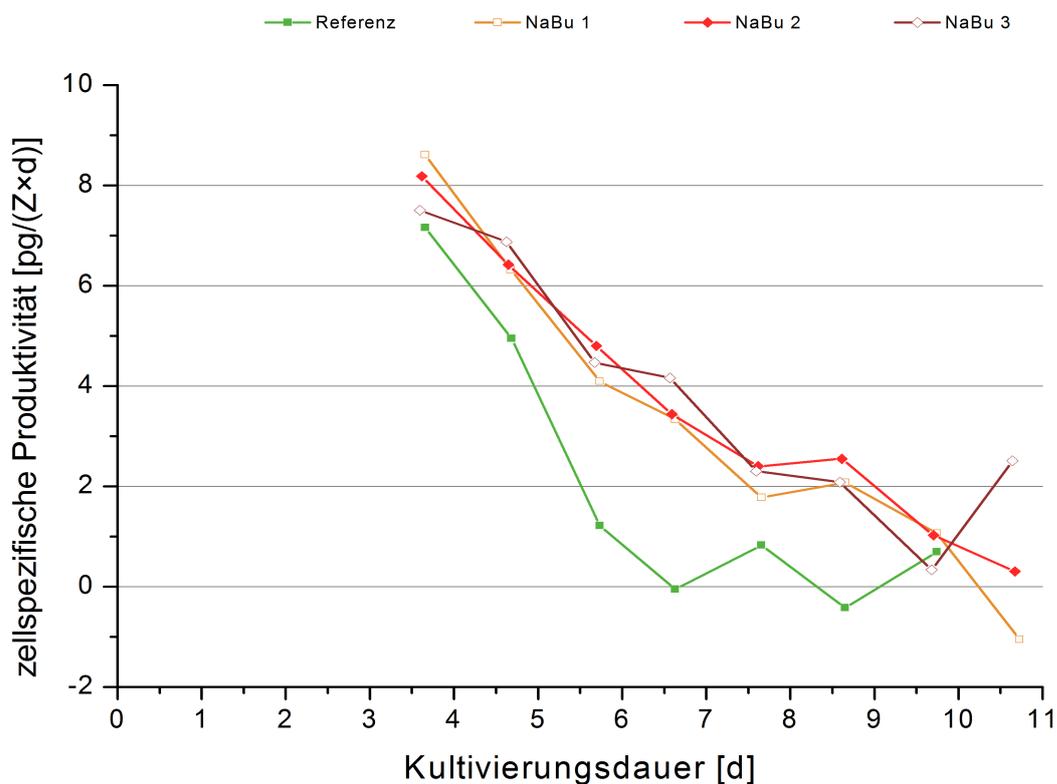


Abbildung A.4: Darstellung des Verlaufs der berechneten zellspezifischen Produktivität der induzierten und nicht-induzierten Zellen während der Bioreaktorkultivierung. Die Daten werden erst ab Tag 3,6 dargestellt, da sich ab dem Zeitpunkt die Lebendzellkonzentration ebenfalls zu unterscheiden begann. Der größte Unterschied zwischen der NaBu 1 Kultur und der Referenz wurde an Tag 5,7 erreicht. Dieser Zeitpunkt wurde daher für das folgende μ Array-Experiment genutzt (vgl. Abbildung A.2 und Abschnitt 4.4.3).

Die Auswertung des μ Arrays erfolgte wie beschrieben (Abschnitt 4.4.3). So wurden 1461 Gene identifiziert, die zu dem gewählten Zeitpunkt unter NaBu-Behandlung differentiell exprimiert vorlagen. 771 davon waren hochreguliert und 690 herunterreguliert (Klausing *et al.*, 2011). Mithilfe der EC-Nummern in den KEGG-Pfaden konnten die Transkripte zu unterschiedlichen Kategorien zugeordnet werden. Eine Auswahl dieser Einteilung ist in Abbildung A.5 gezeigt. Dabei wurden nur die Transkripte berücksichtigt, die eindeutig zuzuordnen waren.

