

**Durchflußcytometrische Analytik:**  
**Ein Weg zur Optimierung biotechnologischer Prozesse**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

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

genehmigte  
Dissertation

von  
**Dipl.-Chem.**  
**Marco Rieseberg**

geboren am 11.11.1970 in Wolfenbüttel

Hannover 2000

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. Gerlinde Kretzmer

Tag der Promotion: 31.05.2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 1997 bis zum April 2000 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ich möchte ihm besonders für die Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Unterstützung danken.

Frau Priv.-Doz. Dr. Gerlinde Kretzmer danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Allen Mitarbeiter des Institutes für Technische Chemie möchte ich für die gute Atmosphäre und stete Hilfsbereitschaft danken.

Speziell bedanke ich mich bei

Alexander Loa, Georg Renemann, Hung Lam, Petra Dinhof und Ralf Finke für die stete Hilfsbereitschaft, die anregenden Diskussionen und gute Zusammenarbeit,

Susann Arndt für die Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit,

für die Kooperation bei Hefekultivierungen bei Stefan Marose und Eckbert Stärk

Chulaporn Kamrerpetch und Joachim Stehr für die Hilfestellung bei *Pseudomonas*-Kultivierungen

Nagajyothi für die Zusammenarbeit bei der Analytik *Kluyveromyces fragilis*

Jutta für das Korrekturlesen sowie Lennard für die vielfältige Abwechslung beim Schreiben,

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die langjährige Unterstützung, die mir Studium und Promotion erst ermöglichten.

## Abstract

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels durchflußcytometrischer Messungen eine schnelle und selektive Analyse in der Biotechnologie relevanter Parameter ermöglicht. Die gleichzeitige Detektion der Zellzahl, Zellgröße, Zellgrößenverteilung sowie der Vitalität erlaubte es, schnell und mit hohen Probendurchsätzen toxische Eigenschaften von Medienadditiven zu erfassen. Durch Zellzyklusanalysen konnten weiterhin die Einflüsse der Additive auf das Proliferationsverhalten detektiert werden.

Zur Bestimmung der Toxizität von Entschäumern in Tierzellkulturen sowie zur Entwicklung eines biologischen Aktivitätstests für Lactoferrin konnte die durchflußcytometrische Multiparameteranalyse erfolgreich eingesetzt werden.

Die Detektion intrazellulärer Inhaltsstoffe ermöglichte die Bestimmung des intrazellulären Gehaltes von tissue-Plasminogen Activator (t-PA) sowie von beta-Galactosidase. Durch Kombination mit Zellzyklusanalysen konnte eine vorwiegend in der S-Phase stattfindende Expression des rekombinanten Proteins t-PA in CHO-Zellkulturen belegt werden. Eine Senkung der Kultivierungstemperatur auf 31°C zeigt, daß Zellen vermehrt einen hohen S-Phasenanteil aufwiesen, den Zellzyklus aber nicht wie bei 37°C-Kultivierungen abschließen, was zu einer erhöhten t-PA-Produktion führt.

Synchrone Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden durchflußcytometrisch untersucht. Der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs Sytox Green ermöglichte durch seine höhere Fluoreszenzintensität eine verbesserte Zellzyklusanalyse bei Hefen. Durch Vergleich des CO<sub>2</sub>-Produktionsverlaufes und von 2-D-fluoreszenzspektroskopisch gewonnenen Daten mit Zellzyklusanalysen sowie des intrazellulären Protein- und Lipidgehaltes konnten die Zusammenhänge zwischen Stoffwechsel, DNA-Synthese und CO<sub>2</sub>-Produktion näher geklärt werden.

Zur weiteren Automatisierung dieses Analyseverfahrens wurde das Durchflußcytometer mit einem Fließinjektionsanalysensystem kombiniert, was die Möglichkeit bot, mehrere Parameter auch online zu detektieren. An Kultivierungen von *Pseudomonas* und CHO-Zellen wurden online Zellzahl, mittlere Größe und der Vitalitätsverlauf bestimmt.

**Stichworte:** Durchflußcytometrie; Online-Bioprozeßbeobachtung; Toxizitätstests

## Abstract

A fast and selective analysis of parameter relevant in biotechnological processes using flow cytometry was developed. The use of different fluorescent dyes at the same time made it possible to detect several parameters in one sample. The simultaneous determination of cell size, cell count, size distribution and the vitality led to a fast determination of toxic effects of media additives. Furthermore this technique allows to study cell cycle and proliferation of microorganism.

To determine the toxicity of defoaming agents in mammalian cell cultures as well as for the development of a biological activity test for bovine lactoferrin the flow cytometric multiparameter analysis was used successfully. Furthermore the intracellular production of t-PA and beta-galactosidase was detected. By combination with cell cycle analysis a main expression of t-PA in the S-Phase of the investigated CHO-cells has been proved. A decrease of cultivation temperature to 31° C led to an increase of cells in the S-phase of the cell cycle. In comparison to cultivations at 37° C the temperature reduction stops the cell division and fixes the cells in the the S-phase. This led to an increase of the specific t-PA production rate.

The growth of synchronized cultivations of *Saccaromyces cerevisiae* was studied in detail. The use of the DNA-dye Sytox Green improved the yeast cell cycle analysis. The comparison of CO<sub>2</sub>-production rate with data from 2-dimensional spectroscopy and flow cytometry gave a closer insight to relations between yeast metabolism, DNA-synthesis and CO<sub>2</sub>-production.

To get online information of the cultivation the cytometer was modified to measure up to four parameter online. The cytometer was coupled to a flow injection analysis system to perform online process analysis of cell number, vitality as well as cell size and cell size distribution. The continuous measurements of these parameters can be performed within five minutes. Cultivations of *Pseudomonas* and CHO cells served a model for process optimization strategies.

**Key words:** Flow cytometry; bioprocess monitoring; toxicity tests

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	<b>4</b>
2.1 DURCHFLUSSCYTOMETRIE.....	4
2.2 FLUORESZENZ.....	9
2.3 DER ZELLYKLUS.....	9
2.3 VITALITÄT.....	11
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>12</b>
3.1 AUFBAU UND FUNKTIONSWEISE DES COULTER EPICS XL .....	12
3.2 FLUORESZENZFARBSTOFFE.....	14
3.2.1 Propidiumiodid.....	14
3.2.2 Sytox Green.....	14
3.2.3 Nilrot.....	15
3.2.4 Fluoresceinisothiocyanat (FITC).....	16
3.3 ZELLYKLUSMESSUNG .....	16
3.4 BERECHNUNG DER ZELLYKLUSPHASEN.....	18
3.5 VITALITÄTSBESTIMMUNG.....	19
3.6 ZELLZAHLBESTIMMUNG .....	20
3.7 DETEKTION DER MITTLEREN GRÖÖE UND DER GRÖÖENVERTEILUNG .....	21
3.8 DETEKTION DER STOFFWECHSELAKTIVITÄT.....	21
<b>4 ENTWICKLUNG EINER MULTIPARAMETERANALYSE ZUR DETEKTION TOXISCHER EINFLÜSSE VON MEDIUMADDITIVEN</b> .....	<b>23</b>
4.1 ENTWICKLUNG DER MULTIPARAMETERANALYSE.....	24
4.1.1 Entwicklung der durchflußcytometrischen Zellzahlbestimmung.....	24
4.1.2 Entwicklung der durchflußcytometrischen Vitalitätsbestimmung .....	26
4.2 DUCHFLUSSCYTOMETRISCHE TOXIZITÄTSTEST AM BEISPIEL DES CYTOSTATIKUMS CYCLOHEXIMID .....	28
4.2.1 Vitalitätsbestimmung.....	28
4.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	29
4.2.3 Stoffwechselaktivität.....	31
4.2.4 Zellzyklusbestimmung .....	32
4.2.5 Bestimmung des LC50-Wertes .....	33
4.3 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION .....	34
<b>5 TOXIZITÄTSBESTIMMUNG VON ANTISCHAUMMITTELN</b> .....	<b>36</b>
5.1 WIRKUNGSWEISE UND KLASSIFIZIERUNG VON ANTISCHAUMMITTELN.....	36
5.1.1 Silikonhaltige Antischaummittel.....	37
5.1.2 Trübungspunktabhängige Entschäumer.....	37
EO/PO-Blockcopolymerer und Modifikationen.....	37
Polyethylen- und Polypropylenglykole.....	38
Modifizierte Ester und Alkohole.....	39
5.2 BESTIMMUNG DER WIRKSAMEN ANTISCHAUMKONZENTRATION .....	40
5.4 LÖSLICHKEIT UND HANDHABUNG .....	42
5.5 LEBENDZELLZAHLENTWICKLUNG.....	43
5.6 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION .....	44
<b>6 BIOLOGISCHER AKTIVITÄTSTEST VON LACTOFERRIN</b> .....	<b>45</b>
6.1 AUFBAU UND STRUKTUR VON BOVINEM LACTOFERRIN.....	45
6.2 BIOLOGISCHE WIRKUNGSWEISE .....	45
6.3 BIOLOGISCHE AKTIVITÄTSUNTERSUCHUNGEN VON BLF UND BLF-HYDROLYSAT .....	46
6.3.1 Vitalitätsbestimmung.....	47
6.3.2 Zellzahlbestimmung .....	47
6.3.3 Zellzyklusbestimmung .....	49

6.3.4 Bestimmung der NADH-Aktivität .....	51
6.4 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION .....	52
<b>7 DETEKTION DES INTRAZELLULÄREN T-PA-GEHALTES IN TIERZELLKULTUREN.....</b>	<b>54</b>
7.1 STRUKTUR UND BIOLOGISCHE WIRKUNGSWEISE .....	54
7.2 DURCHFLUßCYTOMETRISCHE DETEKTION VON T-PA .....	55
7.3 INTRAZELLULÄRE T-PA-KONZENTRATION BEI 31°C UND 37°C-KULTIVIERUNGEN .....	56
7.4 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION .....	62
<b>8 DURCHFLUßCYTOMETRISCHE DETEKTION INTRAZELLULÄRER ENZYME .....</b>	<b>64</b>
8.1 KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN UND DURCHFLUßCYTOMETRISCHE METHODEN .....	64
8.2 MULTIPARAMETERANALYSE .....	65
8.3 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION .....	69
<b>9 BIOPROZEBBEOBACHTUNG AN SYNCHRONEN HEFEKULTUREN .....</b>	<b>71</b>
9.1 SYNCHRONES WACHSTUM VON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	71
9.2 KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN .....	72
9.3 DETEKTION VON VITALITÄT, LEBENDZELLZAHL UND MITTLERER GRÖßE .....	72
9.4 ZELLZYKLUSBESTIMMUNG AN OSZILLIERENDEN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	75
9.5 KOMBINATION VON DURCHFLUßCYTOMETRIE UND 2-D-FLUORESCENZ-SPEKTROSKOPIE.....	77
9.6 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION .....	81
<b>10. DURCHFLUßCYTOMETRISCHES ONLINE-BIOPROZEBMONITORING .....</b>	<b>82</b>
10.1 AUFBAU DES DURCHFLUßCYTOMETRISCHEN ONLINE-SYSTEMS .....	82
10.2 ONLINE-MESSUNGEN AN <i>PSEUDOMONAS</i> -KULTIVIERUNGEN .....	84
10.3 ONLINE-MESSUNGEN AN KULTIVIERUNGEN VON CHO-ZELLEN .....	85
10.4 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION .....	88
<b>11 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>89</b>
<b>12 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>94</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>99</b>
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	99
ZELLZYKLUSANALYSE MIT SYTOX GREEN .....	101
ZELLZYKLUSANALYSE MIT PROPIDIUMIODID .....	102
HERSTELLUNG ANTI-T-PA-FITC .....	103
DETEKTION DES INTRAZELLULÄREN T-PA-GEHALTES .....	103
MIKROSKOPISCHE VITALITÄTS- UND ZELLZAHLBESTIMMUNG.....	103
DURCHFLUßCYTOMETRISCHE VITALITÄTS- UND ZELLZAHLBESTIMMUNG .....	104
ZELLCOUNTER .....	104
MTT-TEST .....	105
STANDARDANALYTIK .....	105

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Biotechnologie hat im letzten Jahrzehnt stark an Bedeutung gewonnen. Sie ermöglicht durch die technische Anwendung biologischer Prozesse eine gezielte wirtschaftliche Nutzung von Mikroorganismen. Somit sind auch Produkte darstellbar, welche auf anderem Wege nicht oder nur weniger effizient zu produzieren sind.

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung und Optimierung biotechnologischer Prozesse ist eine leistungsfähige Analytik, welche zuverlässig selbst kleinste Änderungen im biologischen System detektieren kann.

Hierbei spielt die Analyse des Zellzustandes bei biotechnologischen Verfahren eine entscheidende Rolle. Die Kenntnis über die Vitalität der Zellen einer Kultur, die intrazelluläre Produktqualität oder die Bestimmung von Zellgrößen liefert wertvolle Hinweise zur Entwicklung und Optimierung.

Diese Arbeit beschäftigt mit der Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten der Durchflußcytometrie, welche durch Streulicht- und Fluoreszenzmessungen in einem Fließsystem Zellinhaltsstoffe und Zellzustände schnell und zuverlässig detektieren kann.

Zu Beginn der 70er Jahre wurden Durchflußcytometer entwickelt und fanden ihre ersten Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, welche auch heute in den Bereichen der Immunologie und Onkologie zu den wichtigsten Aufgabengebieten zählt [Sinn 1997]. In die Biotechnologie hielt diese neue Analysenmethode ihren Einzug in der 80er Jahren [Bailey, 1978; Linz, 1989; Scheper 1985], seitdem sind die Anwendungsmöglichkeiten durch neue Fluoreszenzfarbstoffe, die breite Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper, preisgünstigere Anschaffungskosten und eine leistungsfähigere Datenverarbeitung stark erweitert worden.

Die Optimierung von Zellkulturmedien spielt in der Entwicklung sowie in der laufenden Produktion von pharmazeutisch relevanten Produkten durch Mikroorganismen eine große Rolle. Um die Einflüsse unterschiedlicher Additive, welche das Zellwachstum beeinflussen, zu detektieren, soll mit Hilfe der Durchflußcytometrie ein Verfahren entwickelt werden, um schnell und mit hohem Probendurchsatz, toxische oder proliferationsstimulierende Eigenschaften von Mediumadditiven zu erkennen. Mit Hilfe von Reihenuntersuchungen sollen Bestimmungen der am besten geeigneten Konzentrationen vorgenommen werden.

Als Modell soll das Cytostatikum Cycloheximid dienen, um ein Verfahren zur simultanen Bestimmung von Zellzahl, Zellgröße- und Zellgrößenverteilung und Vitalität zu etablieren. Anschließend soll zur Bestimmung der toxischen Eigenschaften von Antischaummitteln in



der Zellkulturtechnik die durchflußcytometrische Multiparameteranalyse eingesetzt werden, um aus vielen zur Verfügung stehenden Produkten, welche für Tierzellkulturen zur Schaumverminderung eingesetzt werden, die am wenigsten toxische und trotzdem wirkungsvollste Konzentration des geeignetsten Antischaummittels zu bestimmen.

Eine weitere Anwendung der Multiparameteranalyse soll am Protein bovines Lactoferrin erfolgen, welches als Zellkulturadditiv [McKinney 1995], Nahrungsmittelzusatz und Pharmazeutikum [Rejman 1993, Swart 1998] immer mehr an Bedeutung gewinnt. Um die biologische Aktivität des durch verschiedene Verfahren produzierten Proteins zu überprüfen, soll die durchflußcytometrische Multiparameteranalyse eingesetzt werden, um die Produktionschargen bezüglich ihrer Aktivität auf Zellkulturen überprüfen zu können. Weiterhin sollen im Rahmen dieser Analysen zusätzliche Untersuchungen bezüglich der Wirkungsweise von Lactoferrin durchgeführt werden.

Die Aufklärung von Wirkungsmechanismen liefert wichtige Hinweise, wie ein Produktionsprozess optimal gestaltet werden kann. Eine Analytik der Produkte auf intrazellulärer Basis gibt somit wertvolle Aufschlüsse bezüglich des effizientesten Expressionszeitpunktes. Durch die Detektion prozessrelevanter Parameter wie Zellzyklus, Proteingehalt usw. kann somit ein wertvoller Beitrag zur Optimierung geleistet werden. Die Durchflußcytometrie kann hier aufgrund der Vielzahl ihrer Anwendungsmöglichkeiten optimal eingesetzt werden. Am in rekombinanten CHO-Zellen produzierten Pharmazeutikum tissue-Plasminogen-Aktivator (t-PA) sowie am in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzten Enzym  $\beta$ -Galactosidase aus Kultivierungen der Hefe *Kluyveromyces fragilis*, sollen die intrazellulären Produkte detektiert und im Zusammenhang mit weiteren durchflußcytometrisch erhaltenen Zellparametern untersucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt soll in der durchflußcytometrischen Untersuchung von synchronen Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* bestehen. Hier sollen an kontinuierlichen Kulturen prozessrelevante Parameter bestimmt werden, um weiterführende Erkenntnisse über Ablauf der oszillierenden Kulturen zu gewinnen. In diesem Zusammenhang sollen die mit Hilfe der Durchflußcytometrie bestimmten Parameter mit denen der 2-D-Fluoreszenzspektroskopie korreliert werden. Die 2-D-Fluoreszenzspektroskopie ist ein neues Analyseverfahren, welches online Fluoreszenzspektren des gesamten Mediums aufnimmt. In Kombination mit der auf

Messung einzelner Zellen beruhenden Durchflußcytometrie sollen Ergänzungen gefunden werden, welche weiterführende Aufschlüsse über die Zellzustände ermöglichen.

Mit dem zur Verfügung stehenden Cytometer (Coulter Epics XL) erfolgt die Detektion der biologisch relevanten Parameter sowohl manuell als auch offline. Im Produktionsprozess und bei vielen parallel durchgeführten Kultivierungen in Forschung und Entwicklung ist es wünschenswert die prozessrelevanten Daten möglichst schnell und automatisiert zu gewinnen, um schnell einen umfassenden Überblick über die laufende Kultivierung zu erhalten. Hierfür soll eine Modifikation des bestehenden durchflußcytometrischen Meßverfahrens erfolgen, so daß auch online Messungen von Zellzahl, Zellgrößenverteilung und Vitalität ermöglicht werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Durchflußcytometrie

Die Durchflußcytometrie ist ein optisches Analyseverfahren, welches durch Detektion von Streulicht und Fluoreszenzlicht viele Parameter von Mikroorganismen bestimmen kann.

Für die durchflußcytometrische Messung ist ein Verfahren nötig, daß die Zellen den sie detektierenden Lichtstrahl einzeln passieren läßt. Hierfür wird eine Zellsuspension mit Überdruck in einem Hüllstrom aus Pufferlösung in eine Fließzelle gepresst. Durch diese als hydrodynamische Fokussierung bezeichnete Methode, gelangen die Zellen einzeln und hintereinander in eine darauffolgende Kapillare (Abb. 2.1). Diese besitzt an ihrer engsten Stelle einen sehr geringen Durchmesser, an der sie von der orthogonal angeordneten Lichtquelle erfaßt werden können.

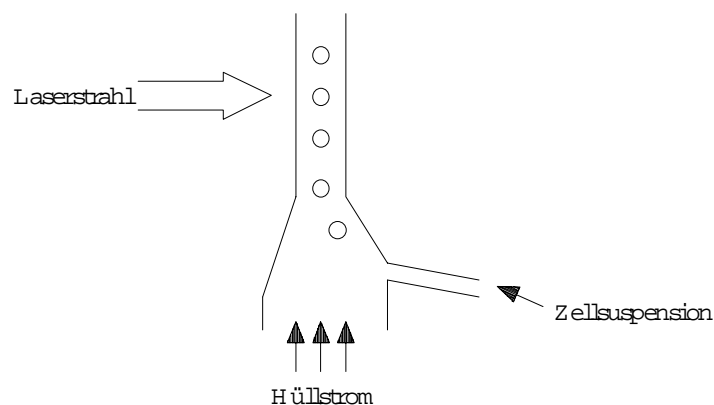


Abb. 2.1 Hydrodynamische Fokussierung

Als Lichtquelle können sowohl Quecksilberlampen als auch Laser eingesetzt werden. Bei dem hier eingesetzten Gerät erfolgt die Detektion mit Hilfe eines Argon-Ionen-Lasers mit einer Emissionswellenlänge von 488 nm. Passiert eine Zelle den in der Kapillare fokussierten Laserstrahl, werden sowohl die Streuung des Laserlichts als auch Fluoreszenzwellenlängen von angeregten Fluoreszenzfarbstoffen durch Photomultiplier erfaßt.

Aus den Streulichtsignalen lassen sich Aussagen über Größe, Größenverteilung und Morphologie der Zellen ableiten. Der als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnete Anteil des

gestreuten Lichtes im Winkel von  $0.5$  bis  $5^\circ$  ist proportional zur Größe der detektierten Zellen. Bei unterschiedlichen Partikeln, z.B. Polystyrolpartikeln zur Kalibration, und Zellen ist allerdings der Brechungsindex von diesen bei Vergleichen zu berücksichtigen. Lichtanteile, welche in einem Winkel von  $15^\circ$  bis  $150^\circ$  abgelenkt werden, bezeichnet man als Seitwärtsstreulicht (SSC). Diese sind nicht ausschließlich von der Größe der Partikel, sondern auch von der inneren Struktur (z.B. Zelleinschlüsse) sowie der Symmetrie der Partikel abhängig [Melamed, 1990].

Abb. 2.2 zeigt eine Messung der beiden Streulichtparameter an Säugerzellen. Durch die zweidimensionale Auftragung sind zwei Populationen mit unterschiedlicher Größe (aus FSC) und Symmetrie (aus SSC) zu erkennen, welche bereits mit diesen Parametern eine grobe Unterscheidung von toten (blau) und lebenden (grün) Zellen ermöglichen. Die eindimensionalen Streulichtparameter sind zur Verdeutlichung einzeln an den Achsen aufgetragen. Dies ermöglicht für weiterführende Untersuchungen durch Fluoreszenzfarbstoffe eine erste Selektion von Subpopulationen und eine Diskriminierung großer Partikelaggregate.

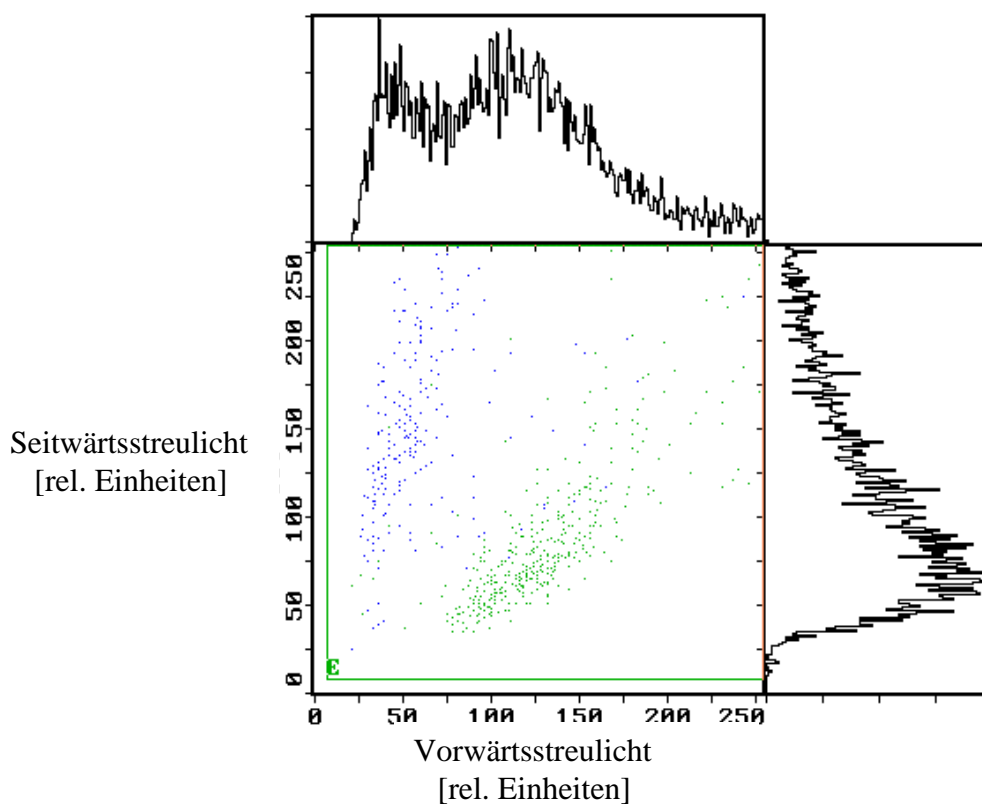


Abb. 2.2: 2D-Plot der Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulichtsignale (SSC) von CHO-Zellen

Die Durchflußcytometrie kann auch für Fluoreszenzmessungen einzelner Zellen herangezogen werden. Hierfür werden einzelne Zellinhaltsstoffe (z.B. DNA, RNA, Speicherstoffe) selektiv mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß die Fluoreszenz der Konzentration der Zellinhaltsstoffe proportional ist. Die gefärbten Zellen passieren den Laserstrahl und emittieren bei geeigneter Anregungswellenlänge Fluoreszenzlicht. Durch geeignete Kombinationen von Band- und Langpassfiltern wird das emittierte Licht in verschiedene Bereiche des sichtbaren Lichtes aufgespalten und von jeweils einem Photomultiplier detektiert.

Stehen wie beim Epics XL drei Detektoren zur Verfügung, können bis zu drei Farbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren gleichzeitig in nur einer Probe bestimmt werden. Überlappungen in den Emissionsspektren der Farbstoffe können softwareseitig kompensiert werden. In den Photomultipliern wird das Licht in hierzu proportionale Spannungssignale umgesetzt, welche sowohl über die Peakhöhe als auch die Peakfläche ausgewertet werden können.

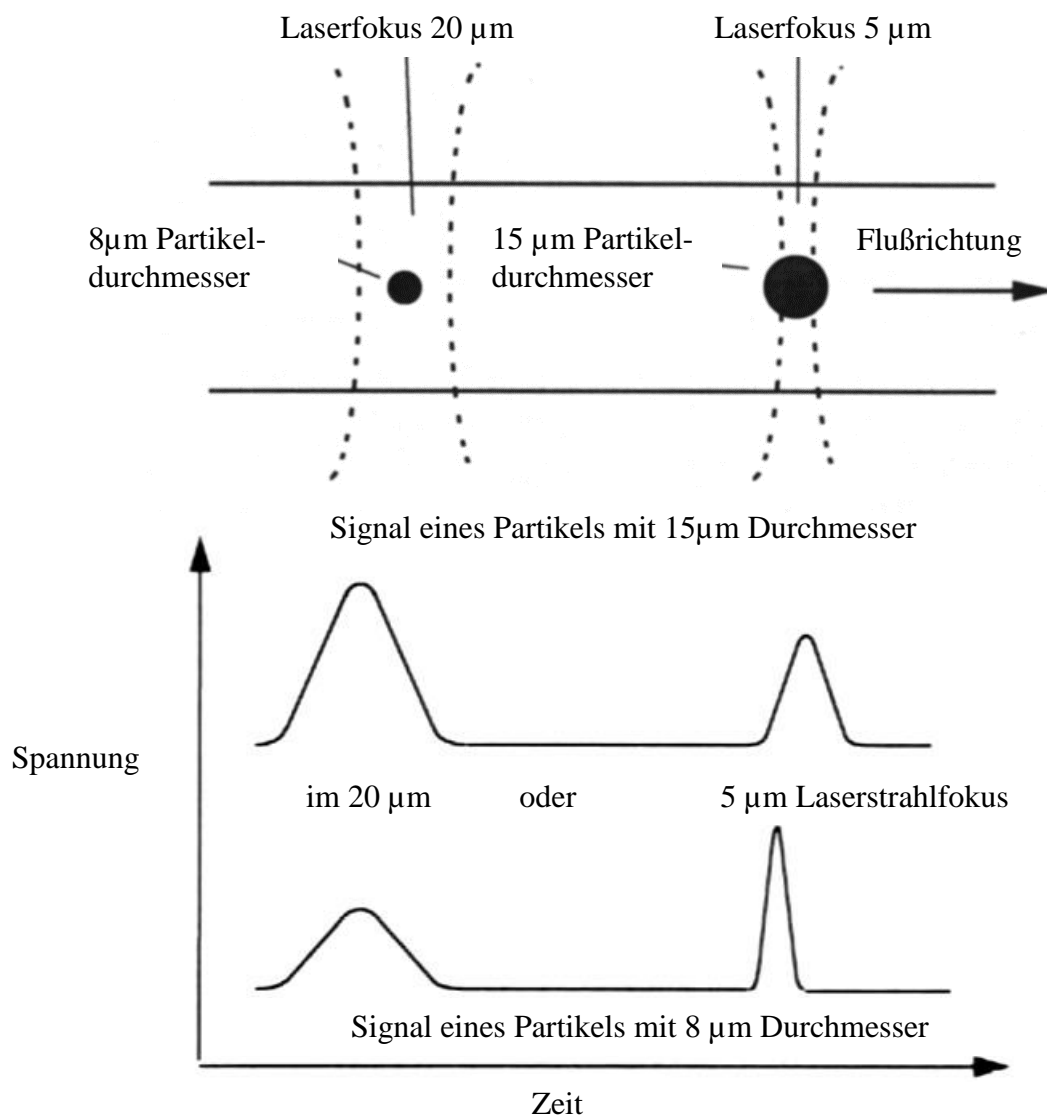


Abb. 2.3 Vergleich der Signale von Partikeln in einem größeren oder kleineren Laserfokus [Shapiro, 1995]

Die erhaltenen Signale sind weiterhin von Fokus der Lichtquelle und der Partikelgröße abhängig. Abb. 2.3 zeigt den Peakverlauf von zwei Partikeln beim Passieren eines Lichtstrahls mit größeren und kleineren Fokus. Beim Durchtritt durch den auf 20 µm fokussierten Strahl ergibt sich eine zum Partikeldurchmesser proportionale Änderung der Peakhöhe. Ist der Laserfokus geringer als der Partikeldurchmesser werden die Partikel nicht vollständig vom Lichtstrahl abgedeckt. Hier ist eine Peakhöhenabhängigkeit von der Partikelgröße nicht mehr gegeben. Weiterhin erfolgt eine Verkürzung des Signals aufgrund des kürzeren Erfassungszeitraums durch den Lichtstrahl [Shapiro, 1995].

Ist der Laserfokus größer als der Zelldurchmesser bedeutet dies für die Detektion intrazellulärer Fluoreszenzfarbstoffe, daß eine Verkleinerung des Zelldurchmessers trotz identischer Volumenkonzentration an Farbstoff zu einer Reduktion der Peakhöhe führt. Somit wird hier die absolute Farbstoffkonzentration bestimmt.

In der Regel erfolgt eine Auswertung über die Peakhöhe, welche beim hier eingesetzten Cytometer der absoluten Fluoreszenzfarbstoffkonzentration je Zelle entspricht. Eine Auswertung des Peakintegrals findet Anwendung in der Dublettendiskriminierung (siehe Kap. 3.3).

Tab. 2.1 zeigt eine Übersicht von durchflußcytometrisch detektierbaren Parametern. Durch die leistungsfähige Computertechnik ist es heute leicht möglich große Datenmengen in kurzer

Tab. 2.1: Eine Auswahl durchflußcytometrisch detektierbarer Parameter

<b>Parameter</b>	<b>Messmethode/Farbstoff</b>
Zellgröße	Lichtstreuung, kleine Winkel, FSC
Granularität	Lichtstreuung, große Winkel, SSC
DNA-Gehalt	Fluoreszenzmessung; z.B. Propidiumiodid
RNA-Gehalt	Fluoreszenzmessung; z.B. Sytox Green
Gesamtprotein	Fluoreszenzmessung; z.B. FITC
Lipide	Fluoreszenzmessung; z.B. Nilrot
Antigene	Fluoreszenzfarbstoff-gelabelte Antikörper
Apoptose	Fluoreszenzfarbstoff-gelabelte Antikörper
Enzymaktivität	Fluoreszenzfarbstoff-gelabelte Substrate
DNA-Syntheserate	FITC-gelabelte Anti-BrdU-Antikörper
Membranpermeabilität (Vitalität)	FSC oder Fluoreszenzmessung

Zeit zu verarbeiten, so daß Routinemessungen von bis zu 50.000 Zellen/Probe mit sechs Meßparametern und einer Geschwindigkeit von bis zu 4000 Zellen pro Sekunde ermöglicht werden. Aufgrund der großen Anzahl detektierbarer Zellen pro Probe kann somit schnell ein Überblick über den Status einer Population bzw. von Subpopulationen einer Kultivierung gewonnen werden. Durch Zusatz von spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen und/oder mit Fluorophoren markierter Antikörper können für jede einzelne Zelle durch die Emission von Fluoreszenzlicht viele für biotechnologische Prozesse relevante Parameter (z.B. DNA/RNA-Gehalt, Apoptose, Vitalität, Oberflächenantigene, intrazelluläre Proteine) detektiert werden [Shapiro 1995].