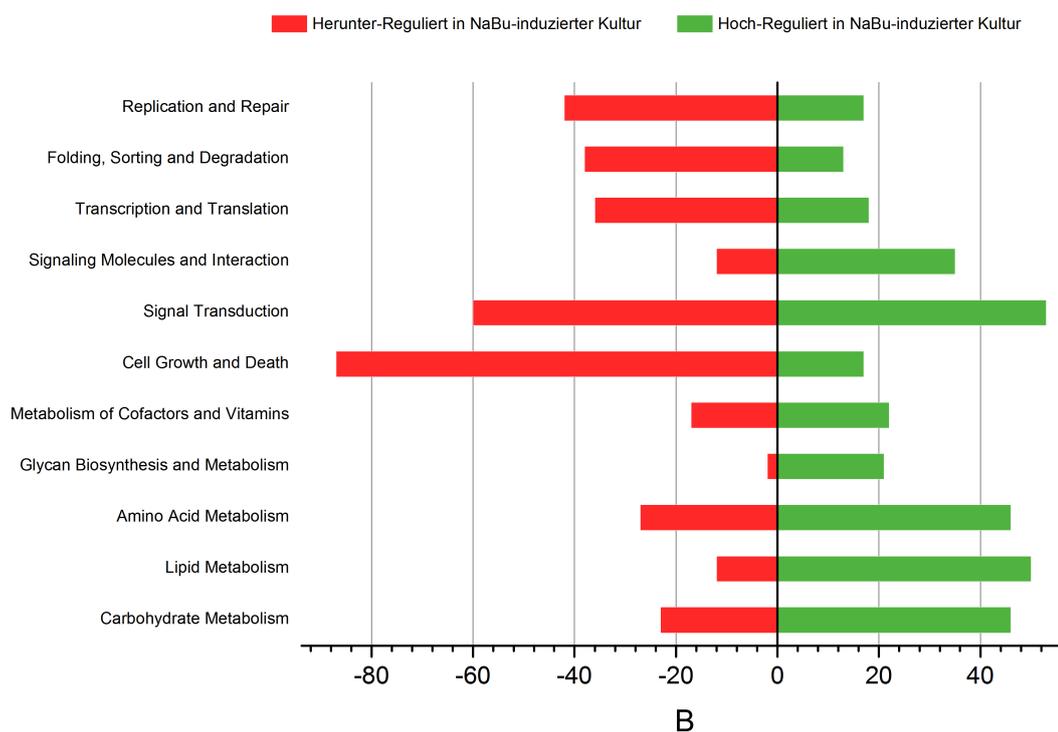


Abbildung A.5: Darstellung der Auswahl einiger signifikant regulierter Transkripte in der NaBu-induzierten Kultur. Die Transkripte wurden den unterschiedlichen KEGG-Pfaden zugeordnet, um eine leichtere Übersicht über die Funktionszugehörigkeit zu ermöglichen. Wie die deutlichen Veränderungen des Wachstumsverhaltens nahelegten, sind viele Transkripte (104) in der Kategorie *cell growth and death* signifikant reguliert.

Eine Vielzahl an hochregulierten Genen bzw. Transkriptmengen ist in den Stoffwechselwegen des *Carbohydrate*-, Lipid-, Aminosäure- und Glykanmetabolismus zu finden. Dies führte mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer größeren Verfügbarkeit von Stoffwechselprodukten, die unter anderem zur Produktion des Antikörpers dienten. In der Gruppe Zellwachstum und Zelltod waren mit 87 Transkripten überdurchschnittlich viele transkribierte Gene scheinbar herunter reguliert. Diese Transkripte stammten zu einem großen Teil von Zellzyklus-kontrollierenden Genen ab (Daten nicht gezeigt). Dies würde mit der Reduktion des Zellwachstums nach der Induktion korrelieren. Weiterhin waren einige Transkripte, die an der Apoptose beteiligt waren, in der NaBu-induzierten Kultur hochreguliert. Diese Beobachtung deckte sich mit bereits publizierten Daten, die eine Steigerung der Apoptose-Aktivität unter Einfluss von Natriumbutyrat zeigten (Lee & Lee, 2012a).

Ein Vergleich der individuellen Regulationsunterschiede mit bereits publizierten Daten erwies sich als schwierig. Oftmals konnten die zuvor ermittelten Richtungen der Regulation unter NaBu-Einfluss (Hoch- bzw. Herunter-Regulation) bestätigt werden. Beispielsweise konnten Kantardjief *et al.* (2010) nachweisen, dass die Transkripte von *Ap4s1* (*Homo sapiens adaptor-related protein complex 4, sigma 1 subunit, transcript variant 1*) und *Pkmyt1* (*Protein Kinase, membrane associated tyrosine threonine 1*) mit einem *fold change* von -15,0 und -111,0 herunter reguliert waren. In dem hier durchgeführten μ Array konnte die Reduktion dieser Transkripte ebenfalls detektiert werden. Der jeweilige *fold change* war mit -2,8 bzw. -2,0 jedoch deutlich geringer, als der der publizierten Daten. Das könnte jedoch auf die unterschiedlichen μ Arrays zurückgeführt werden. Das in dieser Arbeit verwendete μ Array stammte von der Firma Agilent Technologies (USA), das von Kantardjief *et al.* von der Firma Affymetrix (USA). Die unterschiedlichen μ Arrays machen einen direkten Vergleich individueller Regulationswerte daher nur schwer möglich. Aus diesem Grund kann nur eine qualitative Betrachtung als Funktionsbeweis für die Funktionalität des CHO cDNA μ Arrays dienen. Bis auf vereinzelte Ausnahmen stimmten die stichprobenartig verglichenen Regulationsrichtungen verschiedener Transkripte mit den publizierten Daten überein. Ein Gegenbeispiel war das Transkript von *CHK2 checkpoint homolog (Chk2)*, welches in dem hier durchgeführten Experiment mit einem *fold change* von +1,4 hoch reguliert war. Kantardjief *et al.* konnten in dem Fall eine Reduktion von -23,7 nachweisen. Aufgrund dieser, wenngleich auch wenigen Diskrepanzen, müssen die Daten für eine genauere Aussage noch bioinformatisch miteinander abgeglichen werden. Die generelle Funktionalität des μ Array konnte jedoch bestätigt werden. Die generierten Daten konnten dazu genutzt werden, Zieltranskripte für die ZLE zu identifizieren. Dabei waren, je nach Fragestellung, sowohl die hoch regulierten, als auch die herunter regulierten Transkripte von Interesse. Wachstumshemmende Gene könnten in NaBu-induzierten Kulturen hoch reguliert vorliegen. Ihr *knockdown* könnte sich auch unter normalen Bedingungen positiv auf das Zellwachstum auswirken. Ein solcher Fall lag möglicherweise bei *Ypel3* vor, das einen *fold change* von +3,7 besaß. Es wurde zuvor als wachstumshemmender Faktor identifiziert (Abschnitt 3.4.5). Die Experimente zum *knockdown* dieses Transkripts konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht vollständig abgeschlossen werden (Abschnitt 5.2.4). Ein Beispiel für ein herunter reguliertes Transkript war *Phf3*. Es wies einen *fold change* von -14,3 auf. Eine artifizielle Übertragung der Reduktion durch *knockdown* des Transkripts könnte zur

Produktivitätssteigerung oder aber auch zur Steigerung des Wachstums beitragen. Die Arbeiten an diesem Zielgen konnten jedoch ebenfalls nicht komplettiert werden (Abschnitt 5.2.4). Das μ Array-Experiment lieferte dennoch eine Vielzahl von möglichen Zielgenen, deren nähere Untersuchung in zukünftigen Arbeiten durch *knockdown* oder gegebenenfalls Überexpression untersucht werden kann.