Den vielen Vorteilen der Durchflußcytometrie wie der schnellen Messung von vielen Zellen in einer Probe und der breiten Auswahl an detektierbaren Parametern steht gegenüber, daß bei stark aggregierenden Mikroorganismen eine Einzelzellsuspension erzeugt werden muß. Dies bedeutet einen erhöhten Zeitaufwand und kann durch Toxizität der eingesetzten Chemikalien die Messung beeinflussen. Weiterhin ist bei Größenmessungen der unterschiedliche Brechungsindex der Kalibrationspartikel und der Zellen zu berücksichtigen. Tab. 2.2 gibt einen Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten und die Einschränkungen bei durchflußcytometrischen Messungen.

Tab. 2.2: Übersicht der Vor- und Nachteile der Durchflußcytometrie

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detektion vieler Zellen (bis 100.000) möglich, statistisch zuverlässig</li> <li>• schnelle Messung, bis 4000 Zellen/min</li> <li>• mehrere Parameter gleichzeitig detektierbar</li> <li>• große Auswahl der Meßparameter durch Auswahl der geeigneten Farbstoffe</li> <li>• Messung des Zustandes jeder einzelnen Zelle möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einzelzellsuspension (überwiegend) für die Messung erforderlich</li> <li>• bei einigen Parametern lange Proben-vorbereitung</li> <li>• keine online-Analytik ohne weiterführende Modifikationen möglich</li> <li>• Größenmessung der Zellen durch den Brechungsindex beeinflusst</li> </ul>

## 2.2 Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die Lichtemission von Molekülen, die durch Adsorption von Licht angeregt werden. Im Gegensatz zur Phosphoreszenz tritt sie nur solange auf, wie die Moleküle angeregt werden. Besonders häufig ist Fluoreszenz bei Verbindungen zu beobachten, welche leicht anregbare  $\pi$ -Elektronen in konjugierten Doppelbindungen besitzen. Durch Adsorption elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten oder sichtbaren Bereich werden sie innerhalb von  $10^{-15}$  s in einen elektronisch angeregten, energiereichen Schwingungszustand überführt. Hiernach erfolgt durch innere Umwandlung (Rotations- und Schwingungsübergänge) unter Temperatúrausgleich mit der Umgebung der strahlungslose Übergang zum ersten angeregten Singulettzustand. Als Fluoreszenz bezeichnet man den hierauf folgenden Vorgang, indem beim Übergang zum Grundzustand ein Photon emittiert wird. Dies erfolgt innerhalb von  $10^{-8}$  s [Wedler, 1987]. Dies ist der Grund dafür, daß die Fluoreszenzwellenlänge immer länger (energieärmer) als die Anregungswellenlänge ist. Alternativ zur Fluoreszenz kann eine strahlungslose Energieübertragung zur Desaktivierung des Moleküls zum Grundzustand führen. Erfolgt ein strahlungsloser Energietransfer zu einem anderen Molekül, wird dieser Prozeß als Fluoreszenzquenching bezeichnet.

## 2.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt den grundlegenden Prozess der Zellteilung (Mitose), wie er bei allen Zellen von Bakterien bis zu komplexen Organismen wie Säugetieren gefunden werden kann (Abb. 2.4). Es handelt sich um einen Kreisprozess, welcher aus der ersten Synthese für die Zellteilung benötigter Proteine über die DNA-Duplikation bis zur endgültigen Teilung in zwei Zellen mit eigenen Zellkernen verläuft [Fantes, 1993]. Der gesamte Zellzyklus beschreibt somit die Dauer zwischen zwei Mitosen. Die Dauer des in fünf verschiedene Phasen eingeteilten Zellzyklusses beträgt bei der Mehrzahl der tierischen und pflanzlichen Organismen zwischen 40 Minuten bei Einzellern und 30 Stunden bei komplexen Säugerzellen.

Während der G<sub>0</sub>-Phase (G=Gap=Lücke) befindet sich die Zelle in einem Ruhezustand außerhalb des Teilungszyklusses. Durch mehrere Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren, hohes Nährstoffangebot, Hormone u.a. kann eine Zelle in die erste Phase des Zellzyklusses eintreten (G<sub>1</sub>). Hier werden für die Zellteilung benötigte Proteine wie DNA-Polymerasen gebildet.



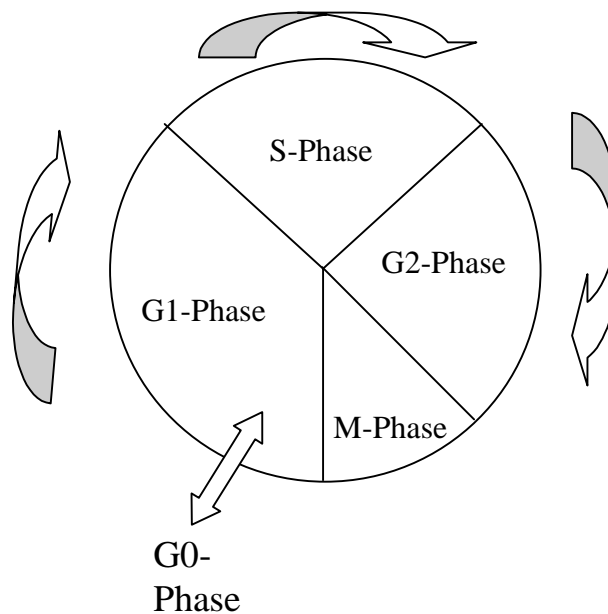


Abb. 2.4: Die einzelnen Phasen des Zellzyklusses

Bis zum Ende der G1-Phase ist der Eintritt in den Zellzyklus ein reversibler Prozess, die Zelle kann die begonnene Zellteilung noch abbrechen. Wird der als Restriktionspunkt beschriebene Zeitpunkt, welcher sich am Ende der G1-Phase befindet, überschritten, muß die Zelle die begonnene Teilung fortsetzen.

Während der anschließenden Synthese-Phase (S-Phase), findet die Duplikation der DNA statt, welche bei einer Säugerzelle ca. acht Stunden in Anspruch nimmt. Hier erfolgt nach dem Öffnen der Doppelhelix eine gleichzeitige Synthese der DNA-Stränge. Nach Beenden der DNA-Synthese folgt eine weitere Gap-Phase (G2), in welcher wichtige Proteine für die endgültige Teilung gebildet werden. Während dieser Phase erfolgt bereits eine Kondensation des Chromatins und eine Ausweitung der Zellgröße [Melamed, 1991].

In der abschließenden Mitose-Phase (M-Phase) vollzieht sich die eigentliche Teilung der Zelle. Hier wird die Kernmembran aufgelöst und die Chromosomen in Metaphaseebene angeordnet. Jetzt erfolgt eine Verteilung der DNA über die Spindelfasern zu den Polen der Zelle. Die Zellteilung gilt als abgeschlossen, wenn sich die Kernmembranen neu gebildet und sich die Tochterzellen getrennt haben. Viele in der Biotechnologie zur Produktion rekombinanter Produkte eingesetzte Zelllinien gehen durch die optimierten Bedingungen direkt nach der M-Phase weiter in die G1-Phase zur nächsten Teilung über.

## 2.3 Vitalität

Die Vitalität einer Zellkultur wird bestimmt durch das Verhältnis der Zahl lebender Zellen zur Gesamtzellzahl.

$$\text{Zellvitalität} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Lebendzellzahl} + \text{Totzellzahl}} \quad \text{Formel 2.1}$$

Die Bestimmung der Vitalität ist von großer Bedeutung in der Bioanalytik. Sie ermöglicht die Bestimmung des biologisch aktiven und somit produktiven Anteils einer Zellkultur. Die Vitalität und deren Detektion kann in mehreren Stadien eingeteilt werden, Tab. 2.3 gibt eine Übersicht.

Tab. 2.3 Unterschiedliche Stadien der Vitalität und ihre Detektionsmethoden

Physiologischer Status	Intakte Zellen			Tote Zellen
	metabolisch aktiv		inaktiv	
	reproduktiv			
Kriterien	Zellteilung	metabolisch aktiv	Membranintegrität	Membranintegrität
Bestimmungsmethode	Zellzählung Zellzyklusmessung BrdU-Aufnahme	Enzymaktivität Membranpotential	selektive Membranpermeabilität	Aufnahme von Cytoplasma oder DNA-Farbstoffen

Die Detektion toter Zellen kann durchflußcytometrisch schnell und zuverlässig mit Hilfe von DNA-Farbstoffen (Propidiumiodid, Sytox Green) durchgeführt werden. Die Markierung toter Zellen beruht auf einer Einschleusung der Farbstoffe durch defekte Zellmembranen toter Zellen. Der biologisch aktiv proliferierende Anteil der Kultur kann sowohl durch Bestimmung der S- und G2/M-Phase bei einer Zellzyklusanalyse als auch mit Zeitverzögerung durch Zellzählung erfolgen. Für die Bestimmung inaktiver, aber (noch) nicht toter Zellen, stehen Fluoreszenzfarbstoffe zur Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivität als auch des Membranpotentials zur Verfügung.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Aufbau und Funktionsweise des Coulter Epics XL

Für die Messungen stand ein Durchflußcytometer von Typ Epics XL der Firma Coulter zur Verfügung (Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Coulter Epics XL

Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die Geräteeigenschaften.

Tab. 3.1 Geräteeigenschaften des Coulter Epics XL

Lichtquelle	Argon-Ionen-Laser, 15 mW
hydrodynamische Fokussierung	Überdruck
Meßzelle	250 µm Kapillare
Laserfokussierung	10 x 80 µm
Fluoreszenzdetektoren	3
Datenübertragung Cytometer-Computer	Lichtleiter
Auswertungssoftware	System II Software, Version 3.0

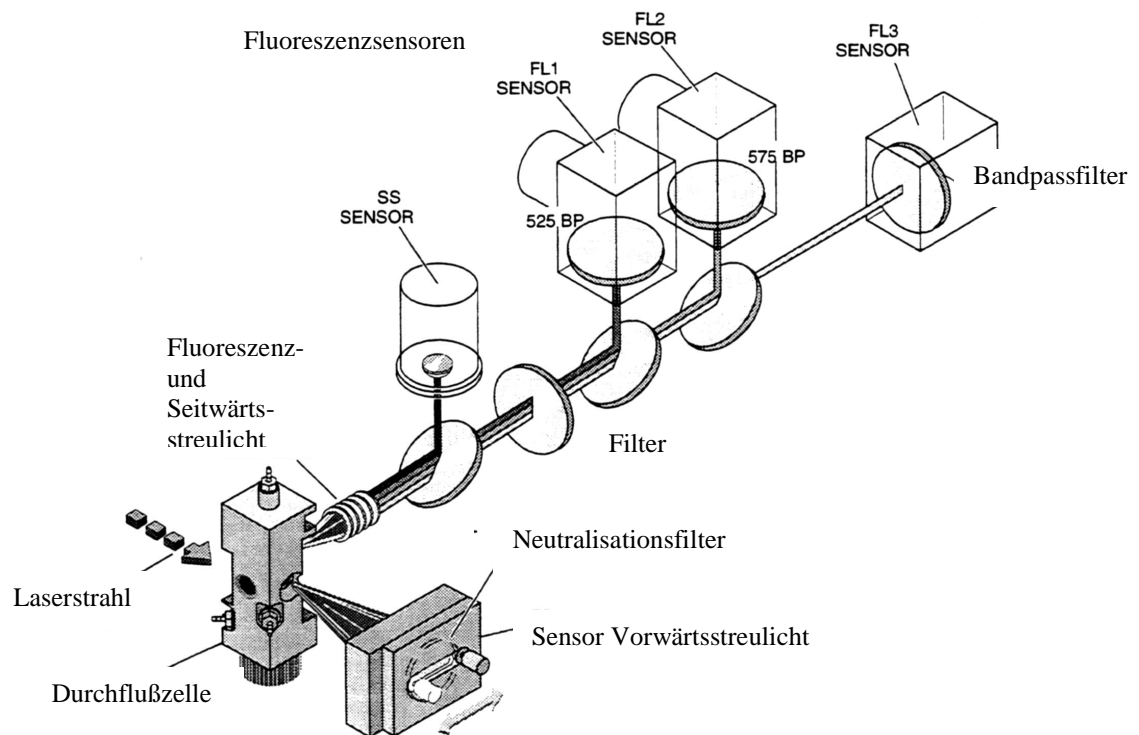


Abb. 3.2 Optisches System des Coulter Epics XL (Coulter, 1996)

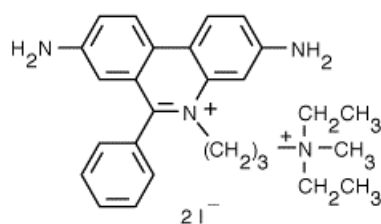
Im optischen System des Cytometers wird die Ablenkung des Laserstrahls in kleinen Winkeln (Vorwärtsstreulicht) hinter der Durchflußzelle detektiert (Abb. 3.2). Es steht ein Neutralisationsfilter zur Verfügung, welches die Detektion von großen Partikeln (über  $30\ \mu\text{m}$ ) ermöglicht. Im rechten Winkel zur Durchflußzelle befindet sich der Seitwärtsstreulichtdetektor sowie die Fluoreszenzdetektoren. Durch Langpassfilter werden die einzelnen Wellenlängen entkoppelt. Der Epics XL besitzt drei Fluoreszenzdetektoren, welche die simultane Bestimmung von bis zu drei Farbstoffen je Probe ermöglichen. Durch austauschbare Filter können die detektierten Wellenlängen den eingesetzten Farbstoffkombinationen optimal angepaßt werden. In der Standardkonfiguration werden neben dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht die Fluoreszenzwellenlängen bei 520, 560 und 590 nm detektiert. Die Selektion erfolgt über Bandpassfilter, welche jeweils das Fluoreszenzlicht um 15 nm um den angegebenen Wellenlängenbereich passieren lassen. Die durch die Photomultiplier detektierten Spannungsänderungen werden durch die Steuerungs- und Auswertungssoftware im PC weiterverarbeitet. Zur Beschleunigung des Datentransfers werden Glasfaserleitungen zwischen Cytometer und Computer eingesetzt.

## 3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

### 3.2.1 Propidiumiodid

Der rote Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (Phenanthridinium-3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonium)propyl]-6-phenyl-diiodid), löst sich gut in Wasser und kann somit sehr gut zu Zellsuspensionen dosiert werden. Die lichtempfindliche Lösung ist bei 4°C mindestens vier Wochen haltbar [Molecular Probes, 1996]. Propidiumiodid (PI) ist ein Ausschlußfarbstoff, der durch defekte Membranen toter Zellen eindringen kann und in doppelsträngige DNA/RNA interkaliert, in der er AT-spezifisch bindet. Durch die Reaktion mit Nukleinsäuren erfolgt weiterhin eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität [Sinn, 1997]. Lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran dagegen sind in der Lage, den Fluoreszenzfarbstoff auszuschließen. Aus diesem Grund kann PI zur Vitalitätsbestimmung eingesetzt werden (vgl. Kap. 3.4). Weiterhin findet er seine Anwendung bei RNA-Messungen und Zellzyklusanalysen (siehe Kap. 3.3).

Der aufgrund seiner leichten Wasserlöslichkeit und geringen Kosten in der Durchflußcytometrie weit verbreitete Farbstoff kann mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt werden und emittiert im roten Bereich mit einem Maximum von 580 nm (siehe auch Abb. 3.2). Wie bei allen DNA-interkalierenden Farbstoffen ist er hoch carcinogen, so daß auf ausreichende Sicherheitsmaßnahmen zu achten ist [Al-Rubeai, 1997; Ormerod, 1990].



Formel 3.1: Struktur von Propidiumiodid

### 3.2.2 Sytox Green

Bei dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Sytox Green handelt es sich ebenso wie Propidiumiodid um einen mit Nukleinsäuren reagierenden Farbstoff, welcher in wäßriger Lösung eingesetzt werden kann. Er kann mit allen Basen der DNA oder RNA reagieren, was zusammen mit seiner höheren Quantenausbeute im Gegensatz zum AT-spezifischen Propidiumiodid zu präziseren Resultaten führt. [Molecular Probes, 1999]. Vor allem bei Spezies mit

vergleichsweise geringen DNA-Menge wie Hefen oder Bakterien ist dies von hohem Wert. Sytox Green ist wie PI bei 488 nm anregbar und emittiert Fluoreszenzlicht im grünen Bereich von 525 nm (Abb. 3.2). Hierdurch eröffnen sich zusätzliche Einsatzfelder in Kombination mit Farbstoffen anderer Emissionswellenlängen zur Multiparameteranalyse [Roth, 1997].

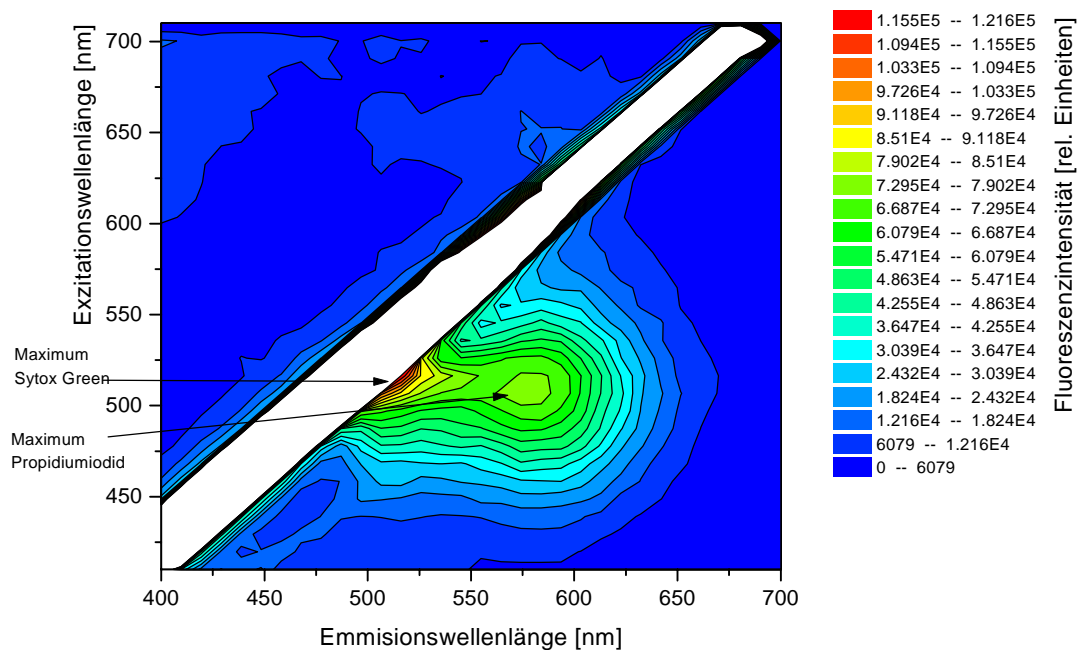
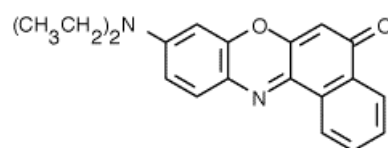


Abb. 3.2: 2D-Fluoreszenzspektrum von Sytox Green und Propidiumiodid gefärbten *Saccharomyces cerevisiae*

### 3.2.3 Nilrot

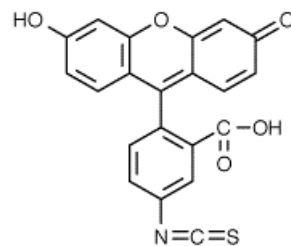
Der Farbstoff Nilrot ist ein fast wasserunlöslicher Farbstoff, welcher zur Färbung intrazellulärer Lipide eingesetzt wird. Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften muß zuerst eine Lösung von Nilrot in Aceton erfolgen (1 mg Nilrot/ml). Die Endkonzentration in der zu detektierten Zellsuspension beträgt 50 µg/ml. Nach einer Inkubationszeit von 30 min kann eine durchflußcytometrische Messung bei 610 nm erfolgen [Degelau, 1993].



Formel 3.2:  
Struktur von  
Nilrot

### 3.2.4 Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Der weit verbreitete Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) besitzt eine große Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten aufgrund seiner Fähigkeit mit Aminogruppen von Proteinen zu reagieren. Neben der Gesamtproteinbestimmung gehört er zu den Standardfarbstoffen bei Multiparameteranalysen mit mehreren gelabelten Antikörpern. Der Fluoreszenzwellenlängenbereich von 520 nm wird meist mit FITC-gekoppelten Antikörper abgedeckt (siehe auch Kap. 7). Auch die Kopplung an Enzymsubstrate gewinnt zunehmend an Bedeutung (s.a. Kap. 6, Reaktion von FDG mit  $\beta$ -Galactosidase). Zur Gesamtproteinbestimmung wird eine Endkonzentration von 50  $\mu$ g FITC/ml Zellsuspension eingesetzt [Freeman, 1975]. Bei Hefen ist eine vorherige Permeabilisierung nötig. Die durchflußcytometrische Detektion erfolgt im Bereich von 520 nm.



Formel 3.3:  
Struktur von  
FITC

### 3.3 Zellzyklusmessung

Für die durchflußcytometrische Messung der DNA ist eine vollständige Färbung der DNA mit einem spezifischen Fluorophor nötig. Der DNA-Gehalt aller Zellen in der G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase ist identisch, erst in der S-Phase erfolgt eine weitere Produktion. Dies ist in Zellen bei einer Zellzyklusmessung als erster scharfer Peak zu erkennen (Abb. 3.3, G<sub>1</sub>-Phase), welcher z.B. bei humanen Zellen den diploiden Chromosomensatz anzeigt. Die während der S-Phase synthetisierte DNA erhöht kontinuierlich die Gesamtmenge, so daß ein stärkeres Fluoreszenzsignal detektierbar ist (Abb. 3.3, S-Phase). Ist die DNA-Synthese abgeschlossen, wird ein doppelt so hohes Fluoreszenzsignal von Zellen der G<sub>2</sub>- oder M-Phase mit doppeltem Chromosomensatz erkennbar. Eine Auftrennung der G<sub>2</sub>- und M-Phase ist durch DNA-interkalierende Farbstoffe nicht möglich, kann aber durch geeignete fluorochrom-gelabelte Antikörper erkannt werden (Abb. 3.3, G<sub>2</sub>M-Phase, rechter Peak).

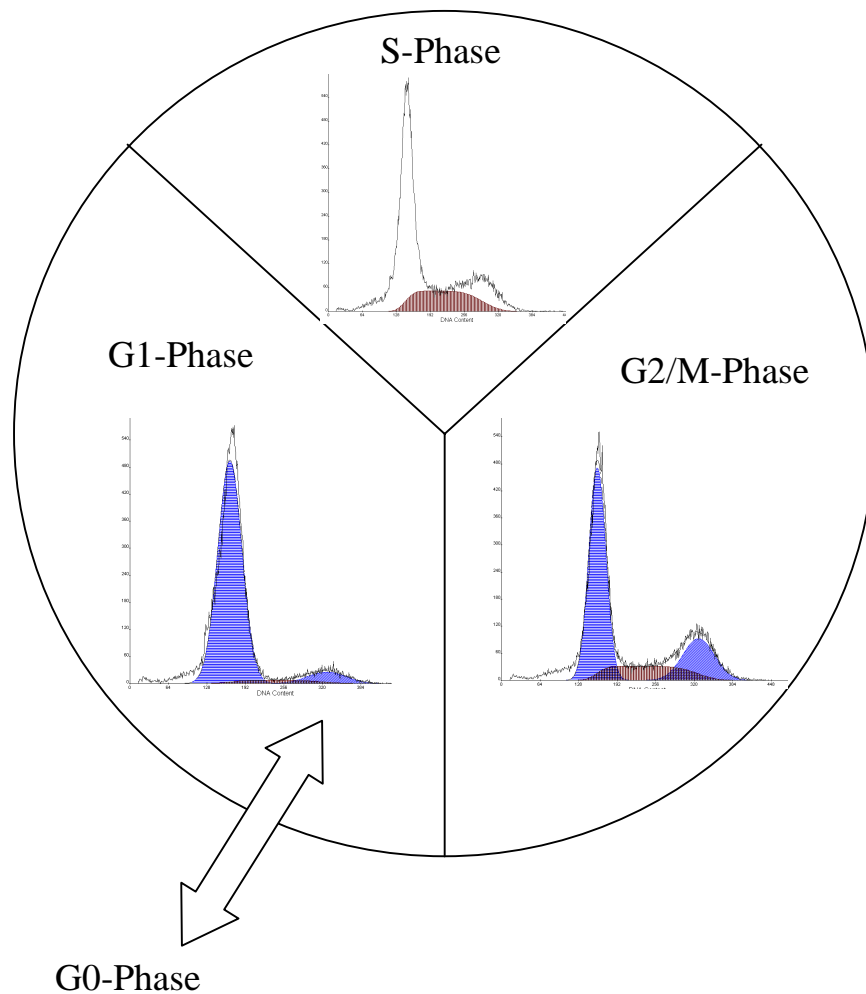


Abb. 3.3: DNA-Histogramme in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus

Zur Zellzyklusmessung ist es erforderlich, zum Eindringen des Farbstoffes in die Zelle die Zellmembran zu durch Tween 20-Lösung zu permeabilisieren. Weiterhin ist zur Zerstörung der RNA der Zusatz von RNase erforderlich, da die Fluorophore wie Propidiumiodid auch an diese binden würden. Abb. 3.4 zeigt einen typischen Verlauf einer Zellzyklusmessung. Aus dem 2D-Plot der Streulichtsignale werden die Signale am äußeren Rand, welche Debris und größere Aggregate enthalten, für die weitere Auswertung diskriminiert. Die rechte obere Darstellung zeigt eine Auftragung nach Peakhöhe (FL1) und Peakfläche (AUX-FL1) der ausgewerteten Signale. Durch die Einbeziehung der Peakfläche können nun auch Dubletten und weitere kleinere Zellaggregate von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden. Das untere Histogramm zeigt die lineare Auftragung des DNA-Gehaltes (FL1) der Zellen als Häufigkeitsverteilung, welche von der Zellzyklussoftware (Wincycle, Phoenix Flow Systems) weiterbearbeitet werden kann.



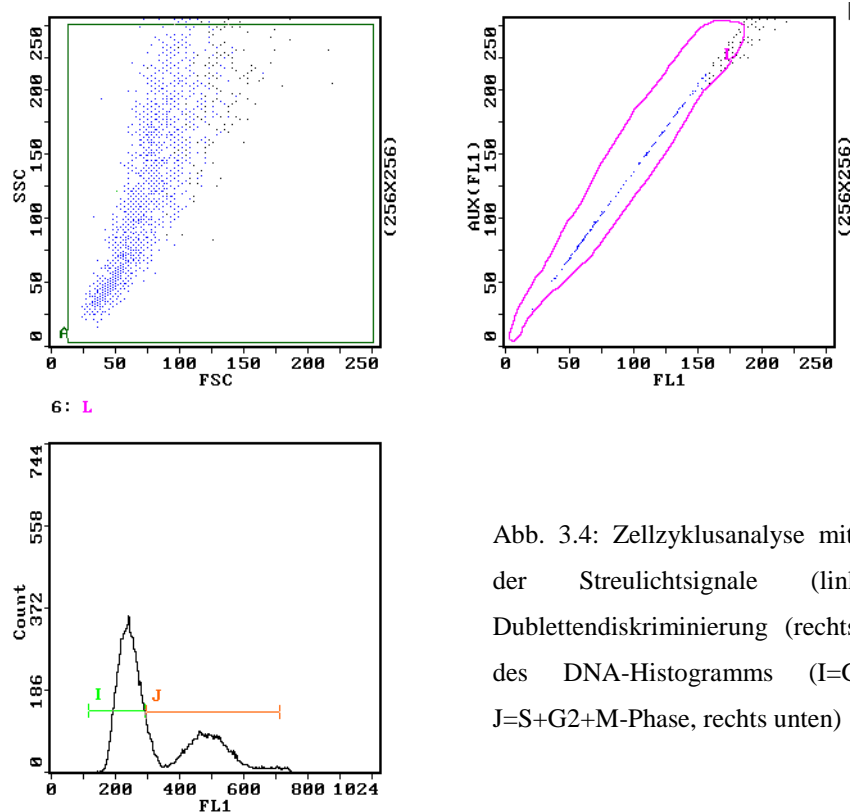


Abb. 3.4: Zellzyklusanalyse mit Darstellung der Streulichtsignale (links oben), Dublettendiskriminierung (rechts oben) und des DNA-Histogramms (I=G0/G1-Phase, J=S+G2+M-Phase, rechts unten)

### 3.4 Berechnung der Zellzyklusphasen

Die mit Hilfe des Durchflußcytometers erhaltenen Histogramme zeigen die Verteilung der Zellzyklusstadien aller einzelnen Zellen einer Probe auf. In den linearen Histogrammen, welche sich aus allen detektierten Zellen zusammensetzen (siehe auch Abb. 3.4), sind die Größe des DNA-Fluoreszenzsignals (X-Achse) gegen die Anzahl der gemessenen Teilchen pro Intensitätsklasse (Y-Achse) aufgetragen [Friedlander, 1993].

Da sich die Peaks der einzelnen Phase überlappen, muß mit Hilfe mathematischer Programme (Wincycle, Phoenix Flow Systems) eine genauere Auswertung erfolgen, wie die prozentuale Zusammensetzung der Zellzyklusphasen in einer Kultur ist. Auch chromosomale Abberationen, z.B. bei Tumorzellen, können so zuverlässig erkannt werden.

Die Berechnung beruht auf dem Modell von Dean und Jett, welcher den einzelnen Phasen des Zellzyklusses eine Gauß-Verteilung (Gl. 3.1) zugrunde legt.

$$y = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

$\mu$  = Mittelwert       $\sigma^2$  = Varianz       $y$  = Häufigkeitsverteilung

Der S-Phase wird ein Modell nullter Ordnung zugrunde gelegt ( $y = a$ ). Die G1- und G2-Phasenpeaks entsprechen in ihrer Basisfunktion oft nicht der Gauß-Verteilung, da sie schief sind oder Schultern haben. Sie werden mit Hilfe einer statistischen Funktion nach Marquardt angepaßt (Gl. 3.2).

$$\chi_v^2 = \frac{\sum \frac{(yfit_i - ydata_i)^2}{\sigma_i^2}}{\text{Anzahl der Freiheitsgrade}} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

$\chi_v^2$  = korrigierte Häufigkeitsverteilung     $yfit_i$  = Regressionswert     $ydata_i$  = Mittelwert

Der Marquardt-Algorithmus ermöglicht es, Abweichungen der G0/G1- und G2/M-Phasenpeaks von der Gauß-Verteilung in die Berechnung einzubeziehen [Rabinovitch, 1995].

### 3.5 Vitalitätsbestimmung

Die etablierte Methode der Trypan-Blau-Bestimmung dient der Ermittlung der Zellvitalität als Vergleich zur Vitalitätsbestimmung mit Hilfe des Durchflußcytometers. Dabei können durch Anfärben mit dem Ausschlußfarbstoff Trypan-Blau (0,4% in wäßriger Kochsalzlösung, Sigma) tote Zellen mit einer defekten Zellmembran von lebenden Zellen unterschieden werden (siehe Anhang).

Für die durchflußcytometrische Bestimmung der Vitalität wird als Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) (Molecular Probes) verwendet, welches durch einen Argonlaser (Wellenlänge 488 nm) angeregt werden kann. Der Fluoreszenzfarbstoff färbt nur die DNA der toten Zellen an, da in lebenden Zellen mit einer intakten Zellmembran Propidiumiodid nicht

eindringen kann. Aufgrund der Eigenfluoreszenz der Zellen erhält man Peaks sowohl lebender als auch toter Zellen (Abb. 3.5). Die Eigenfluoreszenz der Zellen entsteht durch Fluorophore, wie Proteine und NADH im Zellplasma und Zellkern. Der Doppelpeak der toten Zellen entsteht durch eine vollständige Färbung der DNA toter Zellen und der Detektion der einfachen und doppelten Chromosomensätze, was einer Zellzyklusanalyse entspricht. Durch die hohe Anzahl der detektierbaren Zellen ist eine statisch sichere Vitalitätsbestimmung möglich.