A.3 Analytik verschiedener Substrate während der Shaker-Fed-Batch-Kultivierung der *Lgals1-kd*-Zellen

Während der parallelen Fed-Batch-Kultivierung wurden neben den Proben für die Produktanalytik auch Überstände zur Analyse der Substrate und Nebenprodukte eingefroren. Dies sollte der Identifizierung von möglichen Limitierungen während der Kultivierung dienen. Da die *Lgals1-kd*-Zellen trotz Fed-Batch offenbar einer Limitierung im Laufe der Kultivierung unterlagen (vgl. Abbildung 5.22), werden im Folgenden die Ergebnisse der Substrat- und Nebenprodukt-Analytik für diese Zellen exemplarisch dargestellt. Da alle Kulturen gleichmäßig mit *Feed* versorgt wurden und jeweils die gleiche Menge Probe entnommen wurde, ist ein Vergleich der Konzentrationen zulässig.

Abbildung A.6 zeigt die Entwicklung der Glukose- und Laktatkonzentration. Bis auf eine sprunghafte Erhöhung der Glukosekonzentration in der *Lgals1-kd*-Kultivierung an Tag 2,8 entwickelten sich die Konzentration vergleichbar zu der der Referenzkultur und der Negativkontrolle. Möglicherweise handelte es sich hierbei um eine Messungenauigkeit. Allen Kulturen gemein war eine steigende Glukosekonzentration im Verlauf der Kultivierung. Nach Tag 3,8 stieg die Glukosekonzentration der *Lgals1-kd*-Zellen weniger stark an, als die der Referenzzellen und der Negativkontrolle. Letztere wiederum zeigte aber ein ähnliches Verhalten im Vergleich zur Referenzkultur. Dieser Effekt war daher wahrscheinlich auf die höhere Lebendzellichte zurückzuführen. Nach Tag 9,8 begann die Glukosekonzentration wieder schneller zu steigen, was in der reduzierten Lebendzellichte und Viabilität der Kultur begründet war (vgl. Abbildung 5.22).

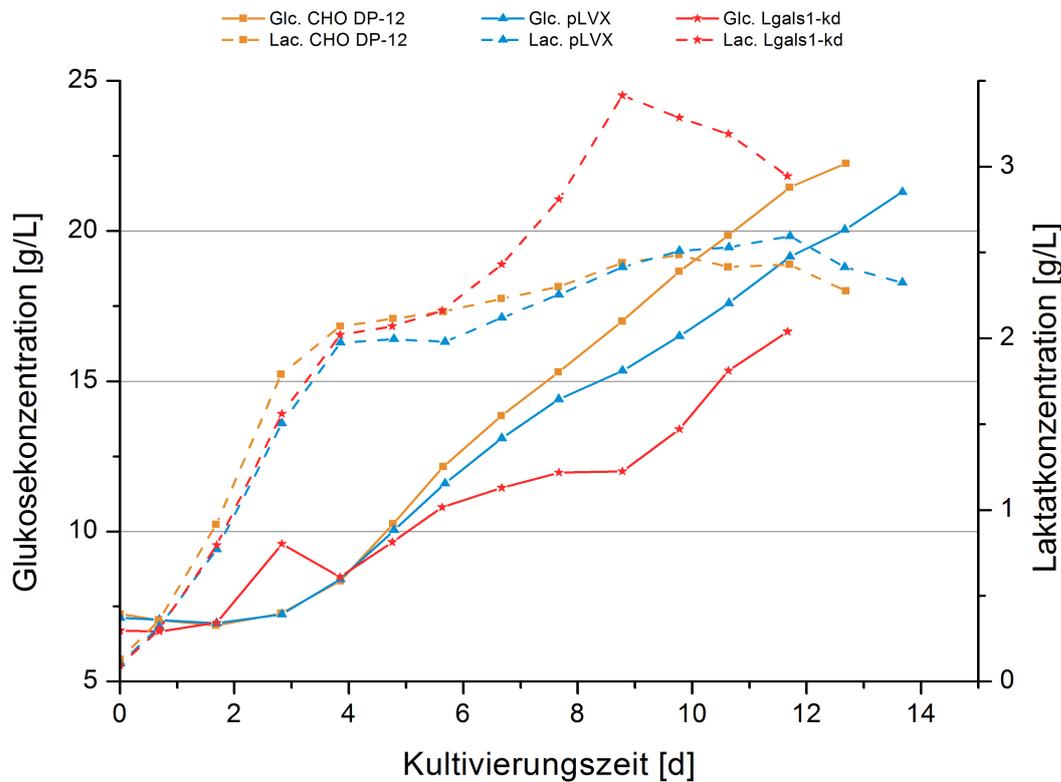


Abbildung A.6: Glukose- und Laktatkonzentration während der Shaker-Fed-Batch-Kultivierung. Exemplarisch sind hier nur die Daten der CHO DP-12- (orange), der pLVX- (blau) und der *Lgals1-kd*-Zellen (rot) dargestellt.

Trotz des offensichtlich höheren Verbrauchs an Glukose, waren die *Lgals1-kd*-Zellen nicht durch einen Mangel daran limitiert. Die Laktatkonzentrationen stiegen ebenfalls während der Kultivierung weiter an. Aufgrund der ständigen Verfügbarkeit von Glukose, wurde das Laktat auch zum Ende der Kultivierung hin nicht wieder abgebaut. Lediglich die *Lgals1-kd*-Zellen zeigten eine solche Reduktion, jedoch befanden sie sich zu der Zeit bereits in der Absterbe-Phase. Allerdings stieg die Laktatkonzentration im Vergleich zu der Referenz und der Negativkontrolle ab Tag 5,6 deutlich an. Dies könnte ein Hinweis auf eine veränderte Regulation der Stoffwechselwege der *Lgals1-kd*-Zellen sein. Die Laktatkonzentration erreichte Werte zwischen 2,5 g/L (CHO DP-12) und 3,4 g/L (*Lgals1-kd*). Dies entspricht etwa 28–38 mM Laktat. Für CHO-Zellen konnte ermittelt werden, dass Laktat ab einer Konzentration von etwa 60 mM eine inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum besitzt. Die spezifische Wachstumsrate μ wird dadurch um 25 % gesenkt (Lao & Toth, 1997). Mit etwa 40 mM Laktat waren

die in dieser Kultivierung gemessenen Konzentrationen für das Wachstum der Zellen damit unkritisch.

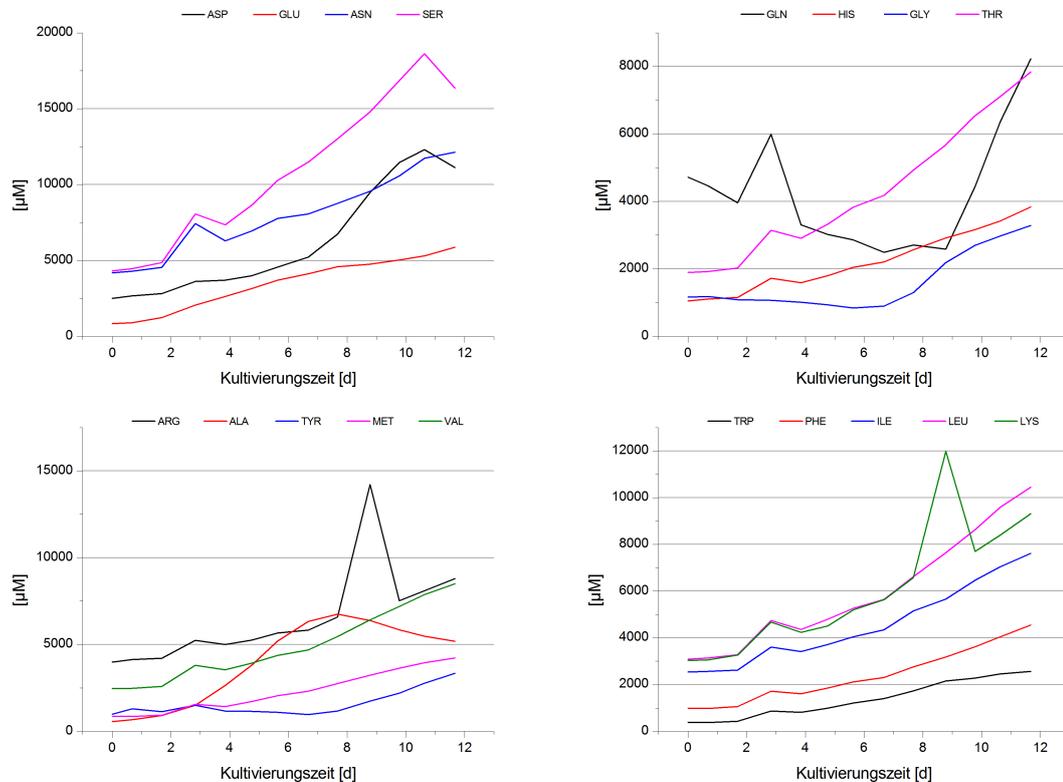


Abbildung A.7: Aminosäurekonzentrationen während der Shaker-Fed-Batch-Kultivierung. Dargestellt sind nur die ermittelten Konzentrationen der *Lgals1-kd*-Zellen. Obgleich viele Aminosäuren vermehrt verbraucht wurden, wie z. B. Glutamin oder Tyrosin, war keine Aminosäure zu einem Zeitpunkt der Kultivierung limitiert.

Die Entwicklung der Aminosäure-Konzentrationen ist in Abbildung A.7 dargestellt. Sie wurden der Übersichtlichkeit halber zu je 4 oder 5 verschiedenen Aminosäuren pro Einzeldiagramm zusammengefasst. Auf eine individuelle Diskussion der unterschiedlichen Aminosäuren wird an dieser Stelle verzichtet. Die Verläufe sollten lediglich zeigen, dass keine der Aminosäuren während der Kultivierung limitierend geworden ist. Im Gegenteil, alle nahmen in ihrer Konzentration zu. Demzufolge sollte für zukünftige Experimente der *Feed* angepasst werden, da die Menge an Glukose, aber auch die Aminosäuren, nicht verbraucht werden konnte. Die Entwicklung der Ammonium-Konzentration wurde während der Kultivierung nicht verfolgt. Sie könn-

te noch Informationen über die Umsetzung des Glutamins liefern und gegebenenfalls auf eine Inhibierung durch das Ammonium hindeuten. Dementsprechend müsste in zukünftigen Experimenten dieser Parameter ebenfalls erfasst werden.