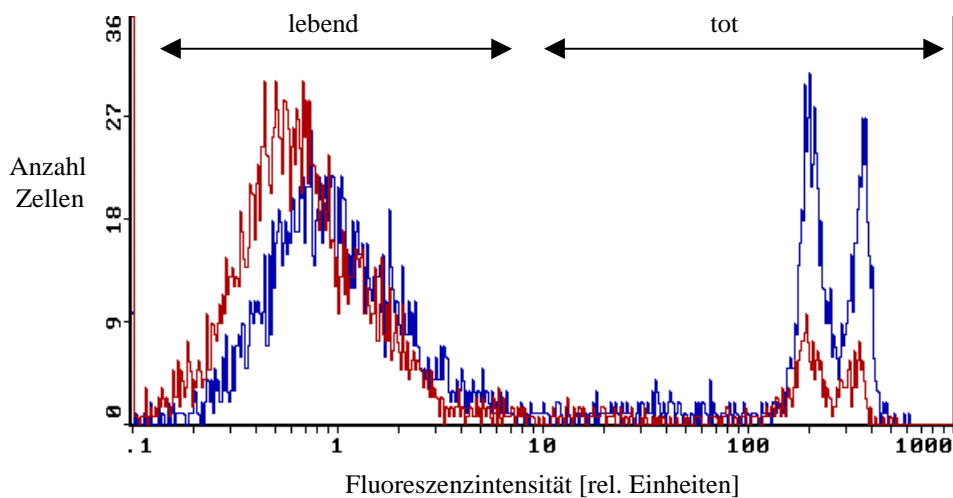


Abb. 3.5 Histogramm einer durchflußcytometrischen Vitalitätsbestimmung an CHO-Zellen mit einer hohen (rot) und geringen Vitalität (blau)

### 3.6 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung werden drei verschiedene Konzentrationen von Polystyrolpartikeln (Polysciences) als Standard detektiert. Diese werden vorher mikroskopisch bestimmt. Es erfolgt jeweils eine Dreifachbestimmung der einzelnen Proben über einen Zeitraum von 20 s. Die in dieser Zeitspanne erhaltene Partikelzahl wird in Relation zur Partikelkonzentration der Probe gesetzt. Nun können mit Hilfe dieser Kalibration Proben unbekannter Konzentrationen bestimmt werden.

### 3.7 Detektion der mittleren Größe und der Größenverteilung

Die Messung der mittleren Größe erfolgt durch eine Auswertung der Vorwärtsstreuungssignale (FSC). Zur Zellgrößenbestimmung werden drei verschiedene Größen von Polystyrolpartikeln (Polysciences) als Standard detektiert. Aus der Lage der Mittelwerte der Intensität des Streulichtsignals kann hiermit eine Kalibration des Cytometers erfolgen. Der Mittelwert der Streulichtsignale von Zellpopulationen bzw. Subpopulationen kann somit zur Berechnung der mittleren Größe herangezogen werden.

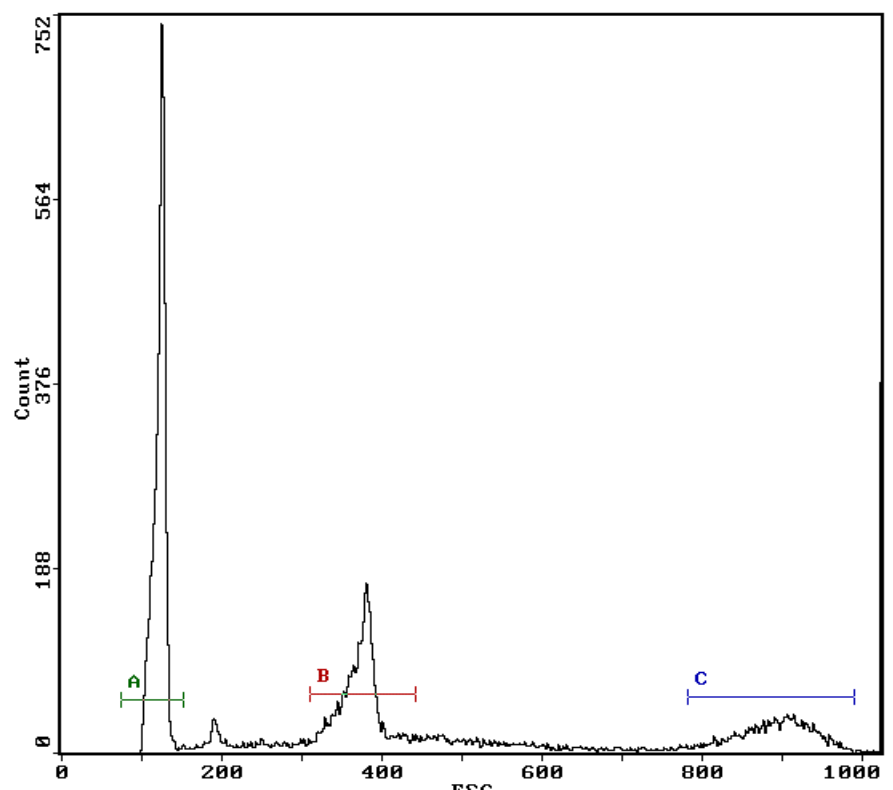


Abb. 3.6: Kalibration mit Polystyrolpartikeln (2,1  $\mu\text{m}$  (A), 5,6  $\mu\text{m}$  (B), 9,8  $\mu\text{m}$  (C))

### 3.8 Detektion der Stoffwechselaktivität

Die Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Zellen erfolgt photometrisch unter Einsatz von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). Es ist ein Tetrazoliumsalz und reagiert mit NADH durch Einwirkung mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazansalz (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylformazan) (Abb. 3.7). Dessen Farbintensität wird mit dem Immunoreaders NJ-2000 (Intermed) bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Der leicht gelbliche Feststoff löst

sich gut in Wasser und kann vier Wochen ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Pagliacci, 1993.

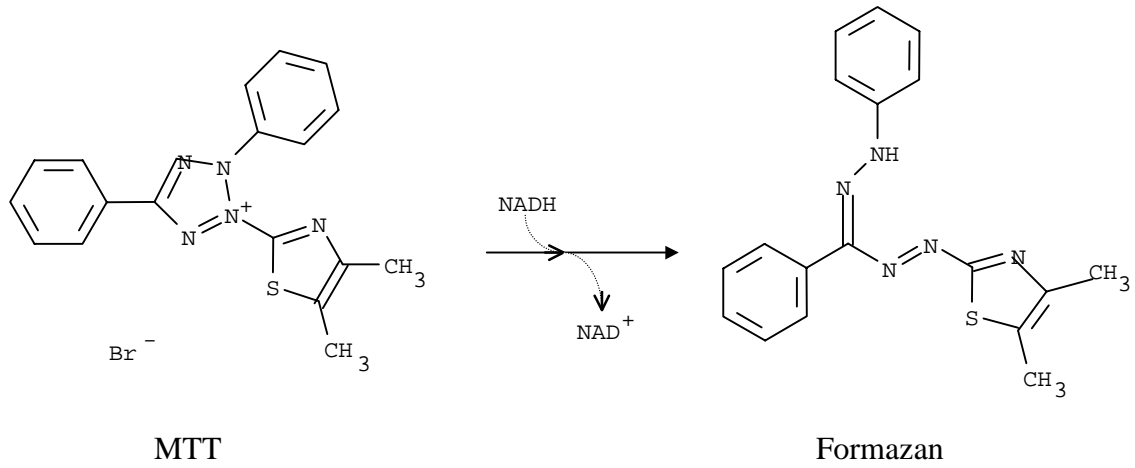


Abb. 3.7: Reaktion von MTT mit NADH zu Formazan

## **4 Entwicklung einer Multiparameteranalyse zur Detektion toxischer Einflüsse von Mediumadditiven**

Zur Beurteilung von Medienzusätzen ist es erforderlich, möglichst schnell und zuverlässig ihre proliferationsinhibierenden oder -stimulierenden Eigenschaften erkennen zu können. Zur Detektion von Substanzen, welche das Zellwachstum beeinflussen, soll mit Hilfe der Durchflußcytometrie ein effizientes Verfahren entwickelt werden, um schnell und mit hohem Probendurchsatz toxische oder proliferationsstimulierende Eigenschaften von Mediumadditiven zu erkennen. So können mit Hilfe von Reihenuntersuchungen Bestimmungen der optimalen Additivkonzentrationen erfolgen. Es sollen für verschiedene Prüfsubstanzen Toxizitätstests durchgeführt werden, wobei mehrere Parameter zur Beurteilung der biologischen Aktivität einer Substanz herangezogen werden können. Neben der durch in die DNA interkalierenden Fluorophore detektierbaren Vitalität und des Zellzyklusses sollen weiterhin die Einflüsse auf Wachstumsverhalten (Zellzahlbestimmung) sowie der Einfluß auf mittlere Zellgröße- und Größenverteilung bestimmt werden.

Am Beispiel des Cytostatikums Cycloheximid soll das Verfahren zur simultanen Bestimmung von Zellzahl, Zellgröße- und Zellgrößenverteilung und Vitalität etabliert werden. Zur Bestimmung der toxischen Eigenschaften von Antischaummitteln in der Zellkulturtechnik soll diese Multiparameteranalyse eingesetzt werden (s. Kap. 5), um aus vielen zur Verfügung stehenden Substanzen, die für Tierzellkulturen eingesetzt werden, die am wenigsten toxische und trotzdem wirkungsvollste Konzentration der Antischaummittel zu bestimmen.

Eine weitere Anwendung soll am Protein bovines Lactoferrin erfolgen, welches als Zellkulturadditiv, Nahrungsmittelzusatz und Pharmazeutikum immer mehr an Bedeutung gewinnt. Um die biologische Aktivität des durch verschiedene Verfahren produzierten Proteins zu überprüfen, soll die durchflußcytometrische Multiparameteranalyse eingesetzt werden, um die Produktionschargen bezüglich ihrer Aktivität auf Zellkulturen überprüfen zu können (s. Kap. 6).

Für diese Untersuchungen werden Zellen der Jurkat-Zelllinie eingesetzt. Es handelt sich um in Suspension kultivierbare humane T-Lymphozyten, welche über Lactoferrin-Rezeptoren verfügen. Im Gegensatz zu adhärenenten Zelllinien muß keine Trypsinbehandlung zum Ablösen der Zellen erfolgen, was die Probenahme vereinfacht.

## 4.1 Entwicklung der Multiparameteranalyse

### 4.1.1 Entwicklung der durchflußcytometrischen Zellzahlbestimmung

Für die Beurteilung der Proliferation einer Zellkultur ist es unerlässlich, über eine zuverlässige Zellzahlbestimmung zu verfügen. Gerade im Bereich von Tierzellkultivierungen, wo geringere Zelldichten vorherrschen, kommt der Zellzahlbestimmung eine besondere Bedeutung zu. Drei Methoden der Zellzahlbestimmung wurden miteinander verglichen (Abb. 4.1), um die Genauigkeit der durchflußcytometrische Detektion zu bestimmen.

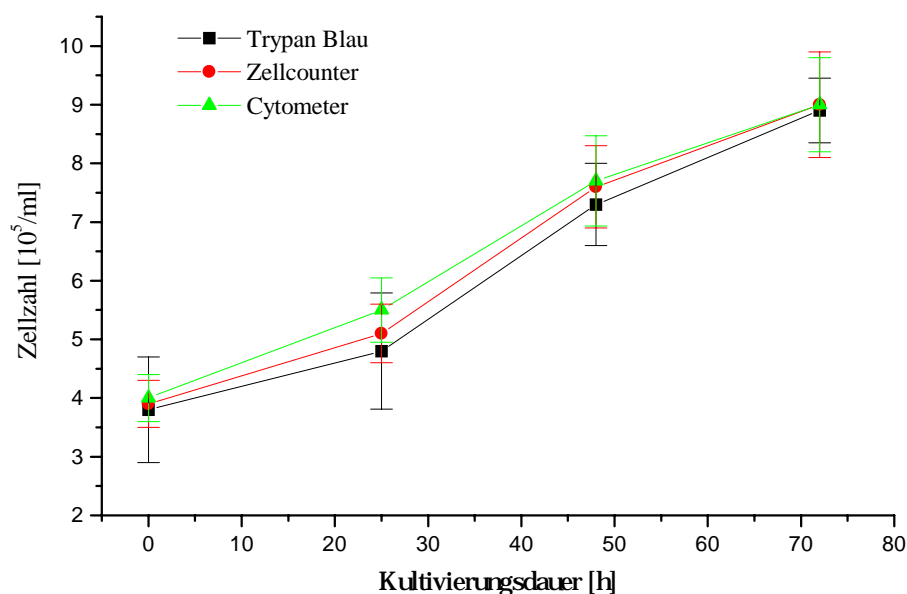


Abb. 4.1: Vergleich der Zählmethoden am Mikroskop, Zellcounter und Cytometer

Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung der Proben. Die mikroskopisch ermittelten Werte liegen immer unter denen der cytometrisch detektierten. Innerhalb der drei Einzelmessungen lagen die Schwankungen der Trypanblaumethode zwischen 8 und 34%. Besonders bei geringen Zellzahlen war diese Methode mit starken Schwankungen behaftet. Im Gegensatz zur mikroskopischen Zählung, bei welcher zwischen 20 und 150 Zellen erfaßt werden, können in einer cytometrischen Messung in kürzester Zeit bis zu 50.000 Zellen detektiert werden, was eine wesentlich höhere Genauigkeit ermöglicht. Die Schwankungen der Einzelmessungen lagen hier unter 10%, auch bei geringeren Konzentrationen. Bei dem auf Impedanzmessungen beruhenden Zellcounter (hier Zellcounter Casy<sup>®</sup> 1DT) können durch

die Messung höherer Zellzahlen pro Probe die Schwankungen auch auf unter 12% begrenzt werden, jedoch ist keine simultane Messung der Vitalität möglich.

Die durchflußcytometrische Bestimmung erfolgt mit Hilfe einer zeitbegrenzten Messung der Zellen. Hierfür ist eine Kalibration des Cytometers mit Partikelsuspensionen bekannter Konzentrationen nötig, da es nicht möglich ist festzustellen, wieviel Volumen das Durchflußcytometer während des festgelegten Zeitintervalls mißt. Zu diesem Zweck wurden Polystyrolpartikel der Größe 9,5 µm (Polyscience) eingesetzt. Durch Verdünnung mit PBS wurden Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Polystyrolpartikeln hergestellt, deren Konzentration am Zellcounter durch Mehrfachbestimmung erhalten wurde. Am Durchflußcytometer hat sich eine Zeitbegrenzung von 20 Sekunden als optimal herausgestellt [Arndt, 1998], so daß die Sedimentation der Polystyrolpartikel auf ein Minimum beschränkt ist und trotzdem ausreichend Partikel gezählt werden.

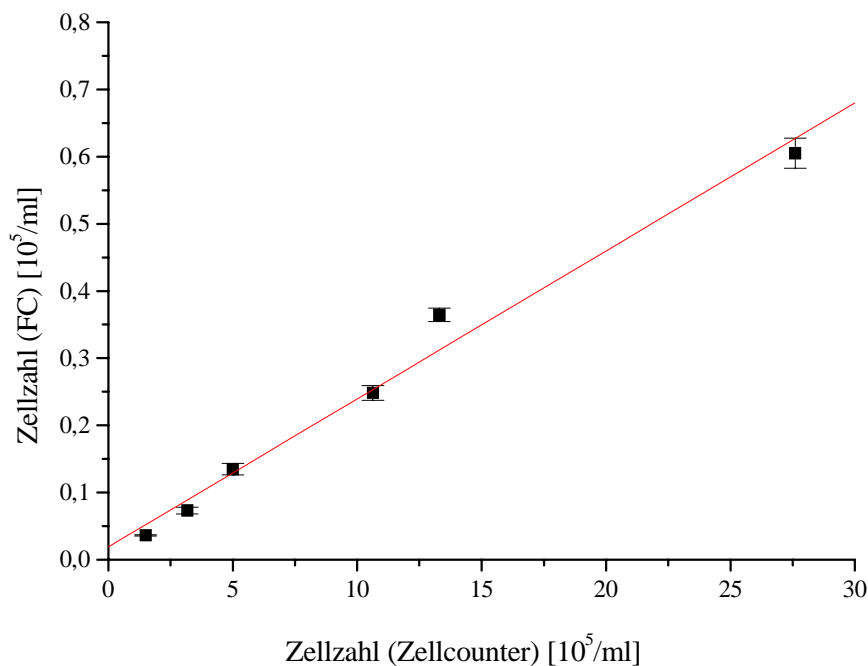


Abb. 4.2: Zellzahlbestimmung mit dem Durchflußcytometer (Arndt 1998)

Abb. 4.2 zeigt die lineare Abhängigkeit der Zellzahlbestimmung zwischen dem durchflußcytometrisch bestimmten Wert und den durch den Zellcounter erhaltenen. Die Kalibration erfolgt durch lineare Regression (Regressionskoeffizient: 0,991). Jeder Meßpunkt stellt einen Mittelwert aus 3 Einzelmessungen dar. Die relative Streuung um den Mittelwert



liegt unter 4 %. Die Zellzahlbestimmung am Zellcounter erfolgte ebenfalls durch die Mittelwertbildung aus drei Einzelmessungen. Die Abweichungen betragen bis zu 8 %.

#### 4.1.2 Entwicklung der durchflußcytometrischen Vitalitätsbestimmung

Um die Vitalität von Zellkulturen zu bestimmen, ist die Trypanblau-Methode seit langem etabliert. Die Bestimmung von trypanblaugefärbten Zellen, bei den Zellen mit Membranschädigung durch Farbstoffinterkalation mikroskopisch erfaßt werden, ist aufgrund der geringen Anzahl gezählter Zellen relativ ungenau und sehr zeitaufwendig. Weiterhin kommen Verdünnungsfehler bei Farbstoffzugabe hinzu. In der Durchflußcytometrie kann zur Bestimmung der Anzahl toter Zellen einer Kultivierung das Anfärben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid erfolgen. Die in der Literatur angegebene Zentrifugation vor einer Farbstoffzugabe stellte sich als nachteilig heraus, da nicht alle Zellen dieser Belastung unbeschadet standhielten. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß das Kultivierungsmedium keinen störenden Einfluß auf die Vitalitätsbestimmung mit Propidiumiodid hat. Dies ermöglicht weiterhin die Kombination aus Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung in einem Schritt. Die Propidiumiodid-Lösungen ( $7,5 \cdot 10^{-5}$  molar in PBS) können somit direkt zur Zellsuspension gegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Sekunden bei guter Durchmischung kann eine direkte Messung im Cytometer erfolgen (Arndt 1998). Abbildung 4.3 zeigt den Vitalitätsverlauf einer Kultivierung von Jurkatzellen (Animpfdichte  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml, Monolayer-Flasche ( $75 \text{ cm}^3$ ), DMEM mit 2% FCS) über 264 Stunden.

Zur mikroskopischen Vitalitätsbestimmung nach der Trypanblau-Methode wurden acht Einzelmessungen durchgeführt (Abweichungen bis zu 35%). Die durchflußcytometrisch bestimmte Vitalität durch Mittelwertbildung aus zwei Proben (jeweils Dreifachbestimmung einer Probe) liegt weit unterhalb dieser Fehlergrenzen. Die Streuung um den Mittelwert betrug jeweils unter 5%. Die Abweichung der beiden Messungen untereinander ist ebenfalls gering und liegt bei unter 4 %.

Bis zum siebten Kultivierungstag liegt die durchflußcytometrisch bestimmte Vitalität unterhalb der mikroskopisch detektierten. Der Grund dafür könnte sein, daß Zellbruchstücke, die sich in der Vorkultur befanden, bei der Trypanblau-Methode nicht bestimmt wurden. Beim Durchflußcytometer erhöhen unter Umständen diese Bruchstücke durch die größere Fluoreszenz die Totzellzahl. Es wird deutlich, daß bei einer mikroskopisch bestimmten hohen

Vitalität (über 75%), die durchflußcytometrisch detektierte größer ist. Dies ist ab dem sechsten Tag der Fall. Dabei wurden vermutlich ältere, nekrotische, durch Volumenkontraktion verkleinerte Zellen mit der Trypanblau-Methode durch eine fälschliche Beurteilung der Blaufärbung mit bestimmt. Somit wird die Totzellzahl erhöht und damit den Wert der Vitalität zu niedrigeren Ergebnissen verschoben.

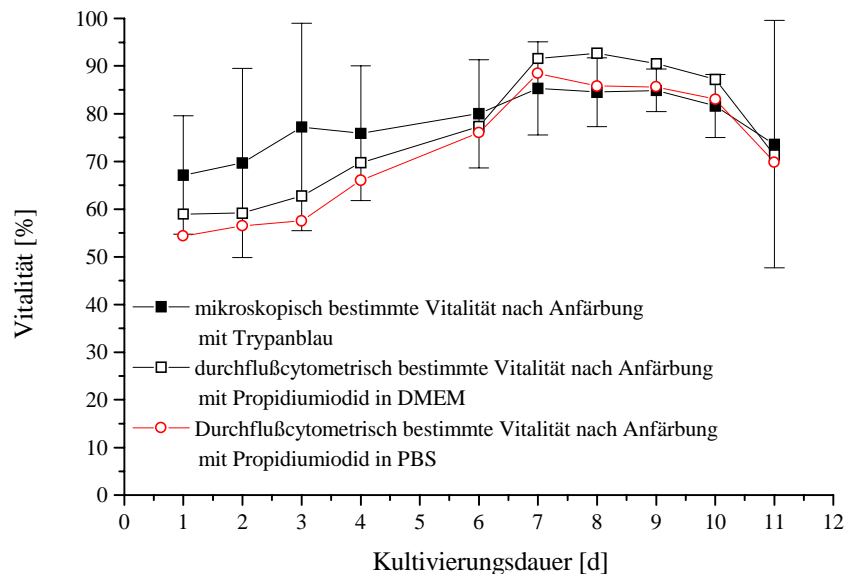


Abb. 4.3: Vergleich der Vitalitätsbestimmung mit Trypan-Blau und Propidiumiodid (Arndt 1998)

Der tatsächlichen Vitalität dürfte die auf durchflußcytometrischen Wege bestimmte am nächsten kommen, da hier durch die Detektion von mehr als 20.000 Zellen eine statistisch zuverlässigere Bestimmung möglich ist. Hingegen führt bei der mikroskopisch bestimmten Zellzahl mit Trypanblau die Beurteilung der Blaufärbung sowie die geringe Zellzahl (bis 140 Zellen/Zählung) zu sehr großen Abweichungen.

## 4.2 Durchflußcytometrische Toxizitätstest am Beispiel des Cytostatikums Cycloheximid

Cycloheximid, (3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]glutarimid), wurde 1946 von Whiffen, Bohonos et al. als Antibiotikum isoliert, welches in Hefen produziert wird und das Wachstum von Pilzen behindert. Die Wirksamkeit von Cycloheximid liegt einerseits an dessen guter Durchdringungsfähigkeit durch die Zellmembran und der Bildung eines Komplexes mit der DNA. Dieser unterbindet die Korrespondenz der Basenpaare und verhindert so die Replikation der DNA, was schließlich zu einer Unterbrechung der Proteinsynthese führt. [Jackson, 1968; Lee, 1965].

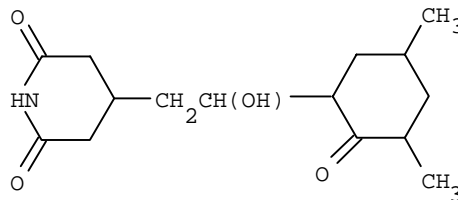


Abb. 4.4: Struktur von Cycloheximid

Zur Etablierung und genaueren Untersuchung des Testverfahrens wurden Kultivierungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cycloheximid in 12-Loch-Platten durchgeführt. Nach 48 und 72 Stunden wurden Proben genommen. Die durchflußcytometrische Auswertung der Zellproben erfolgte wie in Kap. 3 beschrieben. Zur Bestimmung der intrazellulären Stoffwechselaktivität wurde der MTT-Test (Kap. 3.7) angewendet. Alle Kultivierungen wurden aus der selben Vorkultur inokuliert. Die Zellen wurden in 4 ml DMEM mit 10% FCS kultiviert (Animpfdichte  $8 \cdot 10^5$  Zellen/ml). Direkt nach der Inokulation wurde Cycloheximid in Konzentrationen von  $10^{-4}$  mol/l,  $10^{-5}$  mol/l und  $10^{-6}$  mol/l zugefügt.

### 4.2.1 Vitalitätsbestimmung

Abb. 4.5 zeigt den Verlauf der Vitalität der vier Zellkulturen. Während bei der unbehandelten Kontrollkultur die Vitalität der Zellen nach 48 Stunden leicht auf 93% ansteigt, fällt bei den drei Kultivierungen, die mit Cycloheximid versetzt wurden, die Vitalität stark ab. Dabei ist eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Vitalität von Cycloheximid erkennbar. Dabei fällt die Vitalität der Kultivierung mit der höchsten Konzentration an Cycloheximid am stärksten, bei der Kultivierung mit  $10^{-9}$  mol/l am geringsten. Der Vitalitätsverlust der

Kultivierungen kann innerhalb von 72 Stunden als nahezu linear beschrieben werden, bei Kultivierung mit der geringsten Cycloheximid-Konzentration verlangsamt sich der Vitalitätsabfall geringfügig. Der lineare Abfall der Vitalität der beiden Kultivierungen resultiert aus dem fast linearen Abfall der Lebendzellzahlen (vgl. Abb. 4.7). Die Erniedrigung der Vitalität der Kontrollkultur nach 72 Stunden läßt sich dadurch erklären, daß durch das starke Ansteigen der Zellzahlen innerhalb eines Wells nicht mehr genügend Nährstoffe und Volumen zur weiteren Zellproliferation zur Verfügung stehen. Dieser Effekt ist auch geringfügig beim Zusatz mit der geringsten Cycloheximid-Konzentration zu beobachten.

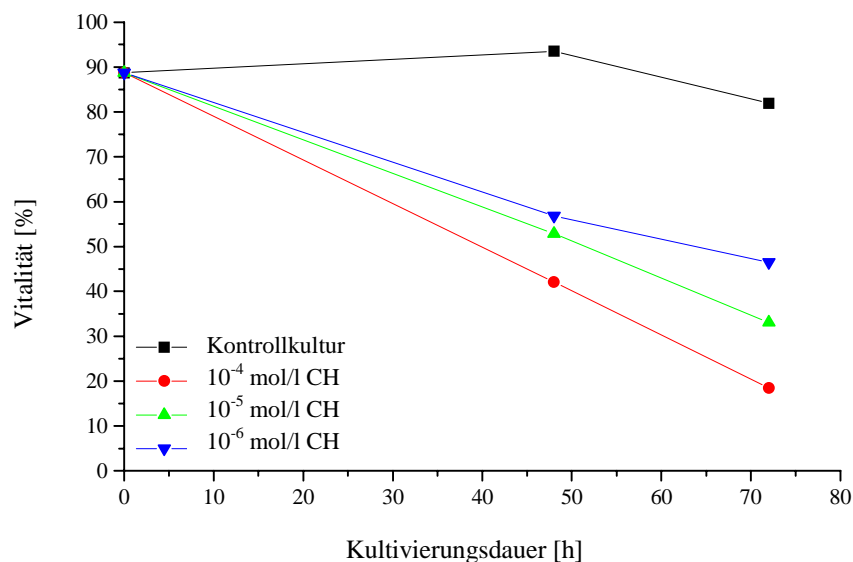


Abb. 4.5: Vitalitätsverlauf von Jurkat-Kultivierungen bei Zusatz von Cycloheximid (Arndt 1998)

#### 4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

In Abb. 4.6 ist klar zu erkennen, daß nur die Gesamtzellzahl der Kultivierung mit der höchsten Cycloheximid-Konzentration sinkt, alle anderen verzeichnen einen Anstieg. Der Verlauf entspricht dabei dem der Kontrollkultur. Unter dem Einfluß der höchsten Konzentration von Cycloheximid werden die lebenden Zellen um fast 80% dezimiert, während die Totzellzahl um das vierfache steigt (Abb. 4.7). Die Gesamtzellzahlen der Kultivierungen mit  $10^{-4}$  mol/l sowie  $10^{-5}$  mol/l Cycloheximid nehmen zu, allerdings ist dies auch auf ein starkes Ansteigen der Totzellzahlen beider Kultivierungen zurückzuführen. Die

Lebendzellzahlen beider Kultivierungen liegen deutlich unter denen der Kontrollkultur. Das Stagnieren der Lebendzellzahl der Kontrollkultur nach 72 Stunden deutet auf das Ende der exponentiellen Phase hin. Darauf läßt ebenso der Vitalitätsverlust schließen (Abb. 4.5).

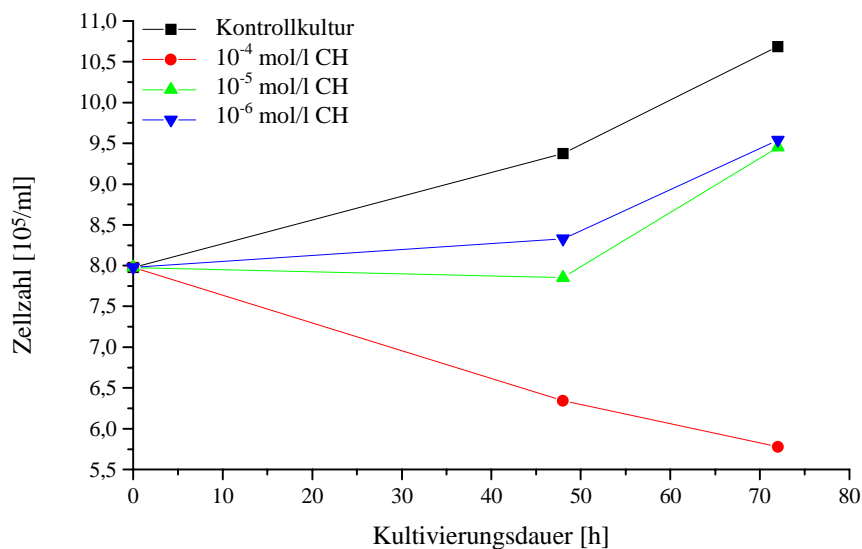


Abb. 4.6: Verlauf der Gesamtzellzahl bei verschiedenen Cycloheximidkonzentrationen (Arndt, 1998)

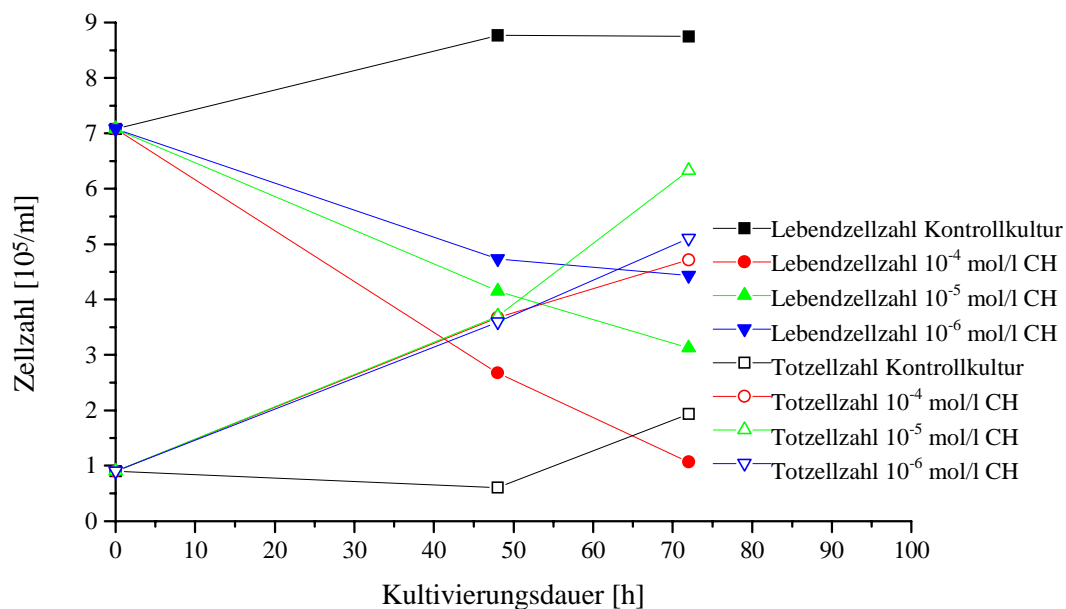


Abb. 4.7: Verlauf von Lebend- und Totzellzahl bei verschiedenen Cycloheximidkonzentrationen (Arndt, 1998)

Aus diesen in nur jeweils einer Messung von 20 Sekunden erhältlichen Daten über Vitalität und Zellzahlen läßt sich schließen, daß die Erhöhung der Konzentration des Cytostatikums die Zellen schneller absterben läßt, was im Verlauf der Lebendzellzahlen klar erkennbar ist. Die Wirkung des Zellgiftes steigt linear mit dessen Konzentration.

#### 4.2.3 Stoffwechselaktivität

Die intrazelluläre Stoffwechselaktivität der Kultivierungen wurde durch den MTT-Test, siehe Kap. 3.7, ermittelt. Dabei zeigt die Kontrollkultur die stärkste NADH-Aktivität. Nach einem Anstieg fällt nach 48 Stunden die Stoffwechselaktivität infolge der Stagnation der Lebendzellzahl.

Bei der höchsten Cycloheximid-Konzentration wird der stärkste Abfall der intrazellulären Stoffwechselaktivität verzeichnet. Dies ist auf die Inhibition der Proteinsynthese durch das Cytostatikums zurückzuführen. Der Abfall der Stoffwechselaktivität bei den geringeren Cycloheximidkonzentrationen ist klar konzentrationsabhängig.

Die intrazelluläre NADH-Aktivität wird somit auch von sehr geringen Konzentrationen von Cycloheximid stark beeinträchtigt. Erhöht man die Konzentration des Zellgiftes, so verringert sich in starkem Maße die NADH-Aktivität. Bei  $10^{-4}$  mol/l Cycloheximid entspricht dies nach 72 Stunden nur noch etwa 10% Aktivität im Vergleich zur Kontrollkultur.

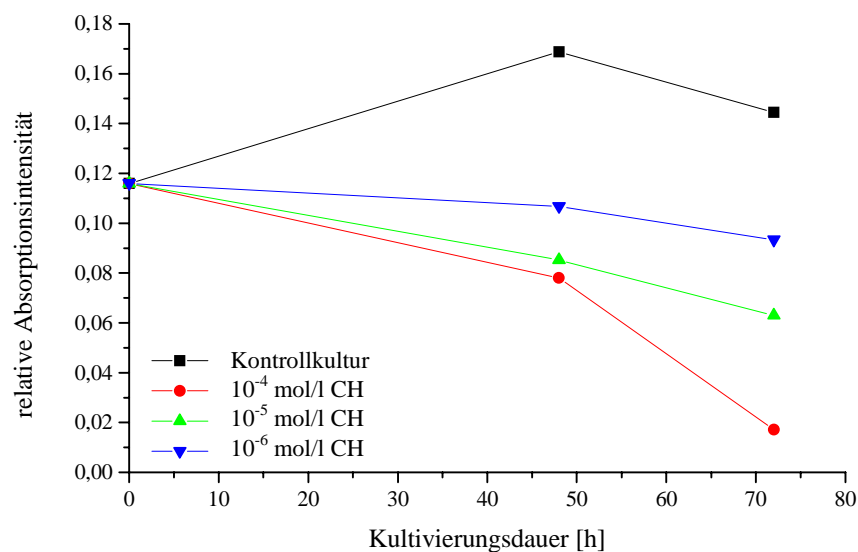


Abb. 4.8: Verlauf der Stoffwechselaktivität bei verschiedenen Cycloheximidkonzentrationen (Arndt 1998)

#### 4.2.4 Zellzyklusbestimmung

Für alle Kulturen wurden Zellzyklusbestimmungen (siehe Kap. 3.5) durchgeführt (Abb. 4.9 und 4.10). Die Zellzyklusmessung zeigt deutlich, daß der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phasenanteil der Vergleichskultivierung am kleinsten ist und erst nach 72 Stunden ansteigt. Der S-Phasenanteil sinkt hier nach kurzem Anstieg. Die Zellproliferation stagniert nun; es werden nur noch so viele Zellen repliziert wie nekrotisch absterben, die Kultur hat ihre stationäre Phase erreicht.

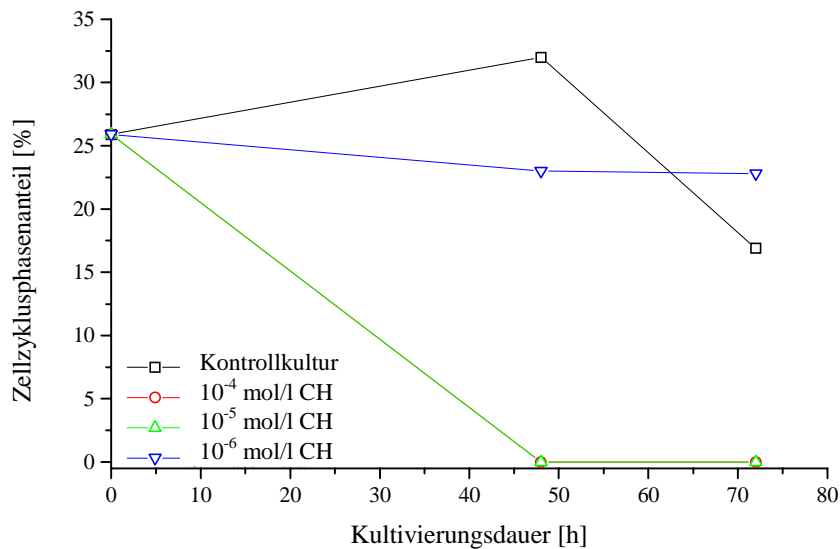


Abb. 4.9: Verlauf der S-Phase bei verschiedenen Cycloheximidkonzentrationen (Arndt 1998)

Der S-Phasenanteil wird eindeutig von der Cycloheximid-Zugabe beeinflusst. Bei den beiden höchsten Konzentrationen erfolgt ein rascher Abfall, somit wird eine weitere Zellteilung eingestellt. Bei der geringsten Konzentration ist der S-Phasenanteil konstant, im Gegensatz zur Kontrollkultivierung jedoch ebenfalls verringert.

Analog hierzu verhalten sich die G<sub>2</sub>/M- und G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phasenanteile. Durch hohe Cycloheximid-Zugabe erfolgt eine Anreicherung in der G<sub>0</sub>-Phase. Der Zellzyklus der meisten Zellen kommt somit unter dem Einfluß von Cycloheximid völlig zum Erliegen, wie sich in den vorher beschriebenen Lebendzellzahlen ausdrückt.

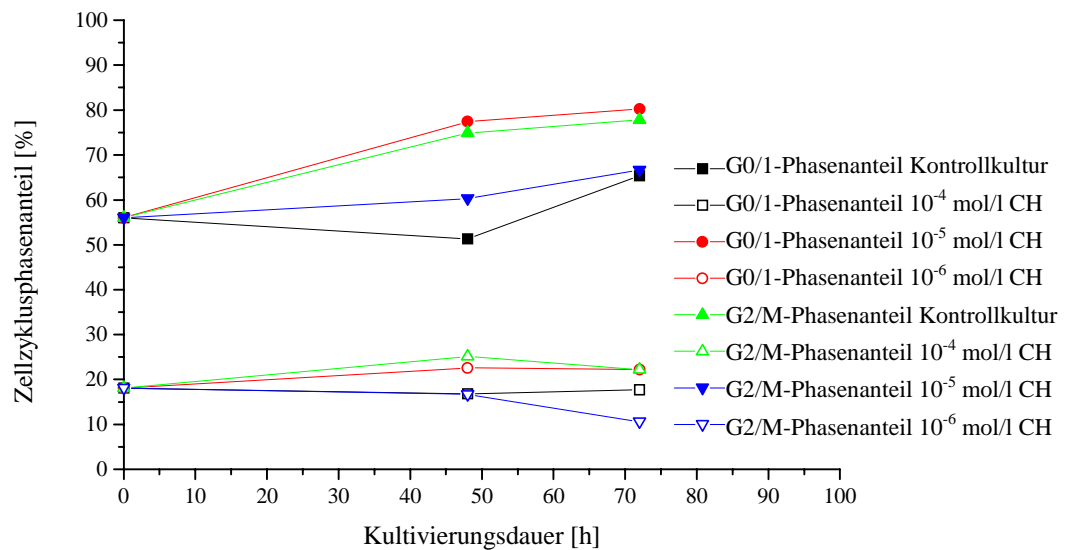


Abb. 4.10: Verlauf der G0/1 sowie der G2/M-Phase bei verschiedenen Cycloheximidkonzentrationen

#### 4.2.5 Bestimmung des LC50-Wertes

Zum Vergleich der toxischen Eigenschaften eines Stoffes auf Zellkulturen benötigt man eine Quantifizierung der Toxizität. Hierfür gibt der LC50-Wert die Dosis an, bei welcher die Substanz der 50 % der untersuchten Zellen abtötet [Müller, 1987].

Die Berechnung des LC50-Wertes für Kultivierungen in Mikrotiterplatten erfolgte auf der Grundlage der vier Kultivierungen von 0 bis  $10^{-4}$  mol/l Cycloheximid (Abb. 4.11). Hierbei wurde jeweils drei Wells mit der gleichen Konzentration von Cycloheximid inokuliert, der Mittelwert der Vitalitäten bestimmt und eine lineare Regression durchgeführt, sowie die statistischen Abweichungen vom Mittelwert berechnet. Diese lagen bei bis zu 10%. Der lineare Regressionskoeffizient betrug 0,978. Der LC50-Wert unter den oben genannten Kultivierungsbedingungen liegt bei einer Konzentration von  $2,96 \cdot 10^{-5}$  mol/l Cycloheximid.



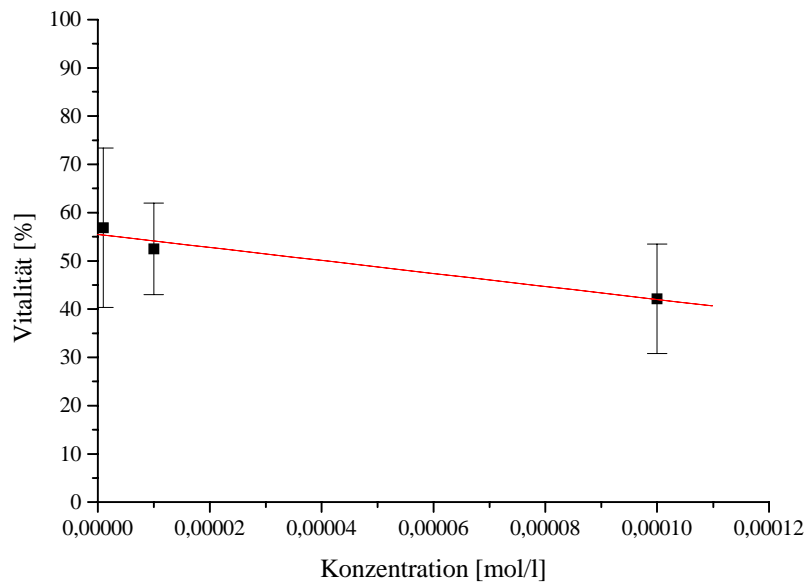


Abb. 4.11: Bestimmung des LC50-Wertes von Cycloheximid (Arndt 1998)

### 4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Multiparameteranalyse zur simultanen Bestimmung von Zellzahl, Zellgröße, Größenverteilung und Vitalität bietet gegenüber der manuellen mikroskopischen Trypanblaubestimmung klare Vorteile. Wohingegen bei der mikroskopischen Zählung nur maximal wenige hundert Zellen erfaßt werden können, ist es mit Hilfe der Durchflußcytometrie möglich, wesentlich größere Zellpopulationen bis zu 100.000 Zellen zu detektieren. Dies trägt er einer stark erhöhten Genauigkeit der Zellzählung und Vitalitätsbestimmung bei. Weiterhin sind für die durchflußcytometrische Bestimmung Meßzeiten von weniger als einer Minute üblich, da bis zu 4000 Zellen/Sekunde erfaßt werden können. Ebenso können im Gegensatz zur Mikroskopie mit derselben Messung die Zellgröße und Größenverteilung bestimmt werden. Diesen Vorteilen steht nur die erforderliche Kalibration des Cytometers mit Standardpartikeln entgegen.

Der auf Impedanzmessung beruhende Zellcounter liefert ähnlich gute Ergebnisse, jedoch ist keine Verknüpfung der Zellzahl mit einer Vitalitätsbestimmung möglich.

Am Beispiel des Cytostatikums Cycloheximid konnte die Leistungsfähigkeit der durchflußcytometrischen Multiparameteranalyse gezeigt werden. Durch die Bestimmung von

Vitalität, Lebend-, Tot-, und Gesamtzellzahl in nur einer Messung sowie der Zellzyklusanalyse konnte schnell die cytostatische Wirkung auf Zellzyklus und Zellzahlentwicklung gezeigt und der LC50-Wert bestimmt werden. Die Senkung der Vitalität steht hierbei in direkter Abhängigkeit zur Konzentration von Cycloheximid.

## 5 Toxizitätsbestimmung von Antischaummitteln

Schäume werden bei vielen Kultivierungen von Mikroorganismen durch Rührer oder Begasung erzeugt. Sie sind hier fast immer unerwünscht, da Zellen aus dem Medium ausgetragen werden und sich negativ auf die Vitalität der Kultur auswirken, was die Produktionsleistung erniedrigt. Zur Verhinderung einer Schaumbildung werden in der Biotechnologie viele Verfahren eingesetzt [Rubel, 1972]. Neben mechanischen Schaumzerstörern finden viele strukturell unterschiedliche Tenside ihre Anwendung als Entschäumer [Gutwald 1996].

Zur Bestimmung der toxischen Eigenschaften von Antischaummittel in der Zellkulturtechnik soll die Multiparameteranalyse eingesetzt werden, um aus vielen zur Verfügung stehenden Produkten, die für Tierzellkulturen eingesetzt werden, die am wenigsten toxische und trotzdem wirkungsvollste Konzentration der Antischaummittel zu bestimmen. Weiterhin soll der geeignetste Entschäumer leicht dosierbar und sterilisierbar sein.

### 5.1 Wirkungsweise und Klassifizierung von Antischaummitteln

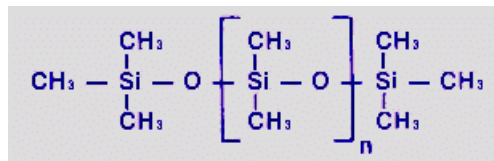
Die derzeit eingesetzten Antischaummittel lassen sich strukturell in fünf Gruppen klassifizieren. Sie sind alle als nicht-ionische Tenside einzuordnen. In Bezug auf ihren Wirkungsmechanismus unterscheiden sich silikonbasierende und trübungspunktabhängige Entschäumer.

1. Silikonhaltige Antischaummittel
2. EO/PO-Blockcopolymerer und Modifikationen
3. Polyethylen- und Polypropylenglykole
4. Fettsäureester, Fettalkohole und ihre Derivate
5. Diverse Mischungen von 1-4

Eine weitere Charakterisierung der Entschäumer zur Bestimmung seiner Emulsionseigenschaften erfolgt über den HLB-Wert (Hydrophilic-Lypophilic-Balance), welcher den Anteil wasserlöslicher und -unlöslicher Komponenten der Tenside widerspiegelt. Je geringer der HLB-Wert ist, um so lipophiler verhält sich die Substanz. Entschäumer besitzen HLB-Werte zwischen 1 und 4 [Höfer, 1996].

### 5.1.1 Silikonhaltige Antischaummittel

Silikonhaltige Antischaummittel basieren auf wäßrigen Emulsionen des einfachsten Silikons Polydimethylsiloxan. Die Kettenlänge der sich wiederholenden Einheit  $(\text{CH}_3)_2\text{SiO}$ - wird je nach Applikation variiert. Sie kann sowohl linear als auch verzweigt sein. Es sind viele Silikone mit durch z.B. Phenyl- oder Vinylgruppen substituierten Methylresten erhältlich, ob sie bei Entschäumen eingesetzt werden, ist nicht bekannt. Häufig wird nur „Silikon“ als Inhaltsstoff angegeben.



Formel 5.1:  
Struktur von  
Polydimethylsiloxan

Die hydrophoben Silikonpartikel setzen sich zwischen die dünnen Filme der Schaumblasen und der schaum erzeugenden Proteine oder Zellbruchstücke. Dies führt zu einer Zerstörung der Lamelle und führt so zu einer Schaumverminderung .

### 5.1.2 Trübungspunktabhängige Entschäumer

Die Effektivität der Antischaummittel mit Polyether-, Propylenoxid-, Ethylenoxid- oder Esterstruktur hängt von der Konzentration als auch von der Temperatur der Emulsion ab. Um die volle Wirksamkeit zu entfalten, ist es notwendig, daß ein Zwei-Phasen-System vorliegt, welches in eine tensidreiche und eine tensidarme Phase aufgetrennt ist. Die Temperatur, bei der diese Teilung stattfindet wird Trübungspunkt genannt. Die Tensidmoleküle der angereicherten Phase können nun die Lamelle der Schaumblase durchdringen und schließlich zerstören.

### EO/PO-Blockcopolymerer und Modifikationen

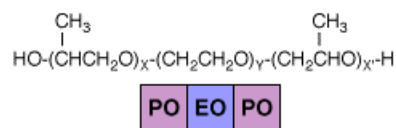
Die Blockcopolymerer werden aus Propylenoxid (PO) und Ethylenoxid (EO) hergestellt. Der Vertrieb erfolgt mit dem Handelsnamen Pluronic. Es werden zwei Grundtypen unterschieden. Pluronic in der Grundform enthält PO als Ausgangsmolekül. Durch Variation der Zugabe von EO wird das gewünschte Molekulargewicht bzw. Polarität erreicht. Die Antischaumwirkung erhöht sich bei sinkendem Ethylenoxidanteil und steigendem MW.



Formel 5.2:

Grundstruktur Pluronic

Die reverse Form enthält Ethylenoxid als Ausgangsmaterial.



Formel 5.3:

Grundstruktur Pluronic R

Die als Antischaummittel wirksamen Copolymere besitzen ein Molekulargewicht von 2200 bis 3800, wobei der hydrophile Anteil des Moleküls zwischen 5 und 20% liegt. Der Trübungspunkt liegt bei bis zu 1%iger Lösung unter Raumtemperatur. Der HLB-Wert der Entschäumer befindet sich zwischen 1 und 3.

### Polyethylen- und Polypropylenglykole

Die Polyethylenglykole (PEG) und Polypropylenglykole (PPG) (Formel 5.4) sind aus der Reaktion von Wasser mit Ethylenoxid oder Propylenoxid im Überschuß erhältlich. Die Kettenlänge wird durch die zugesetzte Menge an EO bzw. PO bestimmt. Im Gegensatz zu den Blockcopolymeren kann nur ein Strukturparameter verändert werden und werden als Entschäumer seltener eingesetzt.

PEG ( $\alpha$ -Hydro- $\omega$ -hydroxy-polyoxyethylen): HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH

PPG ( $\alpha$ -Hydro- $\omega$ -hydroxy-polyoxypropylen): HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH

Formel 5.4

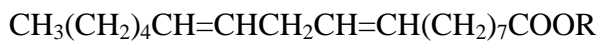
Die Löslichkeit der Polyether in Wasser hängt sehr stark von der Temperatur ab. Bei Raumtemperatur führt ein Versetzen der Antischaummittel mit Wasser zu einer stabilen Emulsion. Eine Temperaturerniedrigung führt hier zu einer Erhöhung der Löslichkeit, so daß

diese Mischung bei 0-4 °C eine klare Lösung ergibt. Dieser Effekt kann zur Sterilfiltration des Tensid/Wassergemisches eingesetzt werden, welche bei Bildung einer Emulsion nicht möglich ist.

### **Modifizierte Ester und Alkohole**

Verschiedene Fettalkohole, Fettsäuren und Fettsäureester (Formel 5.5) werden ebenfalls als Antischaummittel eingesetzt. Bis zum Erreichen der gewünschten Eigenschaften werden z.T. Seitenketten ins das Molekül eingefügt.

Fettsäureester, z. B. Linolensäureester

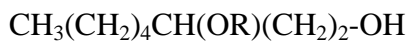


alkoxylierte Fettsäureester, z.B. Alkoxylate der Ölsäure

Formel 5.5



alkoxylierte Fettalkohole, z.B. Alkoxylate von Octa(3-en)-(1)-ol



## 5.2 Bestimmung der wirksamen Antischaumkonzentration

Zur Bestimmung der wirksamen Konzentration als erstes Auswahlkriterium wurden 22 Antischaummittel untersucht (Tab. 5.1).

In einem 500 ml Meßzylinder mit 50 ml DMEM-Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) werden 60 mg/ml BSA bei Raumtemperatur gegeben. Es erfolgt eine konstante Begasung mit Druckluft. Die Schaumhöhe wird ohne Zusatz auf 50 cm im Meßzylinder eingestellt. Vorverdünnte 0,1% Lösungen der Antischaummittel werden zudosiert. Als wirksam gilt eine Konzentration, welche die Schaumhöhe für fünf Minuten auf mindestens einen Zentimeter über der Flüssigkeitsoberfläche senkt. Alternativ zur Begasung im Meßzylinder wurde ein Cappucino-Schaumbilder eingesetzt, wobei Schäume durch 15fache vollständige Stempelbewegung generiert wurden.

Tab. 5.1: Effektive Konzentrationen verschiedener Entschäumer und Standardbedingungen

Antischaummittel	Hersteller	Strukturtyp	Effektive Konzentration
<b>31R1</b>	BASF	Reverses PO/EO-Blockcopolymer	25 ppm
<b>AF 204</b>	Sigma	Polypropylenglykol	5 ppm
<b>AF 289</b>	Sigma	Mischung von Blockcopolymeren und Silikon	5 ppm
<b>AF-B</b>	Sigma	10% Silikon + Emulgatoren	50 ppm
<b>Biotenside (25% Wirkstoff)</b>	nicht im Handel	Mischung verschiedener Sophoroselipide	100 ppm (langsam) 200 ppm (schnell)
<b>DC 1500</b>	Dow Corning	Polydimethylsiloxan	40 ppm
<b>DC 1520</b>	Dow Corning	Polydimethylsiloxan	25 ppm
<b>DC 544</b>	Dow Corning	Polydimethylsiloxan	25 ppm
<b>Desmophen 3900</b>	Bayer	Polypropylenglykol	10 ppm
<b>EGA 279</b>	Henkel-Cognis	Modifizierter Polyalkoxyether	5 ppm
<b>FBA 5057</b>	Henkel-Cognis	Modifizierter Polyalkoxyether	5 ppm
<b>FGA 265</b>	Henkel-Cognis	Modifizierter Polyalkoxyether	5 ppm
<b>J650</b>	Schill und Seilacher	PO/EO-Blockcopolymer	20 ppm
<b>J673</b>	Schill und Seilacher	alkoxylierter Fettsäureester	15 ppm
<b>L101</b>	BASF	PO/EO-Blockcopolymer	25 ppm
<b>O-30</b>	Sigma	Fettsäureester	0,5 %
<b>Rapsöl</b>	Hoechst	Polydimethylsiloxan	1%
<b>SB 2022</b>	Schill und Seilacher	Alkoholalkoxylat	5 ppm
<b>SB 2052</b>	Schill und Seilacher	Fettalkoholalkoxylat	120 ppm
<b>SLE</b>	Wacker	Polydimethylsiloxan	30 ppm
<b>SO-25</b>	Sigma	Polydimethylsiloxan	150 ppm
<b>Z 2110</b>	Henkel		50 ppm

### 5.3 In-vitro-Untersuchungen zur Toxizität von Antischaummitteln

CHO-Zellen wurden für 90 Stunden bei 37° C (Animpfdichte: 10<sup>5</sup> Zellen/ml) kultiviert. Hierfür wurde das serumfreie Tierzellkulturmedium Bio Pro 1 (BioWhittaker) eingesetzt. Alle Antischaummittel wurden vorverdünnt (1:1000) sowie autoklaviert oder steril filtriert (0.2 µm Membran bei 4° C). Von jeder Kultivierung mit einem Antischaummittel in seiner effektiven Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Auf jeder 12-Lochplatte wurde ebenfalls dreifach eine unhandelte Kontrolle kultiviert. Nach 90 Stunden wurden alle Zellen geerntet und für die durchflußcytometrische Analyse vorbereitet. Von der simultanen Detektion der Parameter Vitalität, Zellzahl und Größenverteilung wurden jeweils die Mittelwerte zur Auswertung verwandt. Zur Bestimmung der Vitalität wurde Propidiumiodid (50 µg/ml) eingesetzt (siehe Kap. 3.6), für die Bestimmung der Zellzahl wurde das Cytometer mit verschiedenen Konzentrationen von Polystyrolpartikeln (Polysciences) vor der Analyse kalibriert. Als signifikantester Parameter zur Beobachtung toxischer Effekte der Entschäumer stellte sich die Vitalitätsmessung heraus (Abb. 5.1).

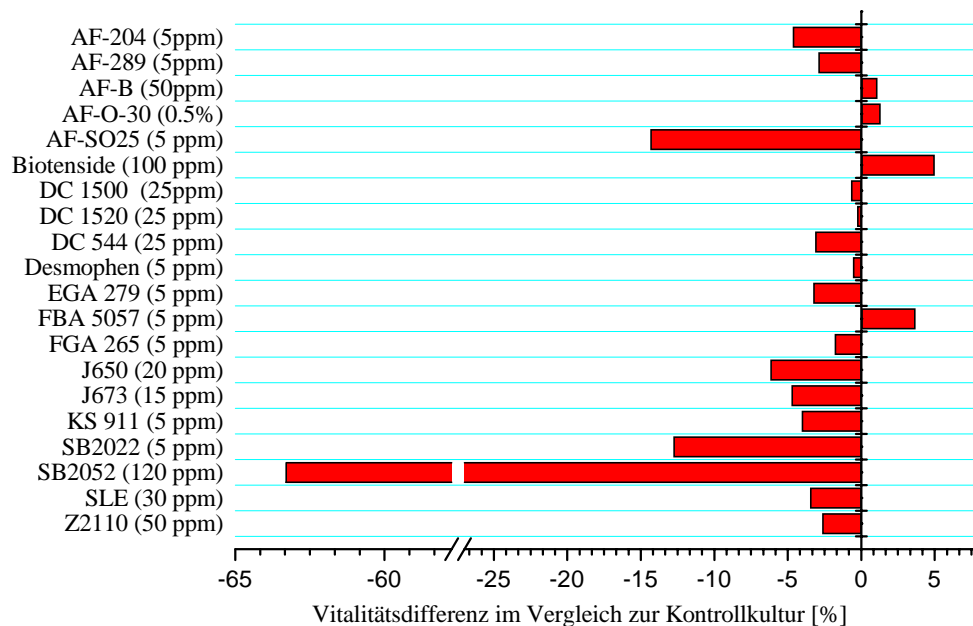


Abb. 5.1: Vitalitätsdifferenz von CHO-Zellkulturen mit Zusatz von Antischaummitteln im Vergleich zur Kontrollkultur in %



Die toxischen Effekte der eingesetzten Antischaummittel in ihrer effektiven Konzentration variieren stark von 64% Vitalitätsverlust bis zu 5% Vitalitätserhöhung. Die starke Vitalitätserhöhung bei Biotensiden sind vermutlich auf eine Verwertung der Tenside im Stoffwechsel der Zellen zurückzuführen. Die Vitalitätsänderung stellt zwar einen der wichtigsten Kriterien zur Auswahl des geeignetsten Entschäumers dar, weiterhin müssen jedoch auch noch Handhabung und Zellwachstum berücksichtigt werden.

## 5.4 Löslichkeit und Handhabung

Um leicht in die Zellkulturmedien dosierbar zu sein, ist es nötig entweder ohne Wirkungsbeeinträchtigung oder Verklumpen autoklavierbar zu sein oder eine Sterilfiltration zu ermöglichen. Die bei der Vorverdünnung entstehende Emulsion soll zudem eine möglichst geringe Viskosität aufweisen.

Tab. 5.2: Löslichkeit und Handhabung von Entschäumern mit geringer Toxizität

Entschäumer	Strukturtyp	Löslichkeit	Handhabbarkeit	Bemerkungen
<b>AF 204</b>	PPG	mittel	stabile Emulsion, hohe Viskosität	
<b>AF 289</b>	Silikon/PO- Mischung	mittel	stabile Emulsion, mittlere Viskosität	
<b>AF-B</b>	Silikon	gut	stabile Emulsion, geringe Viskosität	10% vorverdünnt + Emulgatoren
<b>Biotenside</b>	Mischung verschiedener Sophoroselipide	gut	stabile Emulsion, geringe Viskosität	Sterilfiltration möglich
<b>DC 1500</b>	Silikon	schlecht	stabile Emulsion, hohe Viskosität	
<b>DC 1520</b>	Silikon	mittel	stabile Emulsion, hohe Viskosität	
<b>DC 544</b>	Silikon	mittel	stabile Emulsion, hohe Viskosität	
<b>Desmophen 3900</b>	PEG	gut	stabile Emulsion, geringe Viskosität	
<b>EGA 279</b>	Modifizierter Polyalkoxyether	gut	stabile Emulsion, geringe Viskosität	Sterilfiltration möglich
<b>FBA 5057</b>	Modifizierter Polyalkoxyether	gut	stabile Emulsion, geringe Viskosität	Sterilfiltration möglich
<b>FGA 265</b>	Modifizierter Polyalkoxyether	gut	stabile Emulsion, geringe Viskosität	Sterilfiltration möglich
<b>J 673</b>	Fettsäureester	mittel	stabile Emulsion, mittlere Viskosität	
<b>O-30</b>	Fettsäureester	schlecht	instabile Emulsion, hohe Viskosität	Phasentrennung nach Autoklavieren

Bei Berücksichtigung aller Entschäumer, welche einen Vitalitätsverlust von weniger als 5% aufweisen, ergibt sich ein stark differenziertes Bild (Tab 5.2). Bei dem Vergleich von leichter Handhabbarkeit in Bezug auf Dosierung ins Medium und eine geringe Viskosität der vorverdünnte Emulsion, bleiben nur wenige Entschäumer in den vorgegebenen Kriterien.

Hervorzuheben sind die modifizierten Polyalkoxyether, welche durch ihre Eigenschaft, bei geringen Temperaturen erheblich besser löslich zu sein, eine Sterilfiltration ermöglichen. Dies vereinfacht die Vorbereitung der Entschäumer erheblich, da ein Autoklavieren einen wesentlich längeren Zeitraum in Anspruch nimmt und teilweise die Struktur der Entschäumer irreversibel verändert. Alle Silikonantischäumer sind aufgrund der Partikelgröße nicht steril filtrierbar.

## 5.5 Lebendzellzahlentwicklung

Als weiteres Auswahlkriterium wird für die wirksamen, leicht dosierbaren und steril filtrierbaren Entschäumer die Entwicklung der Lebendzellzahlen verglichen. Die Polyalkoxyether und die Biotenside zeigen in Bezug auf den Einfluß auf die Lebendzellzahlen der CHO-Zellen starke Unterschiede (Abb. 5.2). Während, trotz hoher Vitalität, die Polyalkoxyether FGA 265 und EGA 279 das Zellwachstum um bis zu 11 % reduzieren, zeigt FBA 5057 hier kaum Veränderungen. Auch die Biotenside, welche eine Vitalitätserhöhung zur Folge hatten, wirkten sich negativ auf das Zellwachstum aus.

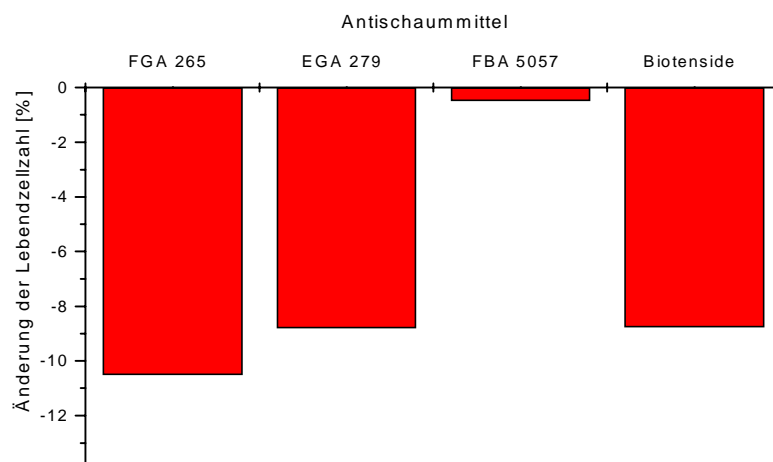


Abb. 5.2: Änderung der Lebendzellzahl durch Zusatz von Antischaummitteln auf CHO-Zellkulturen in %

## 5.6 Zusammenfassung und Diskussion

Durch die Bestimmung der toxischen Eigenschaften von Antischaummitteln konnte die Durchflußcytometrie effektiv eingesetzt werden, um schnell die Auswirkungen der Entschäumer bei CHO-Zellkulturen zu bestimmen.