A.4 Zellzahlen während der Shaker-Fed-Batch-Kultivierung

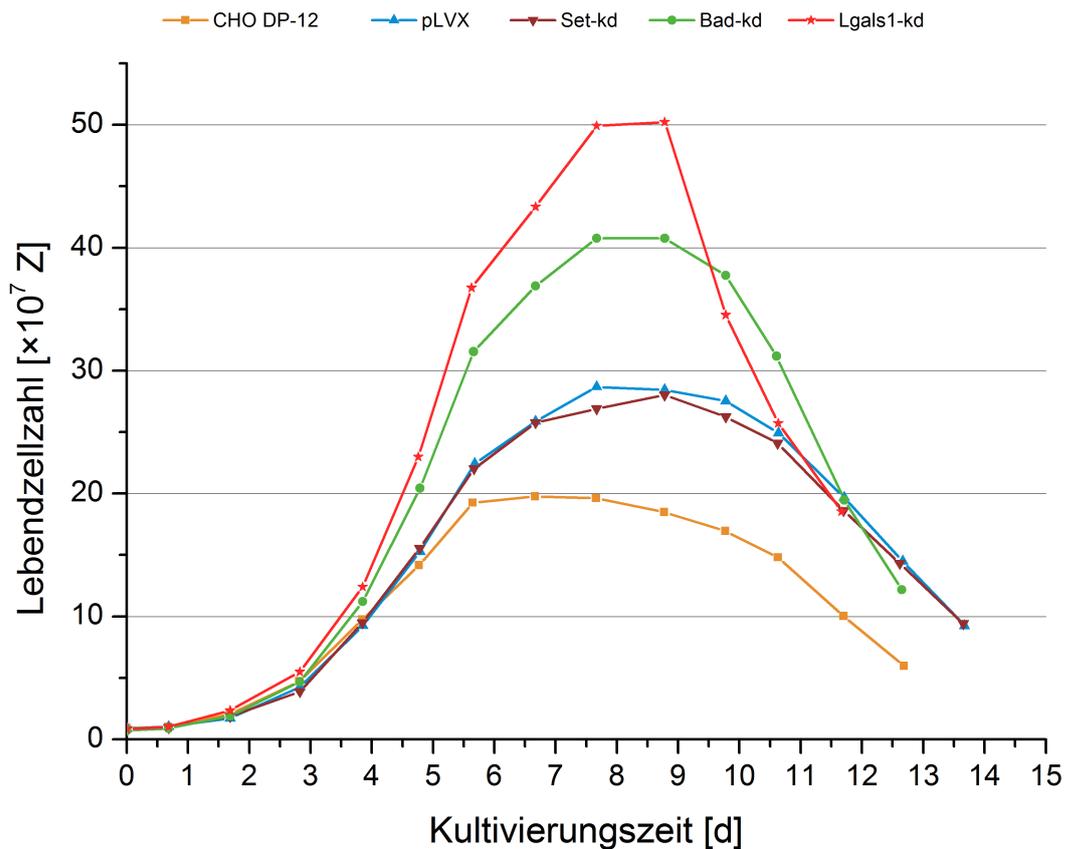


Abbildung A.8: Verlauf der Lebendzellzahlen nach Berechnung mit dem jeweiligen Volumen während des Fed-Batches. Dargestellt sind die Zellzahlen aller modifizierten Kulturen, sowie der CHO DP-12-Ausgangszellen.

A.5 Oligonukleotid-Sequenzen zur Generierung der shRNA-Expressionsvektoren, sowie Primer und Plasmide

Tabelle A.1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Hersteller bzw. Lieferant. Basierend auf dem pLVX-shRNA1-Plasmid wurden alle shRNA-Expressionsvektoren generiert. Sie sind hier nicht einzeln aufgeführt. Ebenso wurde aus pCMVMIE die EPO- und DARBE-Expressionsvektoren (pCMVMIE-*Epo* und pCMVMIE-*Darbe*) sowie pCMVMIE-*eGFP* hergestellt.

Name	Beschreibung	Hersteller / Lieferant
pLVX-shRNA1	Lentiviraler Transfervektor zur Expression von shRNA, enthält <i>Pac</i> -Gen für Puromycin-Resistenz	Clontech (Frankreich)
pUC19	Klonierungsvektor zur Verwendung in Prokaryoten	Life Technologies (Darmstadt)
pmaxGFP [®]	Vektor zum Test von Nukleofektionseffizienzen	Lonza (Schweiz)
peGFP-N1	Expressionsvektor, der eine Verknüpfung des <i>gene of interest</i> mit dem N-terminus von eGFP ermöglicht	Clontech (Frankreich)
pMLM290	Vektor zur Expression der „linken“ ZFN, <i>FokI</i> -Domäne enthält zwei Mutationen (E490K, I538K)	Keith Joung, Addgene (USA)
pMLM292	Vektor zur Expression der „rechten“ ZFN, <i>FokI</i> -Domäne enthält zwei Mutationen (Q486E, I499L)	Keith Joung, Addgene (USA)
gWIZ [™] -SEAP	Expressionsvektor mit gekoppelter sekretierter Alkalischer Phosphatase	Genelantis (USA)
pCR-Epo	Sicherungsvektor mit integrierter <i>Epo</i> -cDNA	HZI, Braunschweig
pCDNA3.1+	Expressionsvektor mit Neomycin-Resistenz-Gen zur G418-Selektion	Life Technologies (Darmstadt)
pCMVMIE	Modifizierter pCDNA3.1(+)-Vektor mit Promotor aus gWIZ-SEAP	Oliver Krämer

Tabelle A.2: Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Primer für die qRT-PCR, Klonierungen oder Nachweisreaktionen. Sind zwei Amplikongrößen angegeben, so beschreibt dies eine Kontrollbande ohne einklonierte Sequenz bzw. ein Fragment mit integrierter DNA. Bei X richtete sich die Größe des Amplikons nach dem einklonierten DNA-Fragment.

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')	Annealing-		Amplikon- Größe [bp]
			Temperatur [°C]	Größe [bp]	
1	pLVX-shRNA1-fwd	TTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTT	55-60	231; 273	
2	pLVX-shRNA1-rev	GCCAGAGGCCACTTGTGTAG			
3	Aktin-fwd	CACCCGTGCTGCTCACC	60	100	
4	Aktin-rev	CGTACATGGCTGGGGTGT			
5	Vezatin-fwd	TTAAGGAGCTGGGGCTTG	60	117	
6	Vezatin-rev	GTGCCACCCAGAGTTGGA			
7	Gapdh-fwd	CCAGGTGGTCTCCTCTGACT	60	128	
8	Gapdh-rev	TGCTGTAGCCAAATTCGTTG			
9	Ype13-fwd	GCTGACAGGCTTTCATGCTG	60	96	
10	Ype13-rev	TTCTGGCTGCTCTCAAAGG			
11	Phf3-fwd	GGACTCCAAGCAAGCAAATGT	60	92	
12	Phf3-rev	TCCATGAAACCAGTCATCACA			
13	Set-fwd	TTCAGAAGAGGTCAGAATTGATCGCC	60	100	
14	Set-rev	TCGTCTTCTCCCAAGCAGGG			
15	Set-cloning-fwd	AAGAATTCATGGCCCCGAAGGGG	50	886	
16	Set-cloning-rev	AAGGATCCCTAATCATCTCGGCCTTC			
17	Bad-fwd	CTGGCTCTGCACACGCCCTA	60	106	
18	Bad-rev	ACATACTCTGGGCTGCTGTCTCC			
19	Lgals1-fwd	GGGGAGTGTCTCAAAGTTGG	60	100	
20	Lgals1-rev	GGTTGAAGTCAGGCCACAG			
21	GS-genomisch-fwd	GTCCGTATTACTGTGGTGTGG	65	121	