Die gleichzeitig in einer Probe bestimmbaren Parameter Vitalität und Zellzahl mit Mehrfachbestimmungen aus allen 22 untersuchten Produkten ermöglichte es, in kurzer Zeit die geeignetsten Antischaummittel in ihrer effektivsten Konzentration für CHO-Zellen zu selektieren.

Eine Abhängigkeit von der Struktur der Entschäumer und dessen Auswirkungen auf die Vitalität und Lebendzellzahl der Entschäumer war nicht zu erkennen. Die Entschäumer, welche sich als am wenigsten toxisch auf CHO-Zellen herausstellten, unterschieden sich jedoch stark in Bezug in ihrer Dosierbarkeit und Viskosität.

Unter Einbeziehung aller detektierten Parameter kann modifizierte Polyalkoxyether FBA 5057 (Henkel) als erste Wahl zur Eindämmung einer Schaumbildung bei CHO-Zellen empfohlen werden.

Für diesen kann hat folgende Vorgehensweise zur Minimierung der Schaumbildung als praktikabel erwiesen:

Die Tenside werden auf eine geringe Konzentration in PBS vorverdünnt (z.B.: 1:1000), um eine stabile Emulsion zu erhalten. Nach Abkühlen auf 4 °C ist der Entschäumer so weit gelöst, daß eine Sterilfiltration (0.2 µm) möglich ist. Nun kann die Lösung direkt in das Zellkulturmedium dosiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden. Eine nachträgliche Zugabe in eine Fermentation ist ebenfalls möglich. Seine volle Wirksamkeit entfaltet das Antischaummittel bei Erreichen der Kultivierungstemperatur.

Hierbei muß berücksichtigt werden, daß dies für die eingesetzte CHO-Zelllinie in BioPro 1-Medium und Kultivierungen in 12-Loch-Platten gilt. Für andere Zelllinien bzw. größere Reaktormaßstäbe sind weiterführende Untersuchungen nötig.

## 6 Biologischer Aktivitätstest von Lactoferrin

Rinderserum-Lactoferrin (bLF) gewinnt als biologisch aktives Protein als Zellkulturadditiv, Nahrungsmittelzusatz und Pharmazeutikum immer mehr an Bedeutung gewinnt [Hurley 1994]. Es soll mit Hilfe durchflußcytometrischer Messungen genauer charakterisiert werden. Um die biologische Aktivität des durch verschiedene Verfahren produzierten Proteins zu überprüfen, soll die durchflußcytometrische Multiparameteranalyse eingesetzt werden, um die Produktionschargen bezüglich ihrer Aktivität auf Zellkulturen überprüfen zu können. Weiterhin sollen im Rahmen dieser Untersuchungen zusätzliche Erkenntnisse bezüglich der Wirkungsweise von Lactoferrinchargen, bLF (TCI) und bLF-Hydrolysat (Morinaga), auf die Proliferation der Zelllinie gewonnen werden.

### 6.1 Aufbau und Struktur von bovinem Lactoferrin

Bovines Lactoferrin ist ein Glykoprotein, welches sowohl in Milch als auch in vielen anderen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Tränenflüssigkeit oder Speichel, gefunden wird. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa und besteht aus einer einzigen Kette von 692 Aminosäuren. Lactoferrin enthält intramolekulare Disulfidbrücken sowie gebundene Sulfohydrylgruppen und wird von zwei verschiedenen Seiten glykosiliert. An der terminalen nichtreduzierenden Position befindet sich ein  $\alpha$ -1,3-Galactose-Rest. Jeder Lappen beinhaltet eine glykosidische und eine eisenbindende Seite, wobei Eisen (+III) das am häufigsten an Lactoferrin bindende Metall ist. Andere Metallionen, wie Zink, Magnesium, Aluminium oder Kupfer können ebenfalls gebunden werden und führen zu neuen Eigenschaften [Lønnerdal, 1995; Pakdaman, 1998].

### 6.2 Biologische Wirkungsweise

Seit seiner ersten Isolierung vor über 30 Jahren wurden viele biologische Funktionen von Lactoferrin nachgewiesen; eine vollständige Aufklärung aller seiner Eigenschaften ist jedoch bis heute nicht gelungen. Eisen wird von fast allen Bakterien und Zellen zum Wachstum und zur Kontrolle ihrer Immunfunktionen benötigt. Mit Hilfe von eisenhaltigem Lactoferrin

konnte gezeigt werden, daß metallkomplexierende Chelate auf die Abwehr viraler Infektionen bei Zellen und Bakterien einen stimulierenden Einfluß haben [Marchetti, 1998].

Eine entscheidende Funktion erfüllt Lactoferrin trotz einer normalerweise geringen Plasmakonzentration auch im Immunsystem des Menschen. Bei Anwesenheit von infektiösen Bakterien oder einer Tumorbildung wird die körpereigene Konzentration erheblich erhöht [Bi, 1996]. Vermutlich durch die Destabilisierung der bakteriellen Zellwand aufgrund der Bindung von Calcium und Magnesium wird ein bakteriostatischer Effekt erreicht, dies ist jedoch nur ein indirekter Effekt [Sanches, 1992].

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Lactoferrin ist die Regulierung der cytotoxischen Aktivität von Monocyten und die Proliferationsförderung von humanen T-Lymphozyten. Voraussetzung für die Bindung an verschiedene Zellen ist das Vorhandensein eines Lactoferrin-Rezeptors auf der Membran. Der genaue Mechanismus der Lactoferrin-Rezeptor-Bindung ist noch nicht bekannt [Bi, 1994]. Aus diesem Grund wurde eine humane T-Lymphozyten-Zelllinie für die Untersuchungen gewählt.

Die wachstumsstimulierende Wirkung von eisenhaltigem bovinen Lactoferrin bei Lymphozyten, die in eisenfreiem Medium kultiviert werden, kann auf die Eigenschaft den Eisengehalt im Medium zu erhöhen, beruhen [Hashizume, 1987]. Um die biologische Aktivität bezüglich einer Lactoferrin-Rezeptor-Interaktion zu untersuchen, ist es somit notwendig, eisenhaltiges Medium zu verwenden, um Verfälschungen auszuschließen.

### **6.3 Biologische Aktivitätsuntersuchungen von bLF und bLF-Hydrolysat**

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationen von bLF und bLF-Hydrolysat auf T-Lymphozyten zu detektieren, wurden Kultivierungen in 12-Loch-Platten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im serumfreien Medium Ex-cell PF CHO (JHR Biosciences). Neben einer Kontrollkultur wurden jeweils  $10^{-9}$  mol/l und  $5 \cdot 10^{-9}$  mol/l bLF bzw. bLF-Hydrolysat eingesetzt. Jede Kultivierung wurde dreifach durchgeführt, die beschriebenen Ergebnisse stellen den Mittelwert der drei Kultivierungen dar.

Die interne Abweichung betrug bis zu 8%. Die Animpfdichte bei allen Kultivierungen betrug  $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml. Die anfängliche Vitalität der Zellen lag bei 92%. Alle Kultivierungen wurden zum selben Zeitpunkt der Vorkultur entnommen. Hierauf erfolgte eine durchflußcytometrisch Bestimmung der Zellzahlen, Vitalitäten sowie eine Zellzyklusanalyse. Außerdem wurde die NADH-Aktivität detektiert. Die Probenahmen erfolgten nach 48 und 72 Stunden.

### 6.3.1 Vitalitätsbestimmung

In Abbildung 6.1 sind die Vitalitätsveränderungen unter dem Einfluß der verschiedenen Lactoferrinkonzentrationen dargestellt. Die Vitalität sinkt bei allen Kultivierungen stark, was auf die Adaption der Zellen an serumfreies Medium zurückzuführen sein dürfte.

Allerdings wird sichtbar, daß der Abfall der Vitalität bei den Kultivierungen mit der geringen Konzentration von bLF bzw. bLF-Hydrolysat nach 72 Stunden wesentlich langsamer und ähnlich verläuft. Dies verdeutlicht, daß geringe Konzentrationen von bLF bzw. bLF-Hydrolysat vitalitätsfördernd wirken.

Dagegen zeigt der Vitalitätsverlauf der Kultivierung mit  $5 \cdot 10^{-9}$  mol/l bLF, daß die Dosierung für die Zellen zu hoch war und sich in Folge dessen die Wirkung als toxisch erwies, so daß ein kontinuierlicher Vitalitätsabfall zu beobachten ist.

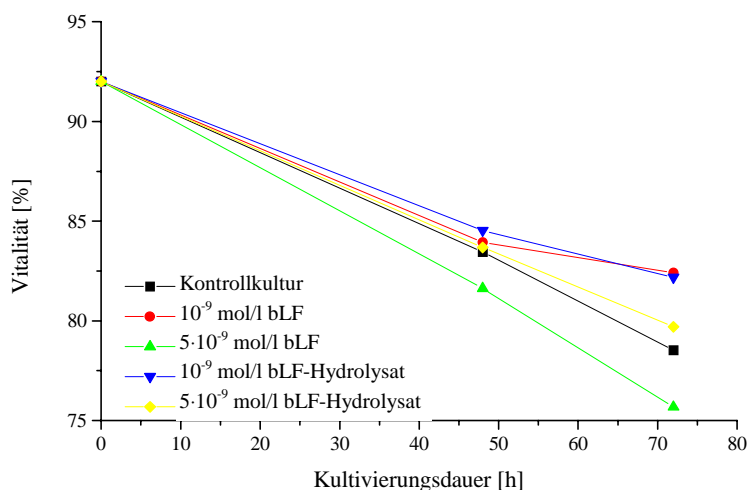


Abb. 6.1 Vitalitätsverlauf bei unterschiedlichen Konzentrationen von bLF und bLF-Hydrolysat (Arndt, 1998)

Durch das Fehlen des fötalen Kälberserums ist es den Zellen in diesem Kultivierungsmedium nicht möglich, den normalen Verlauf einer Zellkultivierung zu zeigen, was jedoch die Bestimmung der Aktivität nicht beeinflusst. Bei Zugabe von  $5 \cdot 10^{-9}$  mol/l des bLF-Hydrolysats sinkt die Vitalität der Zellen nicht ganz so schnell wie bei der Zugabe des nicht hydrolysierten Lactoferrins und wirkt somit weniger toxisch.

### 6.3.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte im Cytometer (siehe Kap. 3.8). Die Schwankungen um den Mittelwert lagen bei bis zu 9%. Ein linearer Anstieg der Gesamtzellzahlen ist bei allen

Kultivierungen zu beobachten. Dabei ist zu erkennen, daß die Kultivierung mit  $10^{-9}$  mol/l bLF-Hydrolysat den höchsten Anstieg zu verzeichnen hat. Die Lebendzellzahl steigt innerhalb von 72 Stunden um mehr als das Doppelte an, was die Vermutung zuläßt, daß sich die Konzentration im Kultivierungsmedium wachstumsfördernd auf die Zellen auswirkt.

Die geringere Konzentration von Lactoferrin im Medium zeigt nach 48 Stunden den zweithöchsten Anstieg der Lebend- und Gesamtzellzahl. Nach 72 Stunden allerdings sinken beide Zellzahlen und die Totzellzahl stagniert. Dies läßt den Schluß zu, daß eine Stimulation zu einer dauerhaften Proliferation nicht erreicht werden kann.

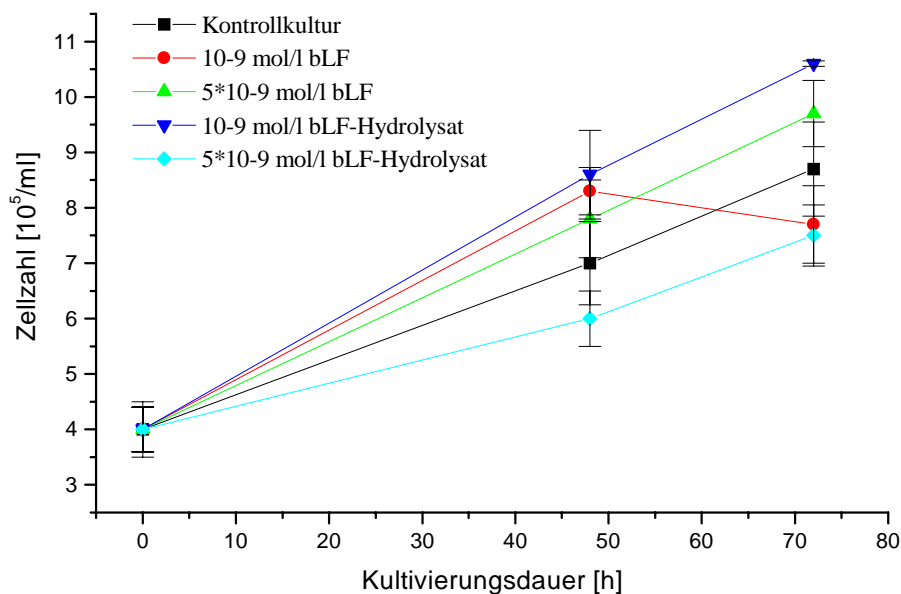


Abb. 6.3: Verlauf der Gesamtzellzahl bei unterschiedlichen Lactoferrinkonzentrationen (Arndt 1998)

Bei hohen Lactoferrin-Konzentrationen wird deutlich, daß trotz stark sinkender Vitalität die Gesamtzellzahl ansteigt und noch über der Kontrollkultur liegt. Allerdings sterben hier die Zellen infolge der hohen Dosis am schnellsten ab.

Bei Anwesenheit einer zu großen Konzentration von bLF-Hydrolysat liegen nicht die optimalen Wachstumsbedingungen vor, was die Verdoppelung der Totzellzahlen zeigt. Es ist der geringste Anstieg der Lebendzellzahlen zu verzeichnen.

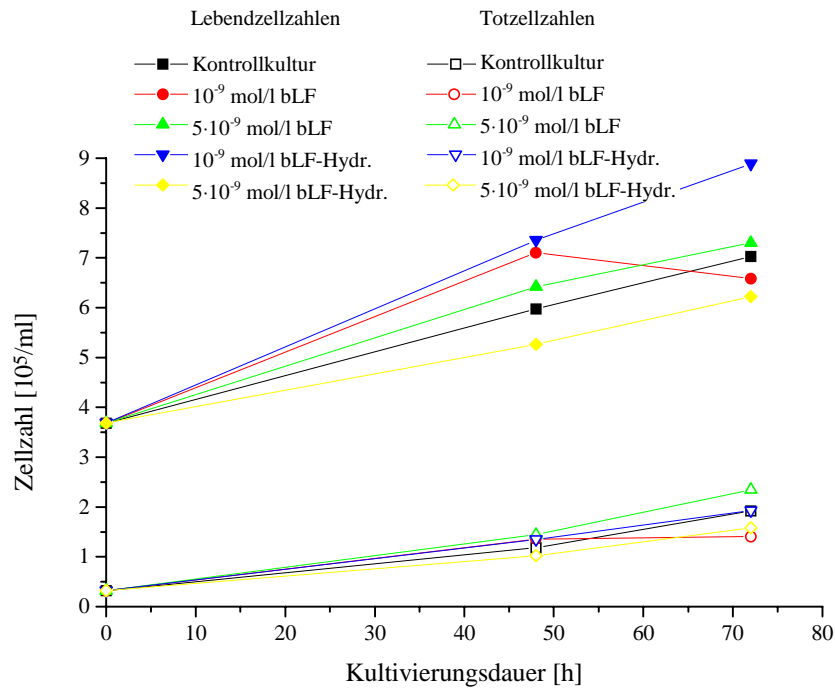


Abb. 6.4: Verlauf der Gesamtzellzahl bei unterschiedlichen Lactoferrinkonzentrationen (Arndt 1998)

### 6.3.3 Zellzyklusbestimmung

Die Zellzyklusanalyse spiegelt die toxischen Einflüsse hoher Lactoferrin-Konzentrationen wieder. Dies wird am Verlauf der G2/M-Phase der Kultivierung mit einem Gehalt von  $5 \cdot 10^{-9}$  mol/l Lactoferrin deutlich (Abb. 6.5). Die beiden Phasen zeigen den Anteil der sich in Kürze teilenden Zellen. Hier sinken diese Phasenanteile kontinuierlich bis auf unter 15%. Das zeigt, daß die Zellen dieser Kultivierung immer weniger in der Lage sind, sich zu teilen. Der G0/G1-Phasenanteil bleibt während des gesamten Zeitraums dieser Kultivierung konstant, was aber auch auf einen steigenden Ruhephasenanteil hindeuten kann, da mit dieser Methode G0 und G1-Phase nicht getrennt werden können. Die Abschwächung des Synthesephasenanteils nach 72 Stunden deutet allerdings darauf hin.

Geringe Lactoferrinkonzentrationen zeigen ein ähnliches Bild, allerdings etwas schwächer ausgeprägt. Der Synthesephasenanteil steigt kontinuierlich, allerdings scheinen die Zellen nicht mehr die Möglichkeit zu haben, die vollständige Verdopplung ihres Genoms sowie der Zellkernproteine abzuschließen. Das Sinken der G2/M-Phase führt zu einer Reduktion der Lebendzellzahlen nach 72 Stunden.



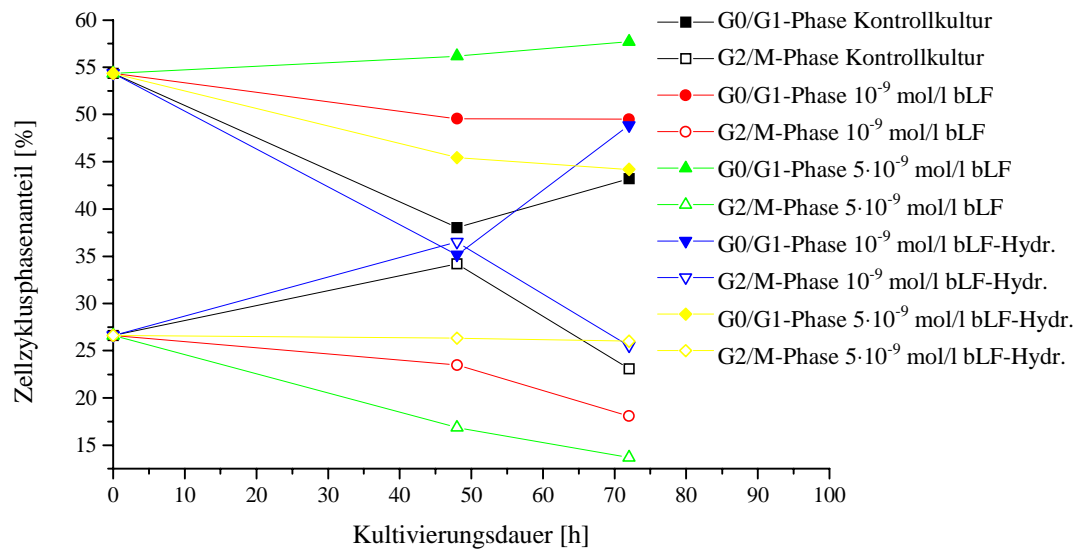


Abb. 6.5: Verlauf der G0/G1 und G2/M-Phasen bei unterschiedlichen Lactoferrinkonzentrationen (Arndt 1998)

Hohe Lactoferrin-Hydrolysat-Konzentrationen führen zu einem Maximum der G2/M-Phase nach 48 Stunden. Dabei befinden sich ca. 10% der Zellen mehr in dieser Phase. Der anschließende Rückgang kommt dadurch zustande, daß die meisten Zellen die Replikation vollzogen haben, was aus dem großen Anstieg der Lebendzellzahlen zu erkennen ist. Nach 72 Stunden der Kultivierung befanden sich die Mehrzahl der Zellen in der G0- bzw. G1-Phase, so daß keine weitere Stimulation der Zellteilung stattfand.

Ein vergleichbares Verhalten der G2- bzw. Mitosephase zeigt auch die Kontrollkultur. Auch hier ist ein Anstieg der Lebendzellzahlen infolge einer verstärkten Zellteilung zu erkennen. Allerdings weist der Synthesephasenanteil der Kultivierung eine kontinuierliche Steigung auf (Abb. 6.6).

Kultivierungen mit  $5 \cdot 10^{-9}$  mol/l Lactoferrin-Hydrolysat zeigen eine Konstanz der G2/M-Phasen. Die Zunahme des Synthesephasenanteils verlangsamt sich nach 48 Stunden. Der signifikante Abfall der S- und G2/M-Phase bei geringer Konzentration des Hydrolysates läßt den Schluß zu, daß die Zellen schnell zum Wachstum angeregt werden und diese Stimulation nach 72 Stunden abgeklungen ist. Die gleiche Konzentration des nicht hydrolysierten Lactoferrins führt zu einem langsameren Anstieg der Lebendzellzahl, zeigt aber hier eine kontinuierliche Erhöhung des S-Phasenanteils. Dies läßt den Schluß zu, daß das Hydrolysat

von der Zelle schneller aufgenommen werden kann, wobei nicht hydrolysiertes Lactoferrin seine stimulierende Wirkung erst zeitversetzt entfaltet.

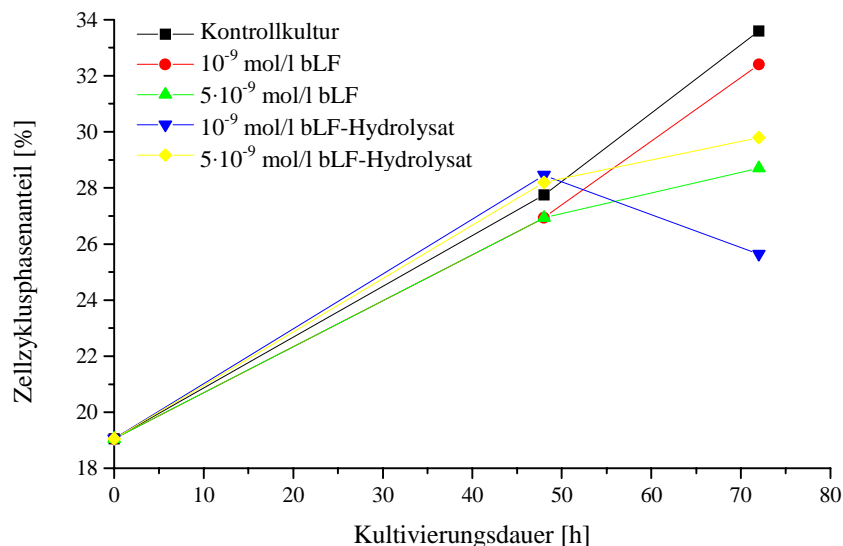


Abb. 6.6: Verlauf der S-Phase bei unterschiedlichen Lactoferrinkonzentrationen (Arndt 1998)

### 6.3.4 Bestimmung der NADH-Aktivität

Die intrazelluläre Stoffwechselaktivität wurde bei allen Zellkultivierungen mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die unbehandelte Kontrollkultivierung eine sehr hohe NADH-Aktivität aufweist (Abb. 6.7). Dies könnte durch die Adaption der Zellen an serumfreies Kultivierungsmedium zustande kommen. Kultivierungen mit geringen Lactoferrin-Konzentrationen haben nach 48 Stunden zunächst einen starken Abfall der NADH-Aktivität zu verzeichnen. Anschließend erfolgt durch die Regeneration der Zellen ein Anstieg der intrazellulären Stoffwechselaktivität, da hier der Eintritt in die S-Phase erfolgt ist. Der Abfall der NADH-Aktivität bei Kultivierungen mit hohen Lactoferrin-Konzentrationen läßt den toxischen Einfluß von Lactoferrin bei dieser Konzentration erkennen. Dieser Abfall zeigte sich auch bei Kultivierungen mit Cycloheximid durch die Blockade der Proteinsynthese (vgl. Kap. 4.2).

Bei Lactoferrin-Konzentrationen von  $10^{-9}$  mol/l hingegen zeigt sich wiederum ein angeregter intrazellulärer Stoffwechsel. Vor allem das Hydrolysat wirkt stark stimulierend. Die späte Stimulation der NADH-Aktivität von nicht hydrolysierten Lactoferrin belegt dessen zeitversetzte Wirkung.

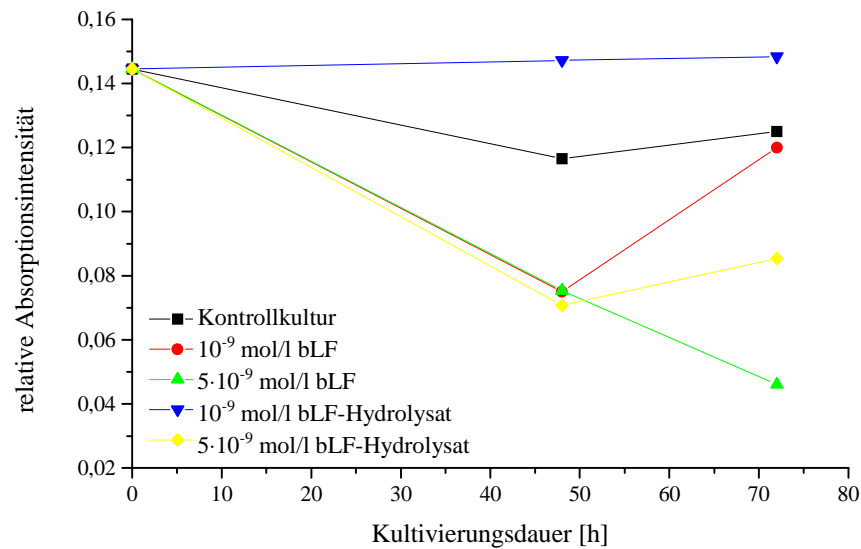


Abb. 6.7: Verlauf der NADH-Aktivität bei unterschiedlichen Lactoferrinkonzentrationen (Arndt 1998)

## 6.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die durchflußcytometrischen Analysen zeigen die toxischen Auswirkungen höheren Dosen von Lactoferrin und des Lactoferrin-Hydrolysates. Bei beiden ist der stärkste Vitalitätsverlust zu verzeichnen, ebenso ist die Absterberate bei beiden Konzentrationen am höchsten. In Bezug auf die intrazelluläre Stoffwechselaktivität zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie dies schon bei den mit Cycloheximid inkubierten Zellen der Fall war, was den Verdacht auf cytostatische Wirkungen dieser Konzentration auf die Zellen bestätigt (Tab. 6.1).

Eine Dosis von  $10^{-9}$  mol/l führt zur einer Stimulation der Proliferation von T-Lymphozyten. Dies spiegelt sich sowohl in den Lebendzellzahlmessungen als auch der Zellzyklusanalyse wieder. Durch zusätzliche durchgeführte Messungen der Stoffwechselaktivität konnten die durchflußcytometrisch erhaltenen Ergebnisse untermauert werden. Um eine möglichst

eindeutige Aussage über die biologische Aktivität von LF treffen zu können, hat sich die Vitalität als signifikantester Parameter herausgestellt.

Tab. 6.1: Auswirkung von bLf und bLF-Hydrolysat auf Jurkat-Zellkulturen

<b>Konzentration</b>	<b>Vitalität</b>	<b>Lebendzellzahl</b>
$10^{-9}$ mol/l bLF	stimulierend	stimulierend
$5 \cdot 10^{-9}$ mol/l bLF	inhibierend	keine signifikante Änderung
$10^{-9}$ mol/l bLF-Hydrolysat	stimulierend	stimulierend
$5 \cdot 10^{-9}$ mol/l bLF-Hydrolysat	keine signifikante Änderung	inhibierend

Es wurden mit dieser Zelllinie bisher keine Versuche unternommen, sie serumfrei zu kultivieren. Angesichts der Tatsache, daß bovines Lactoferrin im fötalem Rinderserum enthalten ist, erscheint dies wenig sinnvoll, um zu zeigen, in welchem Ausmaß verschiedene Konzentrationen von bLF auf die Zelllinie einwirken. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen wurden Jurkatzellen in serumreduzierten Medien kultiviert. Die in der Literatur [Bi, 1994; Bi, 1996] beschriebenen Ergebnisse lassen somit keine eindeutigen Rückschlüsse auf die biologische Aktivität von bLF zu.

Mit dem beschriebenen Verfahren ist es nun möglich, ohne störende Einflüsse des Serums die biologische Aktivität des bLF zu überprüfen. Durch den Einsatz von kleinen Kulturgrößen in 12-Loch-Schalen mit einer anschließenden durchflußcytometrischen Analyse können schnell und mit geringerem Aufwand Erkenntnisse über die biologische Aktivität erhalten werden. Somit steht nun auch eine Möglichkeit zur Verfügung, die Auswirkungen auf Säugerzellen zu detektieren, was die etablierten Verfahren an Bakterien wirkungsvoll ergänzen kann.

Weiterhin konnten durch die in das Verfahren integrierte Zellzyklusanalyse weitere mechanistische Erkenntnisse zur Wirkungsweise von Lactoferrin gewonnen werden, wie dies die erkennbare Zeitverzögerung in der Stimulation der Proliferation von T-Lymphozyten mit nicht hydrolysierten bLF verdeutlicht.

## 7 Detektion des intrazellulären t-PA-Gehaltes in Tierzellkulturen

Seit der breiteren Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper sind in den letzten Jahren viele Verfahren zur Detektion intrazellulärer Proteine und Enzyme entwickelt worden. Ihre Hauptanwendung findet sich allerdings im medizinischen Bereich, wo die Bestimmung der Konzentration intrazellulärer Cytokine, z.B.  $\gamma$ -Interferon oder TNF- $\alpha$  inzwischen etabliert ist [Lloyd 1999]. In der Biotechnologie ist die durchflußcytometrische Analytik intrazellulärer rekombinanter Produkte zur Prozeßoptimierung bisher nur selten beschrieben worden [McKinney 1996].

Für zwei verschiedene Anwendungen, die t-PA und  $\beta$ -Galactosidaseproduktion (s. Kap. 8), sollen Verfahren etabliert werden, welche das jeweils biotechnologisch relevante Produkt detektieren und somit über den gesamten Zeitraum der Fermentation Informationen über die Produktexpression liefern. Somit soll es ermöglicht werden, den Einfluß von toxischen Komponenten im Medium nicht nur in Bezug auf Zellwachstum und Vitalität zu messen, sondern auch die direkte Auswirkung auf Produktbildung und -ausschleusung in das Medium zu erkennen, um eine weitere Optimierung des biologischen Prozesses zu erreichen.

### 7.1 Struktur und biologische Wirkungsweise

Der Gewebefibrinolyse-Aktivator (t-PA) spielt eine entscheidende Rolle in der Fibrinolyse, dem gegenläufigen Prozess zur Blutgerinnungskaskade. Er aktiviert die Umwandlung Plasminogen zu Plasmin, welches schließlich zu einer Aktivierung der Fibrinolyse und einer Auflösung von Blutgerinnseln führt. Es konnte erstmals 1987 korrekt glykolisiert und biologisch aktiv in *Aspergillus nidulans* exprimiert werden [Upshall, 1987]. Die heutige großtechnische Produktion erfolgt in CHO-Zellkulturen, in welchen humanidentisches t-PA produziert wird. t-PA besteht aus 527 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 59 kDa ohne Berücksichtigung der Kohlenhydratseitenketten und von 68 kDa mit drei Zuckerresten. In der Natur kommen zwei Haupttypen von t-PA vor, welche sich in einem Glykolisierungsmuster unterscheiden. Die spezifische Aktivität und Halbwertszeit *in vivo* sind von der Glykosylierung abhängig [Cole, 1993]. Durch den Einsatz von mit Fluoreszenzfarbstoffen gelabelten Antikörpern sollen in den rekombinanten CHO-Zellen t-PA-Moleküle intrazellulär detektiert und so der Verlauf der Produktexpression während einer Kultivierung verfolgt werden.

## 7.2 Durchflußcytometrische Detektion von t-PA

Zur cytometrischen Detektion müssen die anti-t-PA-Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gelabelt werden. Dies erfolgt durch Reaktion von FITC und dem Protein in Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH=9). Eine Abtrennung des überschüssigen Farbstoffes erfolgt durch Trennung auf einer 10 ml Sepharose-Säule (Sigma) (siehe Anhang). Die erhaltene Fraktion mit anti-t-PA-FITC kann nun für die durchflußcytometrischen Analysen eingesetzt werden.

Zur durchflußcytometrischen Detektion des intrazellulären t-PA-Gehaltes muß verhindert werden, daß das produzierte Produkt durch eine Permeabilisierung der Membran beim Einschleusen der gelabelten Antikörper in das Medium gelangt. Eine Blockade der Ausschleusungsmechanismen mit Monensin oder Brefeldin A, wie bei der intrazellulären Cytokinanalytik, scheidet aufgrund der erforderlichen Anreicherungszeit aus. Um den Antikörper einschleusen zu können, wurde der Hefeextrakt Saponin eingesetzt, bei welchem es sich um eine heterogene Mischung verschiedener Moleküle handelt. Die Struktur setzt sich aus Triterpenen, welche mit unterschiedlichen Zuckerresten verbunden sind, zusammen [Sigma, 1996]. Bei Anwesenheit in der Zellsuspension wird die Zellmembran für eine Antikörperinkorporation permeabilisiert. Nach Entfernen durch Zentrifugations- und Waschschrte erfolgt aber ein erneutes Schließen der Zellmembran, so daß der Antikörper-t-PA-Komplex nicht ausgeschleust werden kann [Jalal, 1992]. Die durchflußcytometrische Detektion erfolgt bei der Emissionswellenlänge von FITC (520 nm).

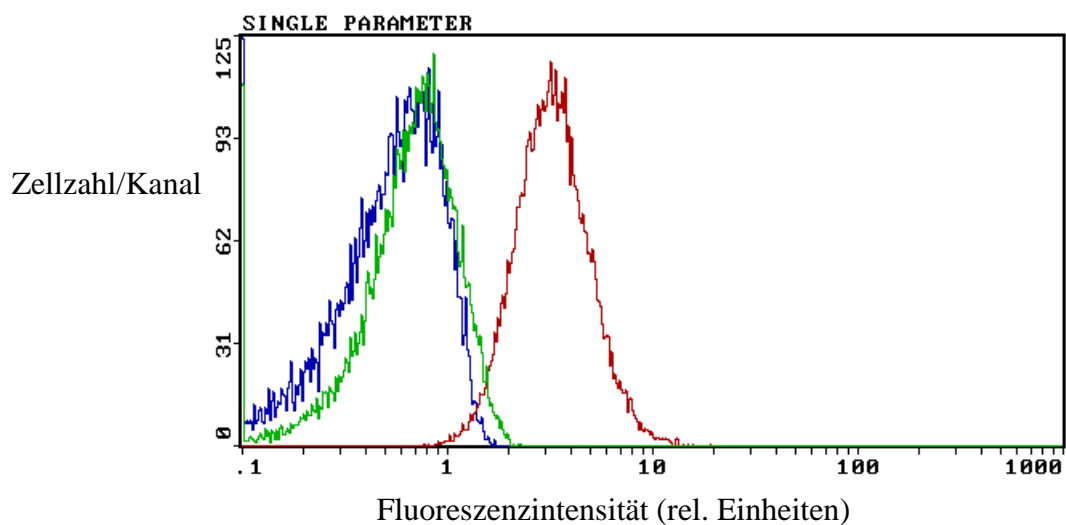


Abb. 7.1: Durchflußcytometrische Messung von t-PA (rot) und zwei Kontrollen von CHO-Zellen

Abb. 7.1 zeigt eine cytometrische Messung des t-PA-Gehaltes (rot) im Vergleich zu einer unbehandelten Probe (blau) und einer Isotyp-Kontrolle (grün). Für die weitere Auswertung wurden die Mittelwerte der Intensitätsverteilung verwandt.

### 7.3 Intrazelluläre t-PA-Konzentration bei 31°C und 37°C-Kultivierungen

Die t-PA-Produktion von CHO-Zellen hängt stark von den Kultivierungstemperaturen ab. Wie Buch 1998 zeigte, ist die Produktion von t-PA bei Kultivierungen bei 31° und 33° C wesentlich effizienter als bei 37°C trotz einer höheren Lebendzellichte. Das entwickelte Verfahren zur intrazellulären Bestimmung von t-PA soll weiteren Aufschluß über die Gründe der erhöhten Produktion bringen. Alle Zellen stammen aus derselben Vorkultur und wurden mit einer Animpfdichte von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml in BioPro1 (BioWhittaker) kultiviert.

Der Verlauf der Lebend- und Totzellzahlen (Abb. 7.2) zeigt einen erwarteten Verlauf für die Kultivierung bei 37°C.

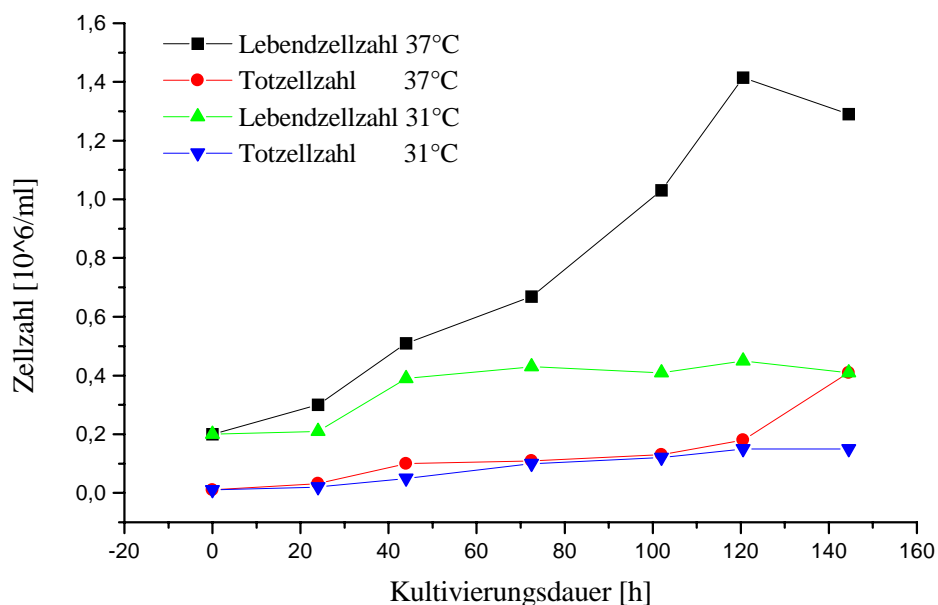


Abb. 7.2: Lebend- und Totzellzahl bei 31°C und 37°C

Nach einer anfänglichen Adaptionphase mit geringer Zellzahlsteigerung erfolgt in der exponentiellen Phase bis nach 120 Stunden eine Steigerung auf 1.4 Mio. Zellen/ml. Im Gegensatz hierzu erfolgt kaum eine Steigerung der Zellzahl bei 31°C. Nach Beginn der

exponentiellen Phase stagniert die Lebendzellzahl bei unter 400.000 Zellen/ml. Die Totzellzahl steigt langsam bis 300.000 Zellen/ml bei beiden Temperaturen an, in Relation zur geringen Lebendzellzahl bei 31°C ist die Vitalität hier wesentlich geringer. Für Kultivierungen bei 31°C und 37°C wurden jeweils Untersuchungen des intrazellulären und extrazellulären t-PA-Gehaltes durchgeführt und mit den Zellzyklusverläufen verglichen. Abb. 7.3 und 7.4 zeigen den Verlauf der Zellzyklusphasen bei 31°C und 37°C.

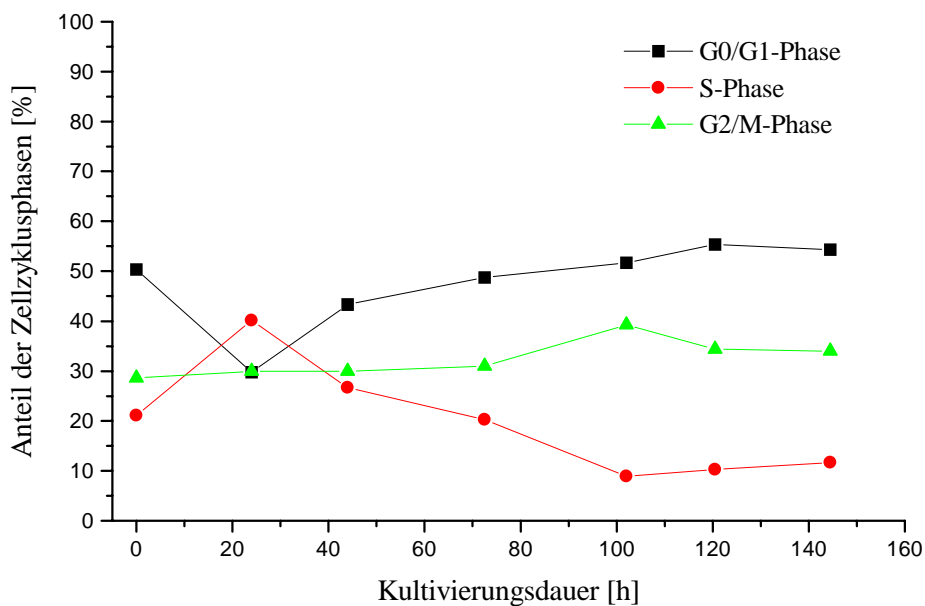


Abb. 7.3: Verlauf der Zellzyklusphasen bei 37°C .

Die Betrachtung der Zellzyklusphasen bei 37°C zeigt einen typischen Verlauf einer Säugerzellkultivierung. Nach einer Adaptionphase von 24 Stunden steigt der Anteil derjenigen Zellen, welche mit der Teilung beginnen an, was am Anstieg der S-Phase von 21% auf über 40% klar zu erkennen ist. Diesem entsprechend sinkt der Anteil der Zellen in der Ruhephase auf unter 30%. Der weitere Verlauf der Kultivierung ist von einem steten Abfall der Synthesephase bis auf unter 10% geprägt, welches das Ende der exponentiellen Wachstumsphase anzeigt. Der Anteil der Zellen, welche in die Ruhephase eintreten steigt kontinuierlich bis auf über 50% nach 120 Stunden, ab hier befindet sich die Kultur in der stationären Phase.

Die Betrachtung einer Kultivierung von CHO-Zellen bei 31°C zeigt anfänglich einen ähnlichen Verlauf. Der Anteil der Zellen in der S-Phase steigt jedoch hier auf fast 50% nach



einer Adaptionszeit von 24 Stunden. Im weiteren Verlauf ist im Gegensatz zur 37°C-Kultivierung ein steiler Anstieg der Zellen in der Ruhephase mit einem Maximum von 78% nach 100 Stunden zu beobachten. Der S-Phasen-Anteil sinkt stärker als bei 37°C rapide auf unter 10% nach 100 Stunden. Hiernach ist ein kurzer Anstieg nach 120 Stunden zu erkennen. Der G2/M-Phase-Anteil verläuft anfangs um 24 Stunden in ähnlicher Weise verschoben. Dies zeigt deutlich, daß aufgrund der geringeren Temperatur die Teilungsaktivität stark reduziert wird und sich schon nach 72 Stunden die Mehrheit der kultivierten Zellen in einem teilungsinaktiven Stadium befindet. Im Gegensatz zur 37°C-Kultivierung bleibt der S-Phasen-Anteil jedoch bis nach 120 Stunden konstant, mit einem geringen Anteil von Zellen in der G2/M-Phase. Die Zellen scheinen die S-Phase noch zu erreichen, können aber aufgrund der zu geringen Temperatur die Zellteilung nicht abschliessen.

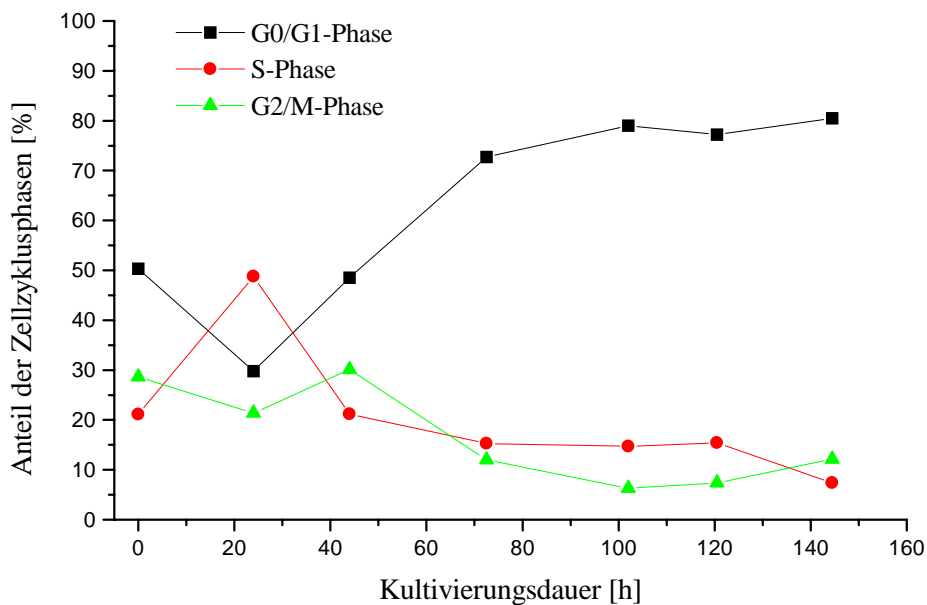


Abb. 7.4: Verlauf der Zellzyklusphasen bei 31°C .

Die Kombination von Zellzyklusbestimmung und Detektion des intrazellulären t-PA-Gehaltes liefert weitere Hinweise auf die Expression während der aktiven Teilung.

Die t-PA-Produktion auf intrazellulärer Basis ist in Abb. 7.5 gezeigt. Der Verlauf des intrazellulären t-PA-Gehaltes zeigt bei 37°C eine t-PA-Produktion über 80 Stunden von gleichbleibend 60% des Maximalwertes. Hiernach erfolgt eine Steigerung bis zu einem

Maximum in der 120sten Stunde, hiernach sinkt der t-PA-Gehalt rasch ab. Bei der 31°C-Kultivierung hingegen ist nach einem Tag der Kultivierung ein kurze Produktionsspitze auf 85 % des Maximalwertes zu erkennen. Der Verlauf der Kultivierung zeigt einen ähnlichen Verlauf wie bei 37°C, wohingegen der intrazellulären t-PA-Gehalt gleich oder leicht über dem der 37°C-Kultivierung liegt.

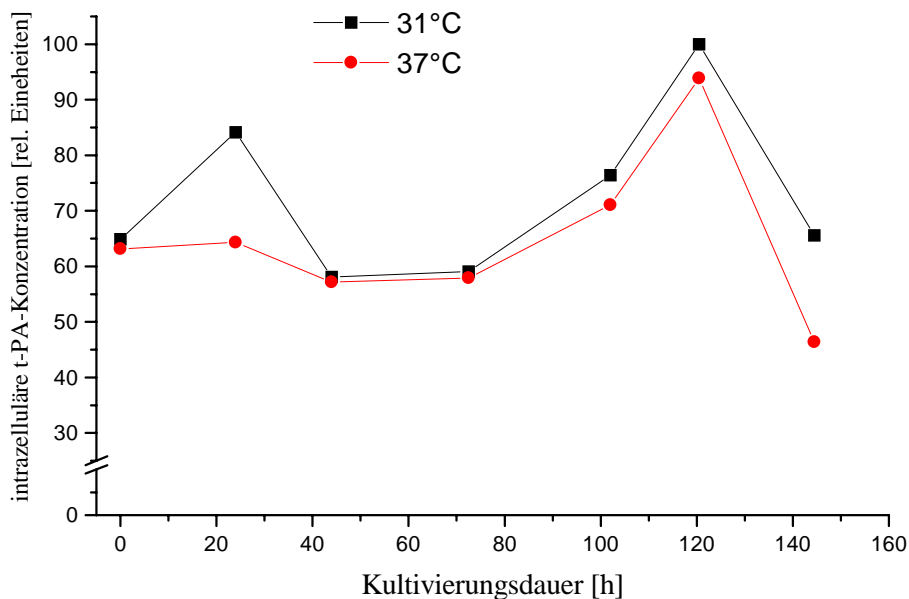


Abb. 7.5: Verlauf der intrazellulären t-PA-Konzentration bei Kultivierungen von 31° C und 37° C

Der Vergleich mit dem Verlauf der Zellzyklusphasen zeigt einen Zusammenhang mit dem stärkeren Ansteigen der S-Phase bei der 31°C-Kultivierung nach 24 Stunden. Dies deutet darauf hin, daß t-PA verstärkt in der S-Phase produziert wird. Nach der 80sten Stunden jedoch ist weiterhin bei beiden Temperaturen ein Ansteigen der intrazellulären t-PA-Konzentration zu beobachten, was aufgrund des gesunkenen S-Phasenanteils auf eine Anreicherung in den Zellen schließen läßt. Der Abfall der Konzentration zum Ende der Kultivierung läßt sich durch den Anstieg toter oder geschädigter Zellen mit einer permeabilisierten Membran erklären. Hier werden verstärkt die Zellinhaltsstoffe in das Medium abgegeben. Die immer leicht erhöhte Konzentration von t-PA in bei 31°C kultivierten Zellen gegenüber den bei 37°C kultivierten kann auf den über längere Zeit konstanten S-Phasenanteil zurückzuführen sein. Dadurch das sie den Restriktionspunkt überschreiten, synthetisieren sie DNA und somit auch t-PA, können aber die Zellteilung nicht abschließen, was zu geringeren Lebendzellzahlen führt.

Abb. 7.6 zeigt den Verlauf der Konzentration von extrazellulären t-PA. Die Konzentrationen wurden durch einen t-PA-ELISA (BioPool, Schweden) bestimmt. Bei beiden Temperaturen steigt die t-PA-Konzentration im Medium bis nach 100 Stunden. Bis zum Ende der Kultivierung nach 145 Stunden bleibt die t-PA-Konzentration nahezu konstant. Bei 37°C kann zu jedem Kultivierungszeitpunkt eine höhere Konzentration des rekombinanten Proteins festgestellt werden.

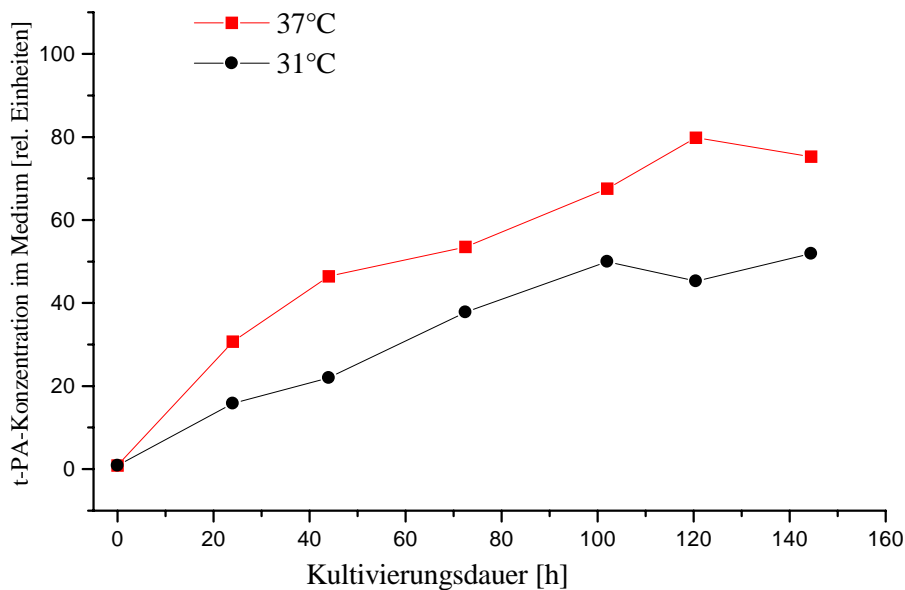


Abb. 7.6 Konzentration von t-PA im Medium bei 31°C und 37°C

Die geringere t-PA-Menge im Medium bei 31°C ist allerdings von wesentlich weniger Zellen produziert worden, was sich in einer hohen spezifischen Produktionsrate der bei 31°C kultivierten Zellen ausdrückt. Abb. 7.7 zeigt die spezifischen t-PA-Produktionsraten bezogen auf extrazelluläres t-PA im Medium. Die 37°C-Kultivierung zeigt einen steten Abfall der spezifischen Produktion (t-PA-Menge je  $10^6$  Zellen pro Tag), wohingegen die 31°C auf hohem Niveau von ca. 85% des Maximalwertes bleibt, nach 60 Stunden auf das Maximum steigt und erst nach 102 Stunden absinkt. Die spezifische Produktionsrate bei 37°C liegt fast die gesamte Kultivierung weit unter der 31°C-Kultivierung. Dies läßt sich durch das konstante Eintreten von Zellen in die S-Phase, welche mit der t-PA-Produktion verknüpft ist, erklären. Die Zellen, welche aufgrund der geringen Temperatur die G2/M-Phase nicht erreichen und somit sich nicht weiter teilen, können nun ihre Energiereserven zur t-PA-Produktion nutzen. Bei 37°C mit höheren Zellzahlen, vollenden alle ihre Teilungsvorgänge und gehen in unproduktive Ruhe- oder G1-Phasen über.

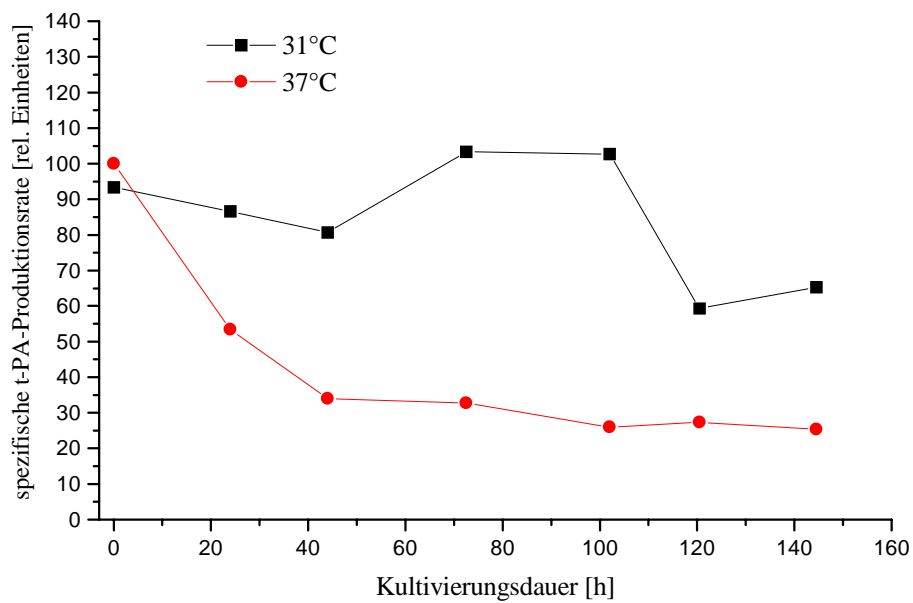


Abb. 7.7: Spezifische t-PA-Produktionsrate bei 31°C und 37°C

Um die festgestellte S-Phasen-Abhängigkeit der t-PA-Produktion zu bestätigen, wurde die Färbung der Zellen mit t-PA-FITC-Antikörper mit einer Zellzyklusmessung in einer Probe

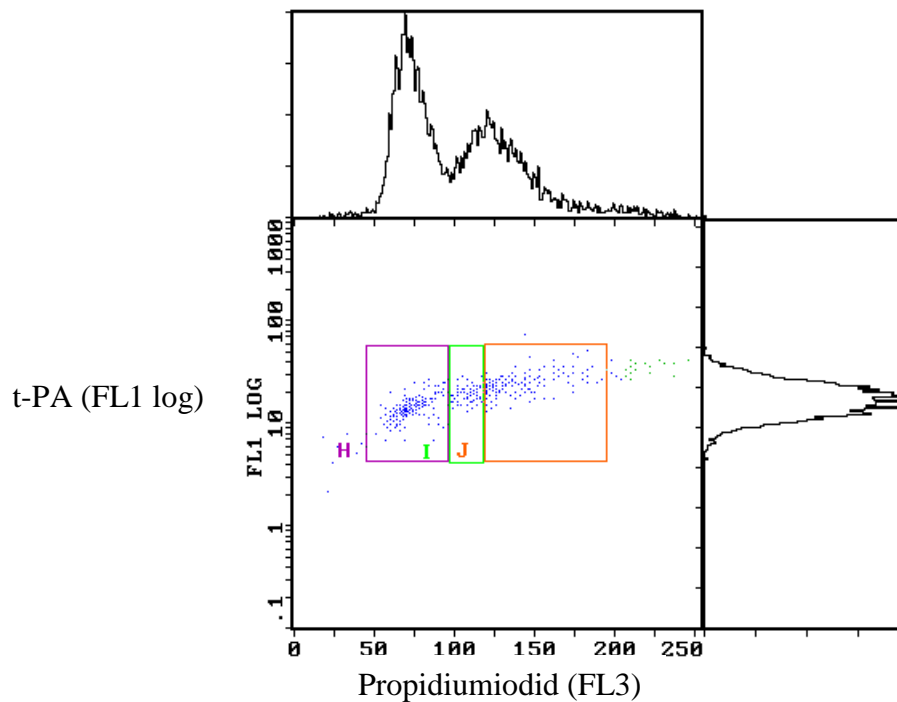


Abb.7.8.: Intrazellulärer t-PA-Gehalt in den einzelnen Zellzyklusphase G0/1 (H), S (I) und G2/M (J)

kombiniert. Durch den eingesetzten DNA-Farbstoff Propidiumiodid ist aufgrund seines im roten Bereich liegenden Emissionsmaximums eine gleichzeitige Messung mit FITC nach Kompensation der sich nur leicht überlappenden Emissionsspektren möglich. Abb. 7.8 zeigt die Auftragung der relativen intrazellulären t-PA-Konzentration gegen die Zellzyklusbestimmung mit Propidiumiodid. Zur Verdeutlichung sind die eindimensionalen Parameter an den Achsen zusätzlich aufgetragen. Durch Bestimmung des Mittelwertes an FITC-Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellzyklussubpopulationen kann eine um 74 % höhere t-PA-Konzentration in der S-Phase und im 79% höhere in der G2/M-Phase gegenüber den Zellen in der Ruhe- oder G1-Phase festgestellt werden. Dies belegt somit die Vermutung einer Synthese des rekombinanten Proteins während der aktiven Teilung.

#### **7.4 Zusammenfassung und Diskussion**

Das entwickelte Verfahren zur intrazellulären t-PA-Produktion in Kombination mit weiteren durchflußcytometrisch detektierten Parametern gibt weitere Einblicke in die Produktion des rekombinanten Proteins. Somit ist eine schnelle Detektion der durch die Temperaturenniedrigung verringerten Teilungsaktivität und des Übergangs in inaktive Stadien der Kultivierung bei 31°C nach 72 Stunden möglich. Durch die Untersuchungen des Zellzyklusses kann belegt werden, daß die Zellen im Gegensatz zur 37°C-Kultivierung einen konstanten S-Phasen-Anteil bis nach 120 Stunden ausweisen. Dies deutet darauf hin, daß die Zellen die Synthese-Phase noch zu erreichen, sie aber aufgrund der zu geringen Temperatur nicht abschliessen.

Die Erweiterung mit einer Detektion des intrazellulären t-PA-Gehaltes zeigt, daß der intrazelluläre Gehalt der 31°C-Kultivierung gleichauf oder leicht über dem der 37°C-Kultivierung liegt, was auf den erhöhten S-Phasenanteil zurückzuführen sein dürfte. Dadurch das sie den Restriktionspunkt überschreiten, synthetisieren sie DNA und somit auch t-PA, können die Zellteilung aber nicht abschließen, was zu geringen Lebendzellzahlen führt.

Das Auftreten des starken Anstiegs der S-Phase bei der 31°C-Kultivierung nach 24 Stunden mit einem gleichzeitig erhöhten intrazellulären t-PA-Gehalt weist ebenfalls darauf hin, daß t-PA verstärkt in der S-Phase produziert wird.

Die spezifische Produktionsrate bei 37°C liegt fast die gesamte Kultivierung weit unter der 31°C-Kultivierung. Aufgrund der geringeren Lebendzellzahl bei gleichzeitig verstärkter t-PA-Produktion ergibt sich die hohe spezifische Produktionsrate der bei 31°C kultivierten Zellen. Die Zellen, welche aufgrund der geringen Temperatur sich nicht weiter teilen, nutzen ihre Energiereserven verstärkt zur t-PA-Produktion und geben dies in das Medium ab. Dies verursacht einen Anstieg der Gesamt-t-PA-Konzentraion im Medium. Trotz der bei 37° erhaltenen höheren Zellzahlen, vollenden bei dieser Temperatur alle ihre Teilungsvorgänge und benötigen weiterhin Zeit bis eine neue Zellteilung der Tochterzellen stattfinden kann. In diesem Zeitraum findet keine Produktion des rekombinanten Proteins statt, was die geringere Effizienz erklärt.

## 8 Durchflußcytometrische Detektion intrazellulärer Enzyme

*Kluyveromyces fragilis* ist eine industriell eingesetzte Hefe zur Produktion des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase. Die Darstellung des Enzyms wird durch Lactosegabe während einer Kultivierung induziert [Joshi, 1987]. Durch durchflußcytometrische Detektion des Zellzyklusses, der intrazellulären  $\beta$ -Galactosidaseproduktion sowie der Zellgrößenverteilung und des Protein- und RNA-Gehaltes in Kombination mit den routinemäßig gewonnen offline Daten, sollen intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge während der Fermentation weiter aufgeklärt werden.

### 8.1 Kultivierungsbedingungen und durchflußcytometrische Methoden

Die Hefen wurden in glukosehaltigem Medium mit 10% Lactose bei pH 4.5 kultiviert. Zellen aus der achtzehnten Stunde der Vorkultur wurden aus Inokulum für die Fermentation eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 30° C für 24h (Rührergeschwindigkeit 145 rpm). Es erfolgte eine Permeabilisierung der frisch geernteten Zellen mit 0.1% Cetyltrimethylammoniumbromid für 5 min bei 25° C behandelt mit einem anschließenden Waschschrift pH 7.1 mit PBS. Mit Ausnahme der Zellgrößenbestimmung wurden alle Proben permeabilisiert.

Die Detektion des Zellzyklusses und der Zellgröße erfolgt nach dem in Kap. 3 beschriebenen Verfahren. Im Gegensatz hierzu wurden hier der Farbstoff Sytox Green (1  $\mu$ M Sytox Green /ml Citratpuffer, pH 4.5, 50 mM) eingesetzt, welcher bei Hefen eine höhere Auflösung des Zellzyklusses ermöglicht und bei 520 nm detektierbar ist. Weiterhin ist im Gegensatz zu Tierzellen die Inkubationsdauer auf 12h bei 37°C geändert wurden, um eine vollständige Zerstörung der RNA der Hefen zu erreichen, dessen intrazelluläre Konzentration hier erheblich größer ist.

Zur RNA-Bestimmung wurde anstelle der RNase in der Zellzyklusmessung DNase eingesetzt (s. Kap. 3.4). Die Bestimmung des intrazellulären Proteingehaltes erfolgte mit FITC [Freeman 1975] (Endkonzentration: 50  $\mu$ g/ml, Inkubation 30 min RT).

Die Bestimmung des intrazellulären  $\beta$ -Galactosidasegehaltes beruht auf der Umsetzung von Fluoro-di-galactopyranoside (FDG) durch das Enzym  $\beta$ -Galactosidase [Wittrup 1988, Haughland 1995]. Hierdurch wird Fluorescein abgespalten und ist somit





Beginn der exponentiellen Phase erkennbar. Ein Überschreiten des Restriktionspunktes als Zeichen der aktiven Teilung ist somit bis zur achten Stunde detektierbar, was als Steigerung der optischen Dichte zeitversetzt zu beobachten ist.