Tabelle A.2: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer (Forts.).

Nr.	Name	Sequenz (5' \mapsto 3')	Annealing- Temperatur [°C]	Amplikon- Größe [bp]
22	GS-genomisch-rev	GGCATGACCTCAGCATTTGT		
23	CMVMIE-cloning-fwd	TGGCCATTGCATACGTTGT		
24	CMVMIE-cloning-rev	TATAAGCTTCTGCAGAAAAGACCCATG	60	1630
25	Epo-fwd	ATCTCGAGcCGCCACCATGGGGTGCACGAATGT	59	606
26	Epo-rev	ATGGGCCCTCATCTGTCCCCTGTCCTG		
27	pMLM29-fwd	GCACCATGGGACCTAAGAAA	59	204; 452
28	pMLM29-rev	TCTATCCTGAGTGAATTTCTGG		
29	pCMVMIE-fwd	TGGAGGGCAGTGTAGTCTGA		
30	pCMVMIE-rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	55-60	235; X
31	DarbeMut-anti-fwd	TCTCATTCAAGCTGCACGTTTCATTACAGCCCGTCGTGAT	60	/
32	DarbeMut-sense-rev	GGTCAACTCTTCCCAGGTGAATGAGACCCTGCAGCTGCATG		
33	pUC19-fwd	GTTTTCCCAGTCACGAC	60	/
34	pUC19-rev	AGCGGATAACAATTTACACAGGA		

Tabelle A.3: Erläuternde Beschreibung zu den Primern aus Tabelle A.2.

Primer Nr.	Beschreibung der Funktion
1 & 2	Flankieren die MCS des pLVX-shRNA1-Vektors, Kolonie-PCR und Sequenzierung
3 & 4	qRT-PCR-Primer für das <i>β-Aktin housekeeping</i> -Gen. Überspannt die Exon 2–3-Grenze
5 & 6	qRT-PCR-Primer für das <i>Gapdh housekeeping</i> -Gen. Überspannt die Exon 7–8-Grenze
7 & 8	qRT-PCR-Primer für das <i>Vezatin housekeeping</i> -Gen. Überspannt die Exon 8–9-Grenze
9 & 10	qRT-PCR-Primer zur Amplifikation einer Sequenz der <i>Ypel3</i> -cDNA. Überspannt die Exon 4–5-Grenze
11 & 12	qRT-PCR-Primer zur Amplifikation einer Sequenz der <i>Phf3</i> -cDNA. Überspannt die Exon 3–4-Grenze
13 & 14	qRT-PCR-Primer zur Amplifikation einer Sequenz der <i>Set</i> -cDNA. Überspannt die Exon 3–4-Grenze
15 & 16	Klonierungsprimer zur Amplifikation der CHO- <i>Set</i> -cDNA; Der <i>forward</i> -Primer enthält eine <i>EcoRI</i> -, der <i>reverse</i> -Primer eine <i>BamHI</i> -Schnittstelle
17 & 18	qRT-PCR-Primer zur Amplifikation einer Sequenz der <i>Bad</i> -cDNA. Überspannt die Exon 1–2-Grenze
19 & 20	qRT-PCR-Primer zur Amplifikation einer Sequenz der <i>Lgals1</i> -cDNA. Überspannt die Exon 2–3-Grenze
21 & 22	Amplifikation einer Sequenz aus dem Exon 5 des CHO <i>GluI</i> -Gens zur Detektion von Mutationen
23 & 24	Amplifikation des CMV-MIE-Promotors; <i>reverse</i> -Primer enthält eine <i>HindIII</i> -Restriktionsschnittstelle
25 & 26	Amplifikation der <i>Epo/Darbe</i> -cDNA-Sequenz. Der <i>forward</i> -Primer enthält eine <i>XhoI</i> -, der <i>reverse</i> -Primer eine <i>ApaI</i> -Schnittstelle
27 & 28	Zur Kolonie-PCR und Sequenzierung der Integrate in die ZFN-Vektoren pMLM290 und pMLM292
29 & 30	<i>forward</i> -Primer bindet im CMVMIE-Promotor, <i>reverse</i> -Primer im BGH Polyadenylierungssignal; Kolonie-PCR und Sequenzierung
31 & 32	Zur Mutation der <i>Epo</i> -Sequenz in die <i>Darbe</i> -Sequenz; Am 5'-Ende phosphoryliert
33 & 34	Zur Sequenzierung der MCS von pUC19

Tabelle A.4: Verwendete Oligonukleotidsequenzen zur Erzeugung der verschiedenen shRNA-Expressionsvektoren. Die Minuskeln bilden die kompatiblen Überhänge (*Eco*RI und *Bam*HI) zur Klonierung in den pLVX-shRNA1. Die eigentlichen siRNA-Sequenzen sind für jedes Oligonukleotid im *top*-Strang unterstrichen.