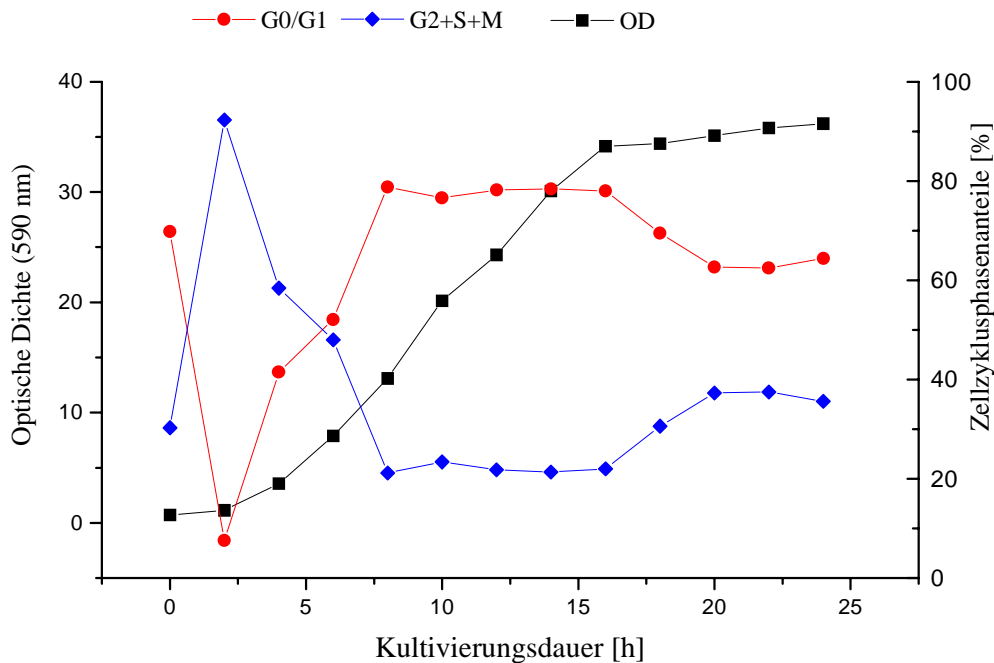


Abb. 8.1: Verlauf der Zellzyklusphasen und der optischen Dichte

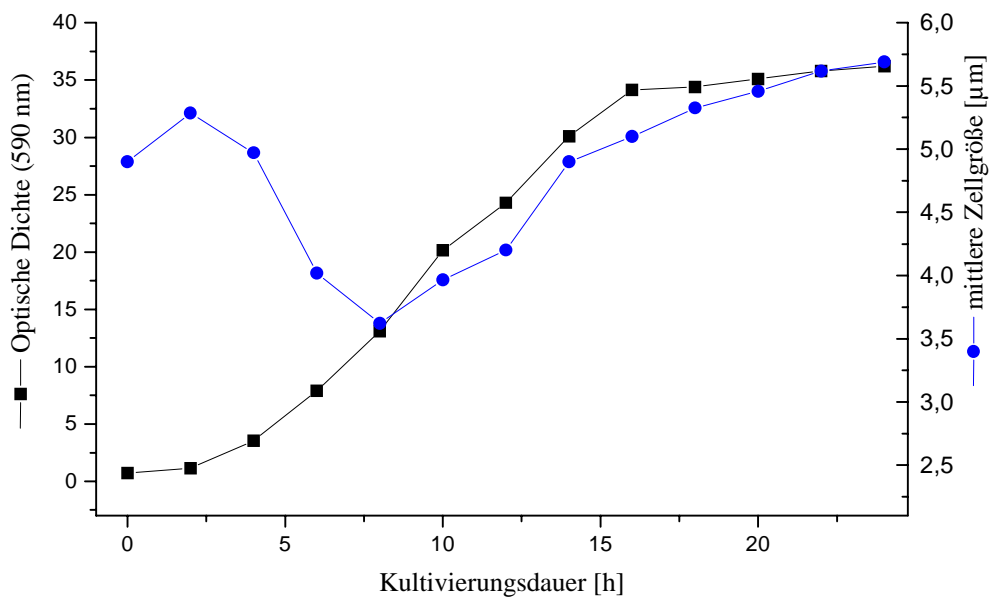


Abb. 8.2: Verlauf der optische Dichte und der mittleren Zellgröße

Der Vergleich zwischen optischer Dichte und durchflußcytometrisch detektierter mittlerer Zellgröße ist in Abb. 8.2 dargestellt. Im Gegensatz zur optischen Dichte weist die mittlere Zellgröße ein Maximum nach vier Stunden auf, gefolgt von einem Abfall auf den kleinsten gemessenen Wert von  $3.6 \mu\text{m}$  nach acht Stunden. Hiernach verläuft der Anstieg der Zellgröße gleichförmig mit dem der optischen Dichte.

Das Maximum nach vier Stunden ist auf den höchsten Anteil an S+G2+M-Phasen zurückzuführen. In den ersten acht Stunden der Kultivierung sind ähnliche Verläufe zu beobachten. Durch den hohen Anteil der größeren, knospenden Zellen, welche sich aktiv teilen, steigt auch die mittlere Zellgröße.

Bei Detektion des RNA-Gehaltes ist zu beobachten, daß er zuerst wie der Verlauf der S+G2+M-Phase bis zur sechsten Stunde abfällt, dann aber schnell bis zur zwölften Stunde ansteigt. Hiernach folgt eine Stagnation und darauf sinkt der Wert zum Ende der Kultivierung wieder leicht ab (Abb. 8.3). Der Gehalt intrazellulären Proteins wird wie die intrazelluläre Enzymkonzentration von der Zellgröße beeinflusst. So weist er ein Maximum nach sechs Stunden auf, sinkt bis auf 50 % des Ausgangswertes, um bis zum Ende der Fermentation auf 70% anzusteigen.

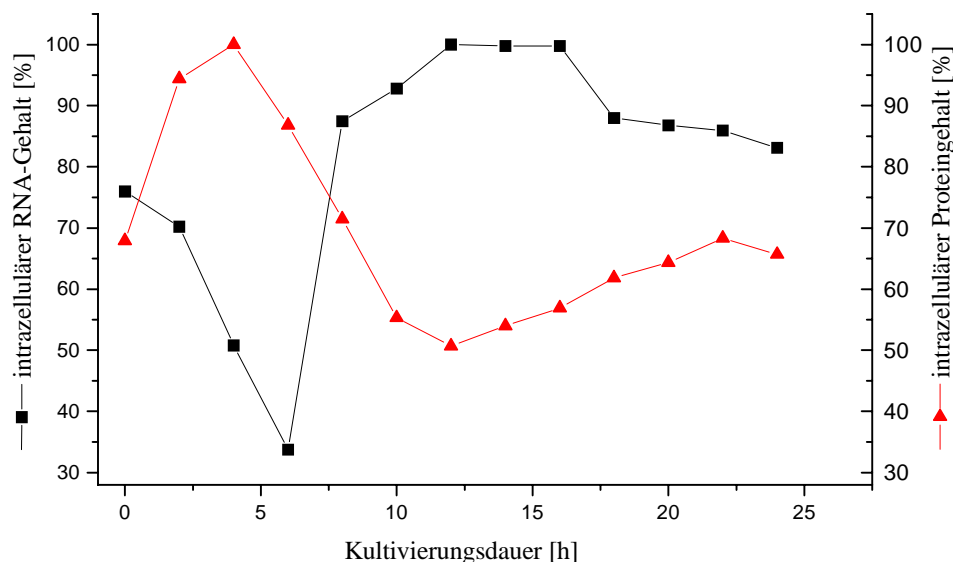


Abb. 8.3 Intrazelluläre RNA- und Protein-Konzentrationen in % des Maximalwertes

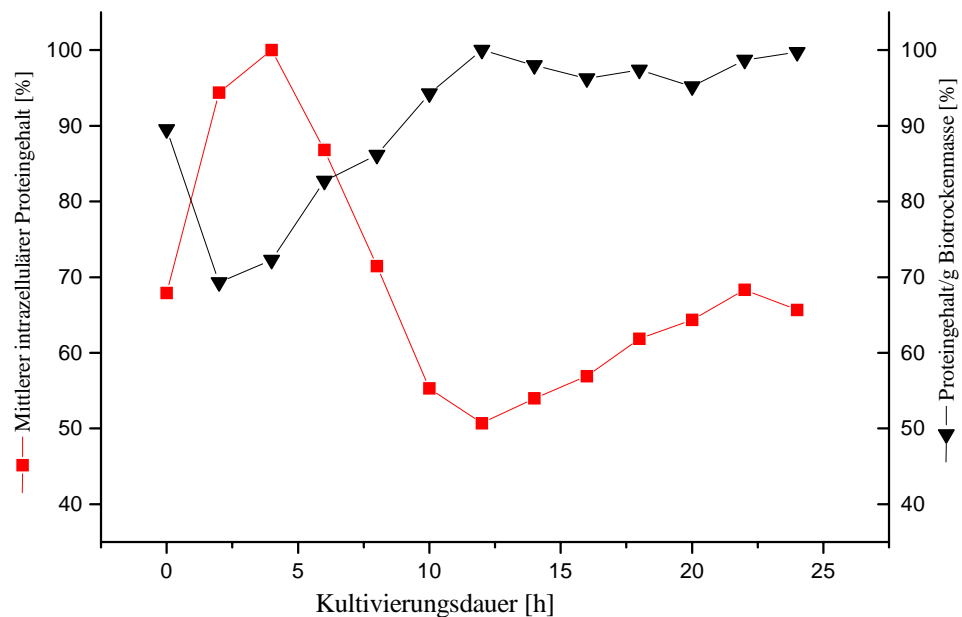


Abb. 8.4: Vergleich der Konzentration des mittleren intrazellulären absoluten Proteingehaltes mit dem Gesamtproteingehalt in der Biomasse

Abb. 8.4 zeigt den Verlauf der mittleren absoluten intrazellulären Proteinkonzentration und auf die Biomasse bezogenen Gesamtproteingehaltes auf. Der Gehalt intrazellulärer Proteine wird wie die intrazelluläre Enzymkonzentration von der Zellgröße beeinflusst, weist somit ein Maximum bei 6 Stunden auf, sinkt bis auf 50 % des Ausgangswertes, um bis zum Ende der Kultivierung auf 70% anzusteigen. Der Gesamtproteingehalt/Biomasse zeigt hingegen ein Minimum nach vier Stunden und steigt bis nach zwölf Stunden auf seinen Maximalwert, bei welchem er bis zum Ende der Kultivierung stagniert.

Beim Verlauf der intrazellulären mittleren Galactosidekonzentration ist zunächst ein starker Abfall vom Maximalwert beim Animpfen auf unter 40% in der sechsten Stunden zu erkennen. Hierauf erfolgte eine kontinuierliche Steigerung bis auf 70% der maximalen intrazellulären Konzentration. Bis zum Ende der Kultivierung nach 24 Stunden sinkt der Gehalt wieder auf ca. 40%.

Der starke Abfall zu Beginn wird auf die in dieser Zeit hohe Teilungsaktivität zurückzuführen sein, wie auch der hohe Anteil an Zellen in der S-, G2- und M-Phase unterstreicht (vgl. Abb.

8.1). Durch die zunehmende Bildung junger kleiner Zellen sinkt die absolute Konzentration in den Zellen. Mit zunehmender Größe steigt auch wieder der intrazelluläre  $\beta$ -Galactosidasegehaltes.

Die  $\beta$ -Galactosidasekonzentration bezogen auf die gesamte Biomasse weist ein Maximum nach vier Stunden auf. Hierauf folgt ein Abfall bis nach zwölf Stunden, woraufhin zum Ende der Kultivierung die Gesamtkonzentration im Medium auf 70% des Maximalwertes steigt.

Der von der ersten Stunde der Kultivierung fast linear abnehmende Konzentration des Eduktes Lactose deutet auf eine kontinuierliche Spaltung hin, jedoch zu Gewinnung von Energiereserven für unterschiedliche Zwecke.

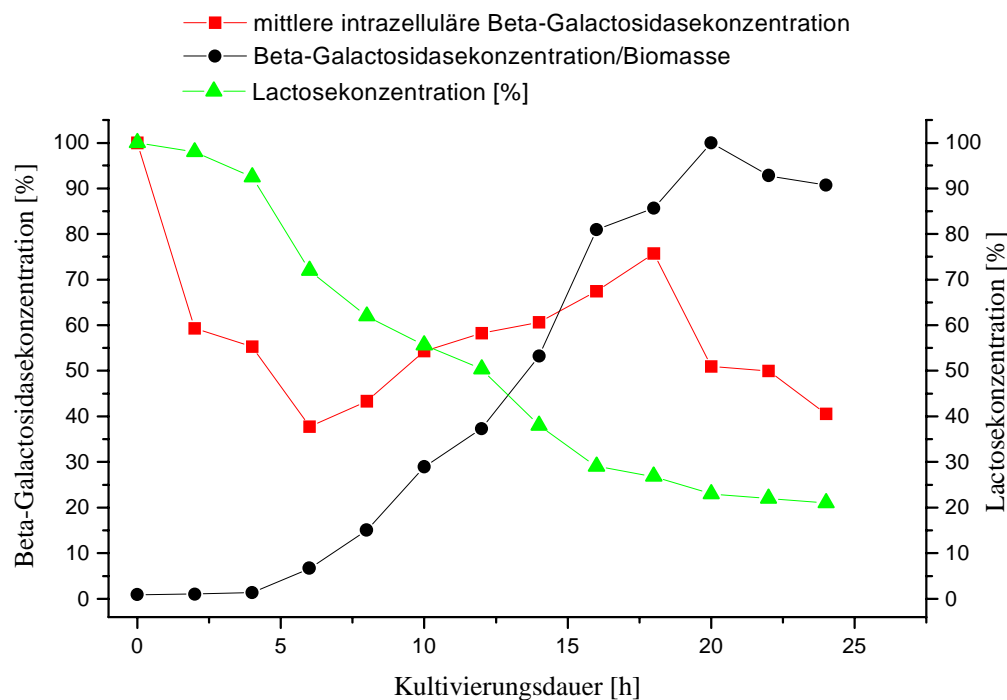


Abb. 8.5: Galactosidasekonzentration pro Zelle und Biomasse im Vergleich zur Lactosekonzentration

### 8.3 Zusammenfassung und Diskussion

Durch die Möglichkeit, auch intrazelluläre Enzyme durch mit Fluoreszenzfarbstoffen kombinierten Substraten auf Einzelzellbasis zu detektieren, erweitert die Möglichkeiten den Kultivierungsprozess zu analysieren. Durch Kombination der durchflußcytometrisch zugänglichen Parameter konnte der Verlauf des produzierten Enzyms  $\beta$ -Galactosidase

intrazellulär und bezogen auf die gesamte Biomasse verglichen werden. Weiterhin liefern die Analyse der RNA- und Proteinkonzentrationen weitere Aufschlüsse über die Mechanismen der Produktexpression während der Kultivierung.

Durch die Zellzyklusanalyse konnte der Beginn der verstärkte Teilungsaktivität nach vier Stunden festgestellt werden. Dies ist vier Stunden später auch im Anstieg optischen Dichte als Beginn der exponentiellen Phase erkennbar. Ein Überschreiten des Restriktionspunktes als Zeichen der aktiven Teilung ist somit bis zur achten Stunde detektierbar, was als Steigerung der optischen Dichte zeitversetzt zu beobachten ist.

Die Analyse der mittleren Zellgröße bestätigt dies durch sein Maximum nach vier Stunden, zu welchem Zeitpunkt auch der höchsten Anteil an S+G2+M-Phasen zu beobachten ist. Die ersten acht Stunden der Kultivierung sind ähnliche Verläufe zu beobachten. Durch den hohen Anteil der größeren, knospenden Zellen, welche sich aktiv teilen, steigt auch die mittlere Zellgröße.

Der Gehalt intrazellulären Proteins wird wie die intrazelluläre Enzymkonzentration von der Zellgröße beeinflusst. Das Maximum liegt nach sechs Stunden der Kultivierung und sinkt bis auf 50 % des Ausgangswertes, um bis zum Ende der Kultivierung auf 70% anzusteigen. Der Gesamtproteingehalt/Biomasse zeigt hingegen ein Minimum nach vier Stunden und steigt bis nach zwölf Stunden auf seinen Maximalwert, bei welchem er bis zum Ende der Kultivierung stagniert

Die Konzentration des Eduktes Lactose nimmt fast linear abnehmend ab, was jedoch keine Aussage über den Einsatz der Energiereserven zuläßt. Beim Verlauf der intrazellulären mittleren Galactosidasekonzentration hingegen ist zunächst ein starker Abfall detektierbar, was auf die zu diesem Zeitpunkt erhöhte Teilungsaktivität zurückzuführen sein dürfte, wie auch der hohe Anteil an Zellen in der S-, G2- und M-Phase unterstreicht. Durch die zunehmende Bildung junger kleiner Zellen sinkt die absolute Konzentration in den Zellen. Mit zunehmender Größe steigt auch wieder der intrazelluläre  $\beta$ -Galactosidasegehalt.

Im Gegensatz zur intrazellulären Produktion von  $\beta$ -Galactosidase ist der Gehalt auf die gesamte Biomasse mit einem Maximalwert nach vier Stunden verbunden. Bis zur Hälfte der Kultivierungsdauer erfolgt ein Rückgang der Konzentration, welche sich bis zum Ende der Kultivierung wieder auf 70% des Maximalwertes steigert.

## 9 Bioprozeßbeobachtung an synchronen Hefekulturen

Durchflußcytometrisches Bioprozeßmonitoring ermöglicht es, sowohl die absolute Zellgröße, die Zellgrößenverteilung als auch Zellzahl, Vitalität und Zellzyklus zu ermitteln. Kultivierungen von oszillierenden *Saccharomyces cerevisiae* im kontinuierlichen Betrieb sollen als Modell für durchflußcytometrische real-time Analytik dienen, um weiterführende Einblicke in die Stoffwechselfvorgänge und des Wachstumsverhaltens synchroner Hefekulturen zu liefern. Weiterhin soll ein Vergleich mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erfolgen, welche Fluoreszenzspektren des gesamten Reaktorinhalts liefert, um die detektierbaren Parameter zu vergleichen und zu ergänzen.

### 9.1 Synchrones Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae*

Als synchrones Wachstum bezeichnet man die simultane Teilung einer Mehrheit der Zellen in einer Kultivierung. Synchrones Wachstum ist ein spezieller Fall des kontinuierlichen Wachstums von Mikroorganismen, bei dem die Variablen einer Kultur ohne äußere Einflußnahmen oszillieren.

Das synchrone Wachstum von *S. cerevisiae* weist Perioden von einigen Stunden auf und tritt nur unter bestimmten Bereichen des pH-Wertes, der Verdünnungsrate und des Gelöstsauerstoffgehaltes auf. Durch die Verdünnungsrate kann die Periodenlänge variiert werden [Marose, 1999].

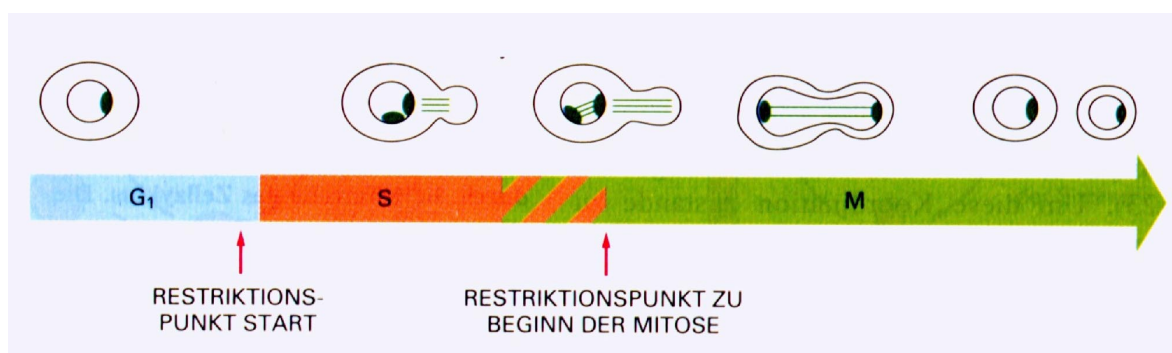


Abb. 9.1: Zellzyklus von *S. cerevisiae* (Alberts et. al., 1997)

Der Zellzyklus von *S. cerevisiae* unterscheidet sich durch eine Knospung der Tochterzelle während des Teilungsprozesses von Säugerzellkulturen (vgl. Kap. 2.3).

Während der Synthesephase wird eine Knospe an der Mutterzelle sichtbar und eine Spindel aus Mikrotubuli wird gebildet. Am Übergang zur M-Phase kommt es zum gleichmäßigen Aufteilen des Genoms auf Mutter- und Tochterzelle.

## 9.2 Kultivierungsbedingungen

Die Mikroorganismen wurden kontinuierlich in einem 2l-Reaktor (Biostat M, B. Braun Biotech GmbH, Melsungen) bei 30° C und pH 4.85 kultiviert. Es wurde Schatzmann-Medium mit 30g/l Glukose eingesetzt. Die Verdünnungsrate betrug 0.13 h<sup>-1</sup>. Wacker-Silikon (Verdünnung 1:1000) kam als Entschäumer zum Einsatz.

Die Online-Messungen erfolgten mit dem 2D-Fluoreszenzspektrometer BioView. Für die durchflußcytometrischen Messungen des Zellzyklusses wurden alle Zellen nach der Probenahme mit 70% Ethanol fixiert (siehe Anhang). Die Messung des Zellzyklusses erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sytox Green (Molecular Probes) mit einer im Vergleich zu Säugerzellen verlängerten Inkubationszeit der RNase auf 12 Stunden (vgl. Kap. 7.1).

Für die Messungen der Zellzahl und Zellgrößenverteilung wurden nicht fixierte Hefen eingesetzt.

## 9.3 Detektion von Vitalität, Lebendzellzahl und mittlerer Größe

Mit Hilfe durchflußcytometrischer Untersuchungen wurden parallel Lebendzellzahl, Vitalität und mittlere Größe eines Zyklusses detektiert.(Abb. 9.2). Man erkennt eine konstant hohe Vitalität der Kultur von 96%. Während der kontinuierlichen Kultivierungen wurden bei allen synchron wachsenden Hefen hohe Vitalitätswerte erreicht. Die Lebendzellzahl unterliegt Schwankungen im Bereich von 6 bis 8.5·10<sup>6</sup> Zellen/ml, welche auf die oszillierende Teilungsrate der Zellen zurückzuführen sind. Die mittlere Größe variiert im Bereich von 4.5 bis 5.25 µm. Diese Schwankung wird durch die Knospung der Hefen während der Synthesephase (siehe auch Abb. 9.4) verursacht, da die Knospungen der Mutterzellen mit einer Volumenzunahme einhergeht.

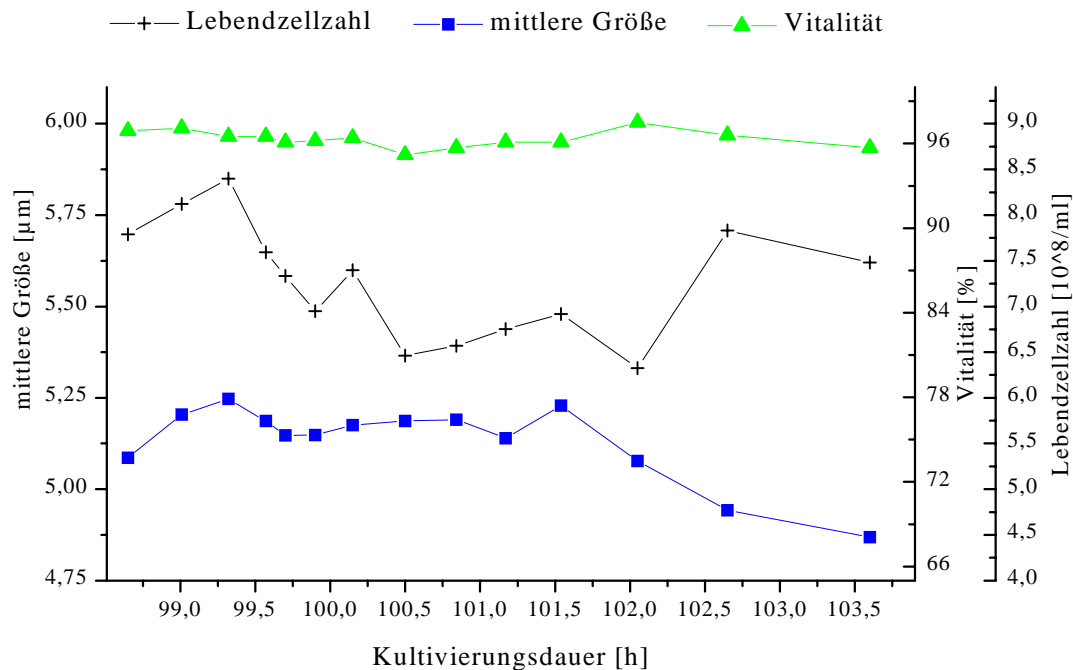


Abb. 9.2: Vergleich von Vitalität, Lebendzellzahl und mittlerer Größe bei synchron wachsenden *S. cerevisiae*

Zur Verdeutlichung der Größenänderungen während einer synchronen Kultivierung wurden die Größenverteilungen aus dem detektierten Vorwärtsstreulicht dem an der  $\text{CO}_2$ -Abgaskonzentration gut erkennbaren Zyklus zugeordnet. Die dargestellte Größenverteilung weist charakteristische Änderungen während eines Zyklus bei einer synchronen Kultivierung auf (Abb. 9.3). Zum Beginn bei einer geringen  $\text{CO}_2$ -Produktion sind zwei Subpopulationen der Hefen zu erkennen. Links ist jeweils der Anteil der kleineren Tochterzellen, rechts die der größeren knospenden Mutterzellen zu erkennen (Größenverteilungen 1 und 2). Zum Emissionsmaximum (3) steigt die Anzahl der Mutterzellen stark an, um im weiteren Verlauf der Kultivierung während der Konstanz der  $\text{CO}_2$ -Produktion (4 und 5) nur langsam innerhalb von 1,5 Stunden abzunehmen. Erst beim erneuten Erreichen des geringsten  $\text{CO}_2$ -Gehaltes im Abgas ist wieder ein Anstieg der Tochterzellen zu beobachten.

Die detektierte Größenverteilung steht in einem engen Zusammenhang mit dem Zellzyklus der Hefezellen (Abb. 9.1). Zu Beginn der Oszillation (Bild 1 und 2) liegen vermehrt sich nicht aktiv teilende, kleinere Tochterzellen vor. Während der aktiven Zellteilung beginnt die



Knospung der Hefen, was ihr Volumen vergrößert. Dies fällt mit dem Maximum der  $\text{CO}_2$ -Produktion zusammen (Bild 3). Im weiteren Verlauf der Zellteilung trennen sich die knospenden Hefezellen wieder in kleinere Tochterzellen auf. Die ist sowohl am Absinken der  $\text{CO}_2$ -Produktion als auch am Anstieg der kleineren Tochterzellen in der Größenverteilung zu erkennen.

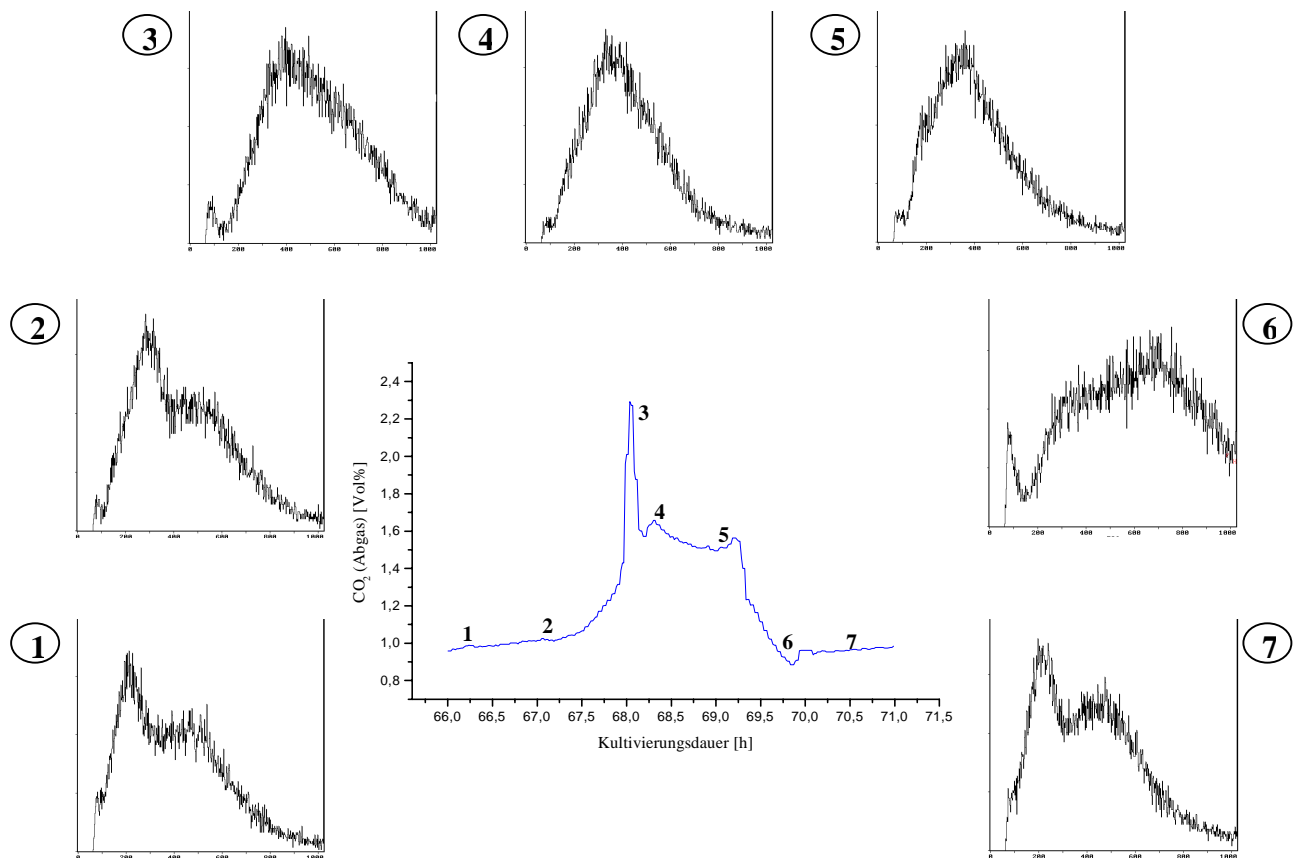


Abb. 9.3: Größenverteilung der Hefezellen während eines Zyklusses.

Die Zellgrößenverteilung weist eindeutig durch den gleichzeitigen Anstieg von Mutterzellanzahl und  $\text{CO}_2$ -Produktion auf einen Zusammenhang zwischen aktiver Teilung und einer erhöhten Stoffwechselaktivität hin. Zur genaueren Bestimmung dieses Zusammenhangs wurden Zellzyklusanalysen an synchronen Kultivierungen vorgenommen.

### 9.4 Zellzyklusbestimmung an oszillierenden *Saccharomyces cerevisiae*

Zwei Zyklen wurden bei der Zellzyklusanalyse im Vergleich zum Verlauf der CO<sub>2</sub>-Produktion und der mittleren Größe gesetzt (Abb. 9.4).

Der Vergleich zur mittleren Größe der Hefen zeigt eine maximale Ausdehnung der Zellen kurz vor Erreichen des CO<sub>2</sub>-Produktionsmaximum, anschließend fällt die mittlere Größe kontinuierlich ab. Dies deutet darauf hin, daß hier knospende Mutterhefen vorliegen, welche kurz vor der Zellteilung stehen. Der starke Anstieg der CO<sub>2</sub>-Produktion kann somit aus der teilungsbedingten stark gestiegenen Stoffwechselaktivität der Zellen resultieren. Hierauf sinkt die mittlere Größe aufgrund der hohen Anzahl neu entstandener Zellen, welche erheblich kleiner sind.

Weitere Hinweise auf diese Zusammenhänge liefert der Proliferationsindex, welcher alle aktiv in der Teilungsphase befindlichen Zellen nach dem Restriktionspunkt, also S, G2 und Mitose-Phase erfaßt. Der starke Anstieg des Proliferationsindex erfolgt simultan zum Anstieg der mittleren Größe vor Erreichen des CO<sub>2</sub>-Produktionsmaximums. Eine Reduktion der Anzahl sich aktiv teilender Zellen ist am Ende der erhöhten CO<sub>2</sub>-Produktion zu finden, welche sich auf die erhöhte Anzahl neuer kleiner Zellen zurückführen läßt, welche noch nicht eine aktive Teilungsphase erreicht haben.