shRNA-Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>Set.1 top</i>	gat <u>ccA TCA GGT TAC AGA ATA GAT TTC AAG AGA ATC TAT TCT GTA ACC TGA TTT TTT g</u>
<i>Set.1 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAT CAG GTT ACA GAA TAG ATT CTC TTG AAA TCT ATT CTG TAA CCT GAT Gg</u>
<i>Set.2 top</i>	gat <u>ccA TGG AAA TCT GGA AAG GAT TTC AAG AGA ATC CTT TCC AGA TTT CCA TTT TTT g</u>
<i>Set.2 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAT GGA AAT CTG GAA AGG ATT CTC TTG AAA TCC TTT CCA GAT TTC CAT g</u>
<i>Set.3 top</i>	gat <u>ccA GAA CAG CAA GAA GCA ATT TTC AAG AGA AAT TGC TTC TTG CTG TTC TTT TTT g</u>
<i>Set.3 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAG AAC AGC AAG AAG CAA TTT CTC TTG AAA ATT GCT TCT TGC TGT TCT g</u>
<i>Set.4 top</i>	gat <u>ccG ATG AAG GTG AAG AAG ATG TTC AAG AGA CAT CTT CTT CAC CTT CAT CTT TTT g</u>
<i>Set.4 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AGA TGA AGG TGA AGA AGA TGT CTC TTG AAC ATC TTC TTC ACC TTC ATC g</u>
<i>Set.SC top</i>	gat <u>ccG ACT GTA AAG CGA TAT AAT TTC AAG AGA ATT ATA TCG CTT TAC AGT CTT TTT g</u>
<i>Set.SC bottom</i>	aat <u>tCA AAA AGA CTG TAA AGC GAT ATA ATT CTC TTG AAA TTA TAT CGC TTT ACA GTC g</u>
<i>Bad.1 top</i>	gat <u>ccG CCC AGA GTA TGT TCC AGA TTT CAA GAG AAT CTG GAA CAT ACT CTG GGT TTT TTg</u>
<i>Bad.1 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAC CCA GAG TAT GTT CCA GAT TCT CTT GAA ATC TGG AAC ATA CTC TGG GCg</u>
<i>Bad.2 top</i>	gat <u>ccG GAA GAC GCT AGT GCT ACA TTC AAG AGA TGT AGC ACT AGC GTC TTC CTT TTT Tg</u>
<i>Bad.2 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAG GAA GAC GCT AGT GCT ACA TCT CTT GAA TGT AGC ACT AGC GTC TTC Cg</u>
<i>Bad.3 top</i>	gat <u>ccG GAT GAG CGA TGA GTT TGA TTC AAG AGA TCA AAC TCA TCG CTC ATC CTT TTT Tg</u>
<i>Bad.3 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAG GAT GAG CGA TGA GTT TGA TCT CTT GAA TCA AAC TCA TCG CTC ATC Cg</u>
<i>Bad.SC top</i>	gat <u>ccG AGG TGC TAG GGT GAT AAT TTC AAG AGA ATT ATC ACC CTA GCA CCT CTT TTT Tg</u>
<i>Bad.SC bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAG AGG TGC TAG GGT GAT AAT TCT CTT GAA ATT ATC ACC CTA GCA CCT Cg</u>
<i>Lgals1.1 top</i>	gat <u>ccG GCG ACT TCA AGA TCA AGT TTC AAG AGA ACT TGA TCT TGA AGT CGC CTT TTT Tg</u>
<i>Lgals1.1 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAG GCG ACT TCA AGA TCA AGT TCT CTT GAA ACT TGA TCT TGA AGT CGC Cg</u>
<i>Lgals1.2 top</i>	gat <u>ccG TCG CAA GCA ACC TGA ATC TTT CAA GAG AAG ATT CAG GTT GCT TGC GAT TTT TTg</u>
<i>Lgals1.2 bottom</i>	aat <u>tCA AAA AAT CGC AAG CAA CCT GAA TCT TCT CTT GAA AGA TTC AGG TTG CTT GCG ACg</u>
<i>Lgals1.SC top</i>	gat <u>ccG ATC GAA GCG TCA ATA CGT TTC AAG AGA ACG TAT TGA CGC TTC GAT CTT TTT Tg</u>

Tabelle A.4: Verwendete Oligonukleotidsequenzen (Forts.).

shRNA-Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>Lgals1.SC bottom</i>	aat tcA AAA AAG ATC GAA GCG TCA ATA CGT TCT CTT GAA ACG TAT TGA CGC TTC GAT Cg
<i>Phf3.1 top</i>	gat ccG <u>TAA GAA GTT TGC GAC AAA</u> TTC AAG AGA TTT GTC GCA AAC TTC TTA CTT TTT Tg
<i>Phf3.1 bottom</i>	aat tcA AAA AAG TAA GAA GTT TGC GAC AAA TCT CTT GAA TTT GTC GCA AAC TTC TTA Cg
<i>Phf3.2 top</i>	gat ccG <u>CCG ACA GAG TGA AAA GCA ATT</u> CAA GAG ATT GCT TTT CAC TCT GTC GGT TTT TTg
<i>Phf3.2 bottom</i>	aat tcA AAA AAC CGA CAG AGT GAA AAG CAA TCT CTT GAA TTG CTT TTC ACT CTG TCG GCg
<i>Phf3.3 top</i>	gat ccG <u>GCA GAA TGT CAT TTG GAA</u> TTC AAG AGA TTC CAA ATG ACA TTC TGC CTT TTT Tg
<i>Phf3.3 bottom</i>	aat tcA AAA AAG GCA GAA TGT CAT TTG GAA TCT CTT GAA TTC CAA ATG ACA TTC TGC Cg
<i>Phf3.SC top</i>	gat ccG <u>TGA ACG TGA CGA ATA TAA</u> TTC AAG AGA TTA TAT TCG TCA CGT TCA CTT TTT Tg
<i>Phf3.SC bottom</i>	aat tcA AAA AAG TGA ACG TGA CGA ATA TAA TCT CTT GAA TTA TAT TCG TCA CGT TCA Cg
<i>Ypel3.1 top</i>	gat ccG <u>GCC TAC TTG GAT GAC TGT</u> TTC AAG AGA ACA GTC ATC CAA GTA GGC CTT TTT Tg
<i>Ypel3.1 bottom</i>	aat tcA AAA AAG GCC TAC TTG GAT GAC TGT TCT CTT GAA ACA GTC ATC CAA GTA GGC Cg
<i>Ypel3.2 top</i>	gat ccA <u>CTC AAC CAC ATG ATC AAA</u> TTC AAG AGA TTT GAT CAT GTG GTT GAG TTT TTT Tg
<i>Ypel3.2 bottm</i>	aat tcA AAA AAA CTC AAC CAC ATG ATC AAA TCT CTT GAA TTT GAT CAT GTG GTT GAG Tg
<i>Ypel3.SC top</i>	gat ccG <u>AAC AAT AAC CCC ATA CTA</u> TTC AAG AGA TAG TAT GGG GTT ATT GTT CTT TTT Tg
<i>Ypel3.SC bottom</i>	aat tcA AAA AAG AAC AAT AAC CCC ATA CTA TCT CTT GAA TAG TAT GGG GTT ATT GTT Cg

A.6 Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AU	<i>absorption unit</i> , dimensionslose Einheit der Absorption
d	<i>day</i> , Tag
Da	Dalton
g	Gramm
h	<i>hour</i> , Stunde
L	Liter
M	Stoffmengenkonzentration [mol/L]
m	mol
min	Minute
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungsfrequenz
s	Sekunde
(I)U	(International) <i>Units</i> , Einheiten
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
×	-fach, Malzeichen
× <i>g</i>	Multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

Sonstige Abkürzungen

ad	auffüllen auf
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAK	<i>BCL2-antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology 3</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary-DNA</i>
Cedex	<i>cell density examination system</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _p	<i>crossing point</i>
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
DARBE	Darbepoetin alfa
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Milli [®] -Q-Wasser

DHFR	Dihydrofolatreduktase
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DSB	Doppelstrangbruch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälber Serum
FUT8	α -(1,6)-Fucosyltransferase
GMD	GDP-Mannose 4,6-dehydratase
GNE	UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosaminkinase
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HR	homologe Rekombination
<i>kd</i>	<i>knockdown</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LGALS1	Galectin-1
MCS	<i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
μ	spezifische Wachstumsrate; Einheitenvorsatz Mikro
miRNA	<i>micro</i> -RNA
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHF3	<i>PHD finger protein 3</i>
PHD	<i>plant homeo-domain</i>
PZT	programmierter Zelltod
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> -PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
shRNA	<i>short hairpin</i> -RNA

siRNA	<i>silencing-RNA</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SPOC	<i>Spn paralog and ortholog C-terminal</i>
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TFS2M	Transkriptionselongationsfaktor S-II
YPEL3	<i>Yippee-like 3-Protein</i>
ZF	Zinkfinger
ZFN	Zinkfinger-Nuklease
ZLE	Zelllinienentwicklung

Danksagungen

Meinen Dank an Herrn Prof. Dr. Thomas Noll könnte ich auf mehreren Seiten ausführen. Ich danke ihm für das große entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, den Bereich *cellular engineering* in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik mit etablieren zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich für die freundliche und hervorragende menschliche Begleitung während meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Andreas Tauch möchte ich dafür danken, dass er die Zweitbegutachtung dieser Arbeit übernommen hat.

Herrn Dr. Raimund Hoffrogge möchte ich für die vielen hilfreichen Gespräche zum Thema Molekularbiologie und den wissenschaftlichen Austausch danken. Eine weitere Sichtweise hat oft geholfen, eine Fragestellung anders anzugehen.

Bei Dr. Heino Büntemeyer bedanke ich mich für die Unterstützung bei allen Computer-Problemen und die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, vor allem bei der Erzeugung und Analytik der EPO/DARBE-Zellen.

Bei Frau Sandra Klausing, M.Sc., möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit in dem Projekt bedanken. Wir haben gemeinsam viel Aufbauen und Erreichen können und ich danke ihr, für die vielen fruchtbaren Diskussionen, aber auch für die Freundschaft seit Beginn unseres Studiums.

Bei Herrn Tim Beckmann, M.Sc., Herrn Benjamin Müller, M.Sc. und Frau Klaudia Kersting, B.Sc. bedanke ich mich für die gute und entspannte Arbeitsatmosphäre in unserem gemeinsamen Büro, aber auch abseits des Arbeitsalltages!

Ein großer Dank geht auch an Frau Anica Lohmeier, M.Sc., für das kritische Lesen dieser Arbeit und für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Diplom-Biotech. Stefan Northoff danke ich für die vielen wissenschaftlichen Gespräche und, das trotz der vollen Terminkalender, auch Zeit für private Diskussionen blieb.

Bei Frau Angela Ehrlich, Frau Olga Fuchs und Frau Heike Quentmeier bedanke ich mich für das Messen zahlreicher Überstände und Zellkulturproben.

Natürlich bedanke ich mich auch bei allen weiteren ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der AG Zellkulturtechnik, sowie der Firmen BIBITEC GmbH und der Teutocell AG. Auch wenn ihr nicht namentlich erwähnt seid, habt ihr dazu beigetragen, dass es drei schöne Jahren waren, die ich nicht missen möchte.

Zu guter Letzt geht mein größter Dank an meine Familie. Ohne eure Unterstützung wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Ich danke euch dafür, dass ihr immer an mich geglaubt und mich in jeder Lebenslage unterstützt habt. Danke, dass ihr da seid!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtliche und sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet. Dies gilt auch für die beige-fügten Zeichnungen oder bildlichen Darstellungen. Diese Arbeit wurde weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Bielefeld, 22. Oktober 2012

Oliver Krämer