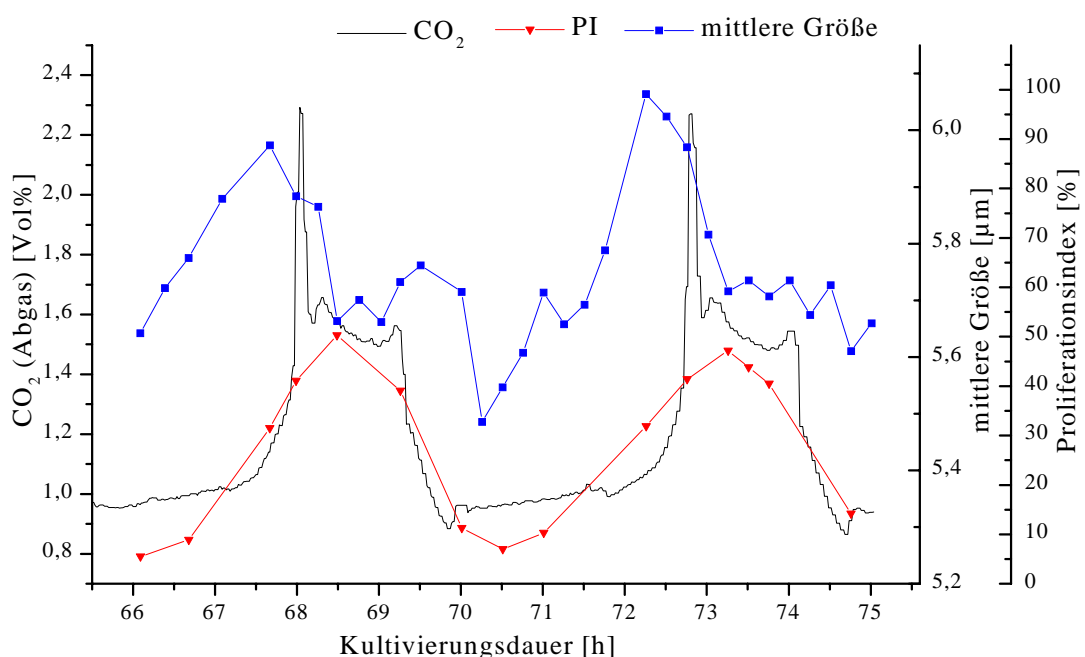


Abb. 9.4: Zellzyklusanalyse, Proliferationsindex (S+G2+M-Phase) und CO<sub>2</sub>-Produktion an oszillierenden Hefekulturen

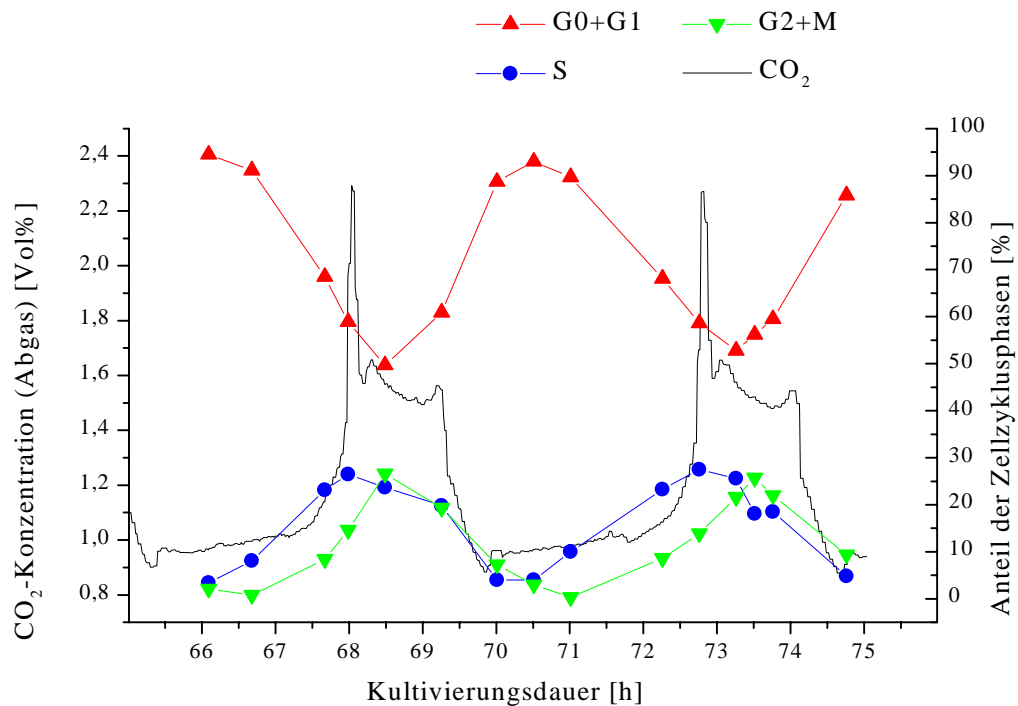


Abb. 9.5: Zellzyklusanalyse und CO<sub>2</sub>-Produktion an oszillierenden Hefekulturen

Um die näheren Zusammenhänge zwischen CO<sub>2</sub>-Produktion und einzelner Zellzyklusphasen zu erkennen, erfolgte eine Aufteilung in G0/G1, S sowie G2/M-Phase. Abb. 9.5 zeigt deutlich den synchronen Verlauf der Kultivierung in allen Phasen der Fermentation.

Die S-Phase steigt als erster Zellzyklusphasenanteil innerhalb eines Zyklusses an. Das Maximum der S-Phase während des sprunghaften Anstieges der CO<sub>2</sub>-Konzentration verdeutlicht den Zusammenhang mit der ansteigenden Teilungsaktivität der Hefezellen. Die hohe Stoffwechselaktivität, erkennbar am Maximum der hohen CO<sub>2</sub>-Produktion, ist somit auf einen starken Energiebedarf für die DNA-Synthese zurückzuführen. Das Maximum der sich kurz vor der Teilung befindlichen Zellen in der G2/M-Phase befindet sich im Sattel der erhöhten CO<sub>2</sub>-Produktionskurve, was auf den weiterhin erhöhten Energiebedarf hindeutet. Beide Phasenanteile haben jeweils ihre geringsten Werte bei der geringsten Kohlendioxidproduktion und somit dem teilungsinaktiven Zeitintervall der Kultivierung. Der entgegengesetzte Verlauf der Ruhephase G0 und der G1-Phase bestätigt dies, indem ein Maximum inaktiver Zellen mit dem Minimum der CO<sub>2</sub>-Produktionskurve zusammenfällt.

## 9.5 Kombination von Durchflußcytometrie und 2-D-Fluoreszenzspektroskopie

Mit 2-D-Fluoreszenz-Messungen wurden Fluoreszenzspektren der gesamten Biomasse detektiert. Hierbei wurde ein Spektrum über einem weiten Wellenlängenbereich von 280 bei 700 nm (Extinktion und Emission) aufgenommen. Die natürlich fluoreszierenden Zellinhaltsstoffe wie FAD oder NADH konnten somit nicht invasiv bestimmt werden und ermöglichten online Einblicke in den Status einer Kultur.

In Abb. 9.6 ist ein Vergleich einer Zellzyklusanalyse mit der durch 2D-Fluoreszenzmessungen detektierten NADH-Konzentration (Em.: 390 nm, Ex.: 440 nm) während eines Zyklusses einer synchronen Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* dargestellt.

Die NADH-Konzentration weist während eines Zyklusses einen markanten sprunghaften Anstieg auf. Der Vergleich mit dem Verlauf der Synthese-Phase zeigt zur Zeit dieses Anstiegs sein Maximum. Ebenso verläuft der langsame kontinuierliche Anstieg der S-Phase gleichzeitig mit einer Zunahme des intrazellulären NADH-Gehaltes ab.

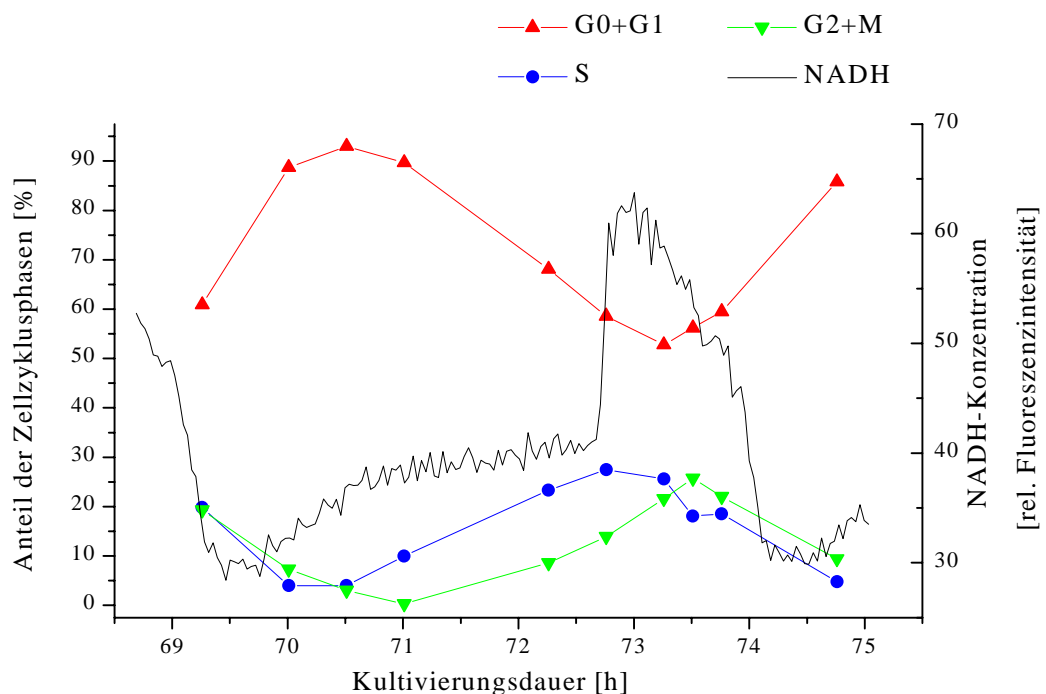


Abb. 9.6: Vergleich von NADH-Konzentration und Zellzyklusanalyse während einer Oszillation

Dies deutet auf die Notwendigkeit einer höheren NADH-Konzentration bei einer ansteigenden Stoffwechselaktivität hin, was durch die Funktion von NADH im Zellstoffwechsel leicht zu erklären ist. Der zur S-Phase leicht verschobene Verlauf der G2/M-Phase zeigt ein Maximum, als die NADH-Konzentration bereits sinkt. In der letzten Phase der Zellteilung sinkt somit der intrazelluläre NADH-Bedarf. Der Anteil der Zellen, welche sich nicht aktiv teilen (G0/G1-Phase), verläuft gegensätzlich und weist seinen höchsten Anteil bei einer geringen Konzentration von NADH auf. Durch eine in der Ruhephase geringere Stoffwechselaktivität läßt sich dies leicht erklären. Der Vergleich zum Verlauf der CO<sub>2</sub>-Konzentration (Abb. 9.5) zeigt, daß der NADH-Anstieg mit dem Maximum der CO<sub>2</sub>-Produktion zusammenfällt. Dies deutet ebenso auf die erhöhte Stoffwechselaktivität hin. Der NADH-Konzentrationsverlauf kann auch auf einen Wechsel vom oxidativen zu einem reduktiven Stoffwechsel erklärt werden [Marose 1999]. Nach Initiierung der Sprossung findet aufgrund des hohen Energiebedarfs eine Mobilisierung des reduktiven Stoffwechsels statt. Dies fällt mit dem Maximum an CO<sub>2</sub>-Produktion, NADH-Konzentration sowie des höchsten S-Phasenanteils zusammen.

Eine weitere Hefekultivierung verdeutlicht die gute Ergänzung von Durchflußcytometrie und 2D-Fluoreszenzspektroskopie.

Abb. 9.7 gibt eine Übersicht der durch beide Verfahren erhaltenen Ergebnisse. Die durch die CO<sub>2</sub>-Produktion leicht erkennbaren Zyklen der synchronen Kultivierung werden durch weitere Vergleiche mit den intrazellulären Protein- und Lipidkonzentrationen sowie der Zellzyklusanalyse sinnvoll ergänzt.

Der Anteil der Zellen in der Ruhe oder G1-Phase verläuft ähnlich. Bei geringstem CO<sub>2</sub>-Ausstoß befinden sich die wenigsten Zellen in der G0/G1-Phase und ein Maximum des Zellanteils liegt beim Höchstwert der CO<sub>2</sub>-Produktion. Gegenläufig verhalten sich die Anteile der Synthese- und G2/M-Phase, welche ihr Maximum am Höchstwert in der S-Phase bzw. am Ende der Schulter des CO<sub>2</sub>-Ausstoßes (G2M-Phase) besitzen. Der Anstieg des Zellanteils mit erhöhter DNA-Synthese gleichzeitig mit einem steigenden CO<sub>2</sub>-Ausstoß deutet auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität hin. Die aktive Teilung (M-Phase) benötigt weit weniger Energiereserven.

Weitere Hinweise hierfür liefert der NADH-Konzentrationsverlauf, dessen Erhöhung parallel zur steigenden CO<sub>2</sub>-Produktion und des anwachsenden S-Phasenanteils verläuft.

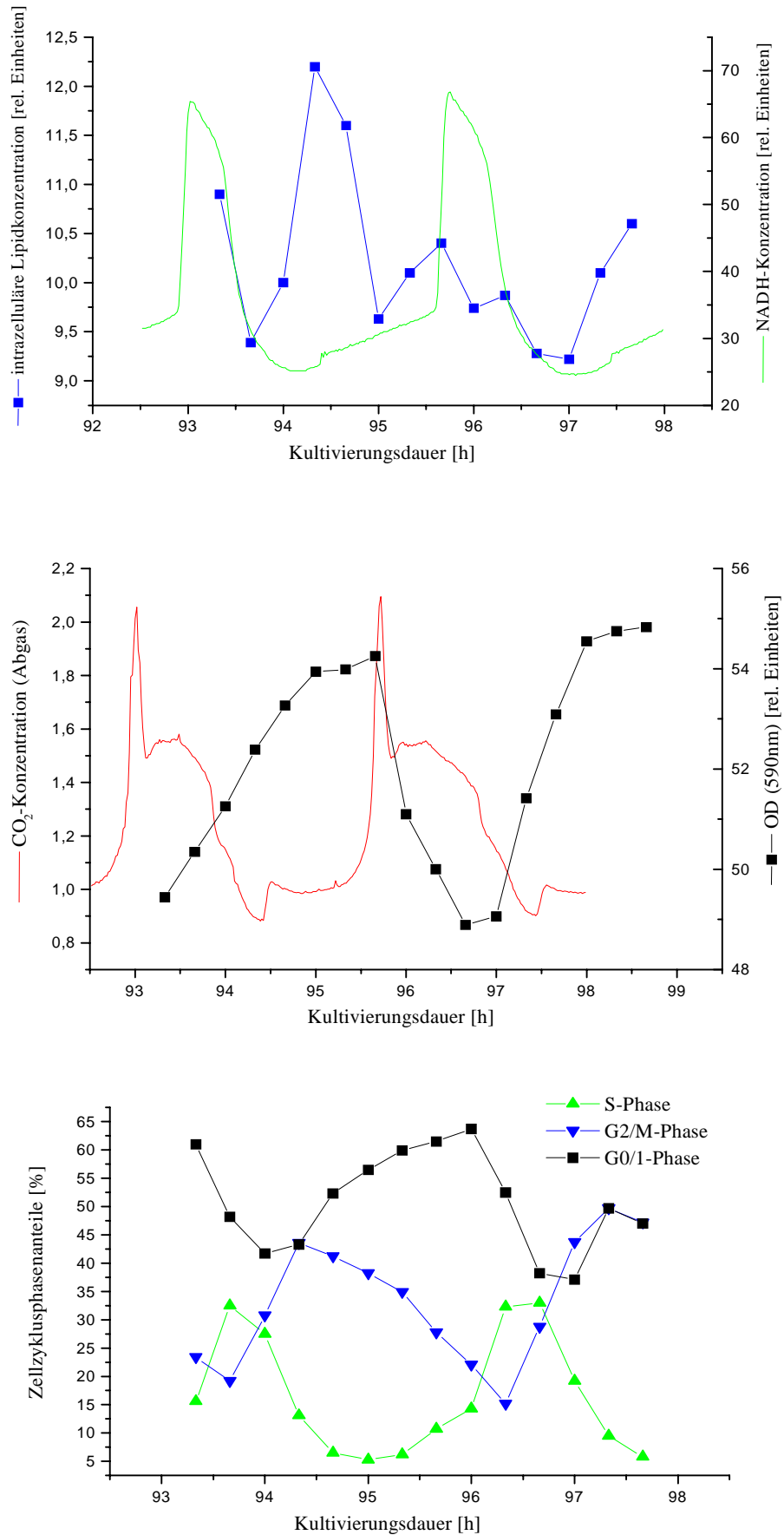


Abb. 9.7: Zellzyklusmessung, OD, NADH-, Lipid-, CO<sub>2</sub>-Konzentration von synchronen Hefen

Der Verlauf der durchflußcytometrisch durch Nilrotfärbung bestimmten intrazellulären Lipidkonzentration, weist ebenfalls ein zyklisches Verhalten auf. Allerdings ist ein Maximum des intrazellulären Lipidgehaltes in Phasen geringer  $\text{CO}_2$ -Produktion und eines hohen Anteils an Zellen in der Ruhe- oder G1-Phase zu erkennen. Bei starker Teilungsaktivität sinken die Lipidkonzentration ab. Dies läßt sich durch einen Abbau von Speicherstoffen zur Deckung des angewachsenen Energiebedarfs während einer gestiegenen Zellteilungsrate erklären.

Der Verlauf des durchflußcytometrisch und über 2D-Fluoreszenzspektroskopie bestimmten Proteingehaltes dieser Kultivierung ist in Abb. 9.8 dargestellt. Der durchflußcytometrisch bestimmte intrazelluläre Gesamtproteingehalt zeigt einen starken Einbruch nach 94 Stunden,

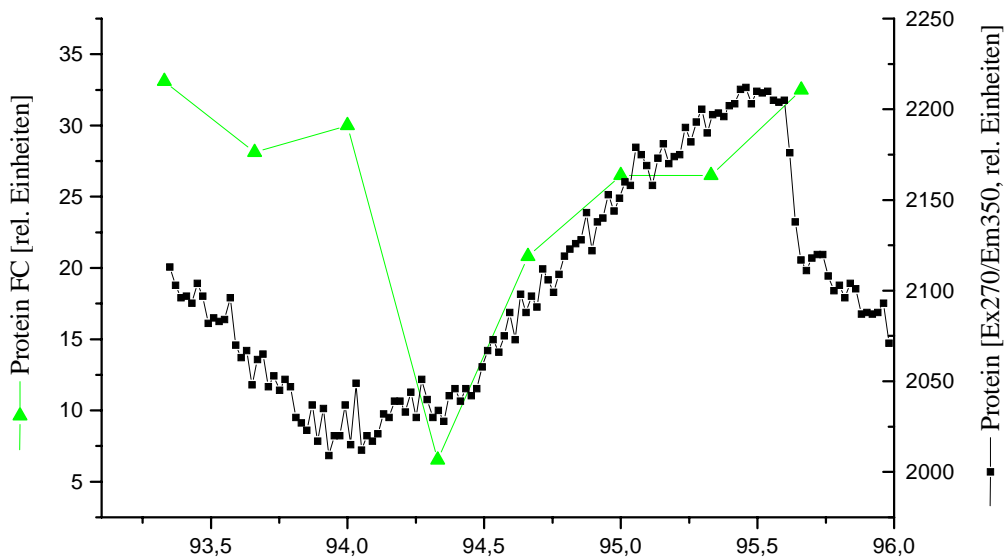


Abb. 9.8: Durchflußcytometrisch und über 2-D-Fluoreszenzspektroskopie bestimmter Proteingehalt.

welches mit dem Minimum des  $\text{CO}_2$ -Produktion (Abb. 9.8) einhergeht. Die intrazelluläre Konzentration zeigt einen ähnlichen Verlauf, jedoch tritt die Reduktion des Proteingehaltes etwas zeitverzögert ein. Das Maximum des Proteingehaltes liegt kurz vor dem Anstieg des  $\text{CO}_2$ -Gehaltes im Abgas. Dies legt den Zusammenhang nahe, daß der Proteingehalt durch die erhöhte DNA-Synthese anwächst.

## 9.6 Zusammenfassung und Diskussion

Der Einsatz der Durchflußcytometrie an synchronen Hefekultivierungen verdeutlicht die Einsatzmöglichkeiten einer Multiparameter-Analyse, welche einen schnellen Einblick in die laufende Kultivierung gibt. Durch simultane Bestimmung der Vitalität, Lebendzellzahl und der mittleren Größe kann innerhalb weniger Minuten ein Überblick über den aktuellen Zustand der Kultivierung gewonnen werden. Weiterhin können bakterielle Kontaminationen schnell erkannt werden, was an einen übermäßigen Absinken der mittleren Größe der detektierten Mikroorganismen erkennbar wäre (siehe auch Kap. 10.3). Ebenso könnte die neue Population im zweidimensionalen Streulichtplot erkannt werden.

Die Zellzyklusanalysen ermöglichen eine zuverlässige Abschätzung des weiteren Kultivierungsverlaufes, wobei durch das Erkennen eines erhöhten Anteils an in die Synthesephase eintretender Zellen, die Erhöhung der Zellzahl bzw. Biomasse vorhergesagt werden kann. Weiterhin liefert die Korrelation zwischen Zellzyklusanalyse weitere Erklärungen zum Verlauf der CO<sub>2</sub>-Produktion. Der starke Anstieg zu Beginn eines Zyklus ist somit auf den erhöhten Stoffwechsel durch die gestiegene DNA-Synthese zurückzuführen. Die aktive Teilungsphase liegt an der Schulter des CO<sub>2</sub>-Produktionsverlaufes, welches auf eine weniger starke Stoffwechselaktivität hindeutet.

Diese Erklärung des CO<sub>2</sub>-Produktionsverlaufes wird ebenso von dem Verlauf des intrazellulären Lipidgehaltes unterstrichen, dessen Anteil in den aktiven Teilungsphasen der Hefezellen sein Minimum erreicht.

Die aus dem durchflußcytometrischen Bioprozeßmonitoring gewonnenen Erkenntnisse bieten eine ideale Kombination zur Datengewinnung aus 2-D-fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen. Der hiermit detektierte Gehalt an NADH der Hefen liefert im Vergleich zu den obigen Erklärungen zum CO<sub>2</sub>-Verlauf im Zusammenhang mit der Zellzyklusanalyse einen eindeutigen Hinweis auf die erhöhte Stoffwechselaktivität durch seinen parallelen Verlauf zur DNA-Synthese-Phase.



## 10. Durchflußcytometrisches Online-Bioprozeßmonitoring

Alle bisher beschriebene Methoden der durchflußcytometrischen Analytik sind in der Lage, schnell und zuverlässig Analysenergebnisse über den Kultivierungsprozess zu liefern, jedoch ist immer eine separate Probenahme und Probenvorbereitung nötig. On-line Messungen bieten die Möglichkeit in kurzer Zeit Informationen über den Status der Kultivierung zu gewinnen, um bei Bedarf in den Prozeßablauf eingreifen zu können. Hierfür wurde das Coulter Epics XL mittels eines Fließinjektionsanalysen-(FIA)-systems für online-Messungen am Bioprozeß erweitert.

### 10.1 Aufbau des durchflußcytometrischen Online-Systems

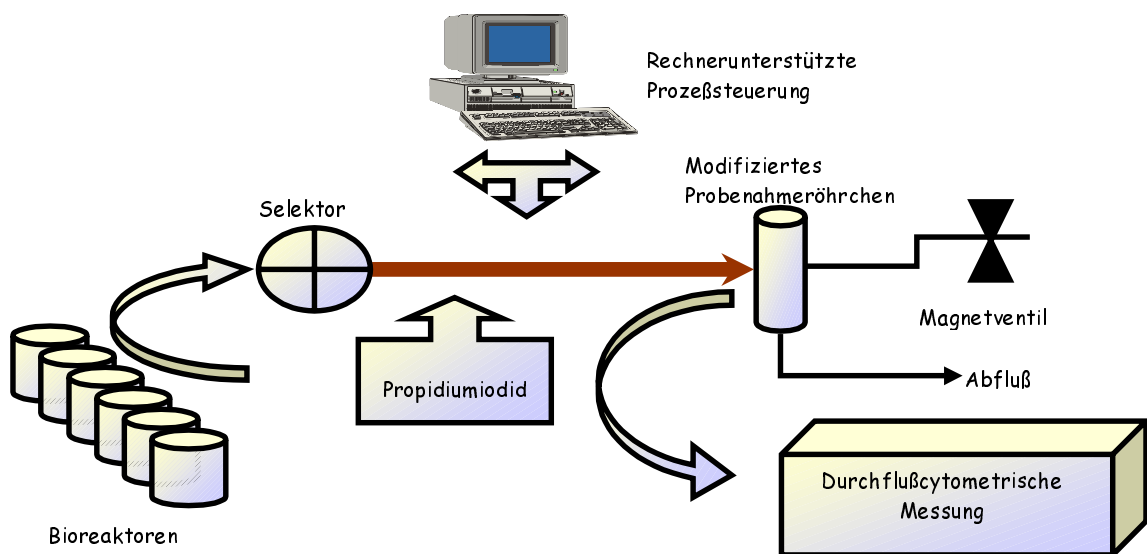


Abb. 10.1: Durchflußcytometrische Online-Analytik in der Übersicht

Bei der bewährten Technik der Fließinjektionsanalyse handelt es sich um ein Verfahren, bei welchem in einem kontinuierlich fließenden Trägerstrom ein definiertes Probevolumen injiziert wird. Hiernach wird der Trägerstrom über eine Vermischungs- und Reaktionsstrecke einem Detektor zugeführt [Rudzicka, 1974]. Auch in der Biotechnologie sind seitdem vielfältige Anwendungen zur Detektion von Mediumkomponenten entwickelt wurden [Hagedorn, 1999].

Für den Einsatz in Kombination mit der Durchflußcytometrie, wurden das Meßverfahren so modifiziert, daß ein Probenstrom aus dem Reaktor zusammen mit Propidiumiodid-Färbelösung in eine Reaktionsschleife geleitet wird, welche die gefärbte Zellsuspension direkt in die Probenahmezone des Cytometers weiterführt. Die Verweilzeit in der Probenschleife kann dem jeweiligen Farbstoff und verwendeten Mikroorganismen angepaßt werden, um eine optimale Färbung in möglichst kurzer Zeit zu erreichen. Das modifizierte Probenahmeröhrchen mit drei Öffnungen ist der zentrale Punkt im Aufbau der Online-Analytik. Neben Probenein- und auslaßöffnung, dient der dritte Anschluß der druckluftgesteuerten Regelung des Probeneinzugs.

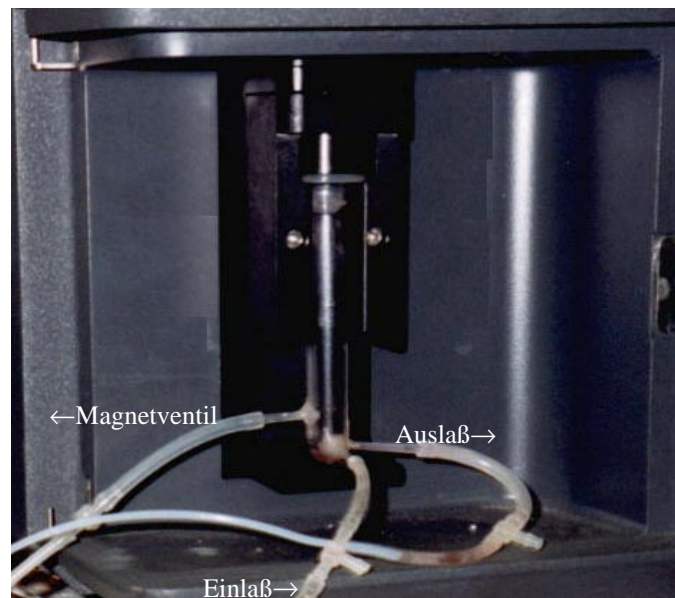


Abb. 10.2: Probenahmeröhrchen

Das Cytometer mißt ständig durch Ausblasen der vom Kompressor herangeführten Luft die Druckverhältnisse am Probeneinlaß. Bei Detektion eines Druckanstieges, wie dies beim Einführen ein die Einlaßöffnung verschließenden Probenahmeröhrchen der Fall ist, wird die Probe eingezogen. Die dritte Öffnung des Probenröhrchens wurde mit einem Magnetventil verbunden, welches im Ruhezustand offen ist. Durch Schließen dieses Magnetventils kann nun ein Überdruck erzeugt werden, was zum Einzug der Probe führt. Durch die automatisierte Regelung der Pumpen und des Probeneinzugs mit Hilfe des FIA-Steuerprogramms CAFCA (Computer Assisted Flow Control & Analysis), können die gewünschten Meßzeiten individuell definiert werden. Die kontinuierliche Bestimmung der prozeßrelevanten Parameter kann in Zeitintervallen ab 5 Minuten erfolgen und kann somit in kürzester Zeit durchgeführt

werden. Durch diese vollautomatisierte Regelungstechnik ist es möglich, online Messungen sowohl von Zellzahl und Vitalität als auch von Zellgröße und -größenverteilung durchzuführen.

Durch einen vor der Reaktionsschleife implementierten Selektor kann das Fließinjektionscytometrie-System sowohl vollautomatisch für die Zellzahlbestimmung kalibriert als auch zur Datenaufnahme von bis zu 6 Reaktoren eingesetzt werden. Kultivierungen mit verschiedenen Bakterien- und Säugerzelllinien wurde als Modell zur Optimierung der Prozeßsteuerungsstrategie ausgewählt.

## 10.2 Online-Messungen an *Pseudomonas*-Kultivierungen

Für die Kultivierung an *Pseudomonas* wurde ein 250 ml Schüttelkolben eingesetzt. Für die Detektion der Vitalität der Bakterien ist eine Anfärbezeit mit Propidiumiodid von 30 s gewählt wurden. Die Länge der Reaktionsschleife betrug 30 cm, Pumprate 2 ml/min. Das Meßintervall wurde auf 20 min eingestellt, um den Mediumaustrag zu begrenzen. Abb. 10.3 zeigt den Verlauf von Zellzahl, Vitalität und optischer Dichte.

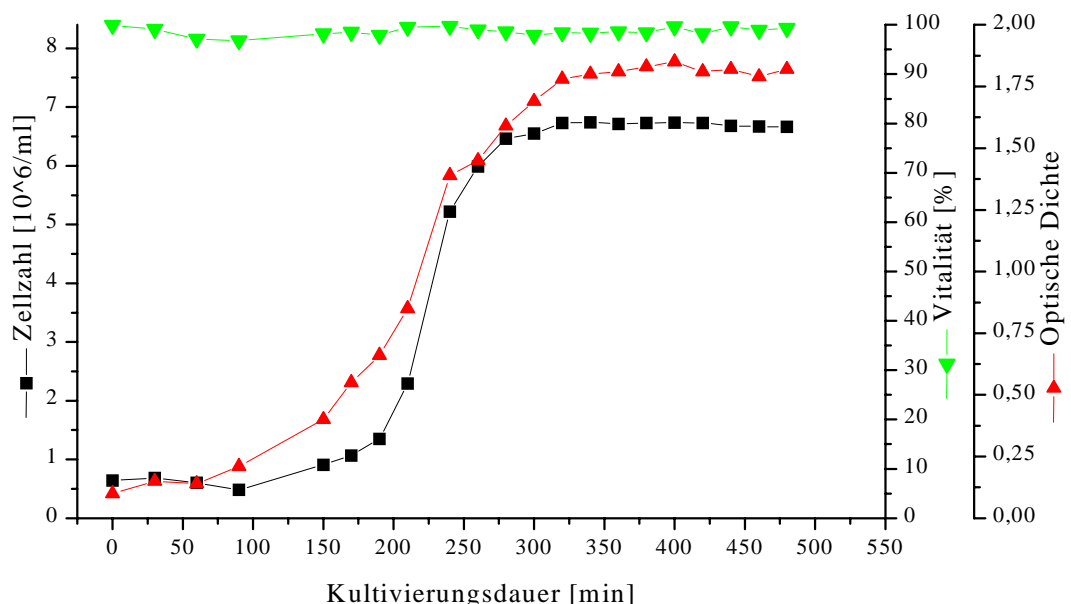


Abb. 10.3: Online-Messungen von Zellzahl und Vitalität an einer *Pseudomonas* Batch-Kultivierung

Die Vitalität zeigt einen konstant hohen Wert von über 95%. Im Gegensatz zu tierischen Zellkulturen sinkt dieser erst bei größerer Beeinträchtigung der Organismen ab. Der Zellzahl zeigt einen typischen Verlauf einer Kultivierung. Sehr deutlich ist der Anstieg der Zellzahl nach 200 min als Beginn der exponentiellen Phase zu erkennen. Die stationäre Phase ist nach 5 Stunden mit 6.5 Millionen Zellen/ml erreicht.

### 10.3 Online-Messungen an Kultivierungen von CHO-Zellen

Zur Kultivierung von CHO-Zellen wurden eine 500 ml Flasche mit serumfreien BioPro 1 Tierzellkulturmedium (BioWhittaker) und HEPES (Sigma) bei 37°C eingesetzt. Zum Rühren wurde ein Magnetrührer mit einer Rührergeschwindigkeit von 50 Upm verwendet. Die Animpfdichte betrug  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml. Für die Zellen wurde eine Anfärbezeit mit Propidiumiodid von 30 s gewählt. Die Länge der Reaktionsschleife betrug 30 cm bei einer Pumprate von 2 ml/min. Das Meßintervall wurde auf 1.5 bis 3 Stunden eingestellt, um den Medianaustrag zu begrenzen.

Die erhaltenen Streulichtsignale wurde mit einer Autogate-Funktion versehen, welche die Subpopulationen der lebenden und toten CHO-Zellen erfaßt. Diese Funktion erlaubt es, den Anteil der Zellen, welche in dieser Größenordnung und Granularität auftreten ständig zu

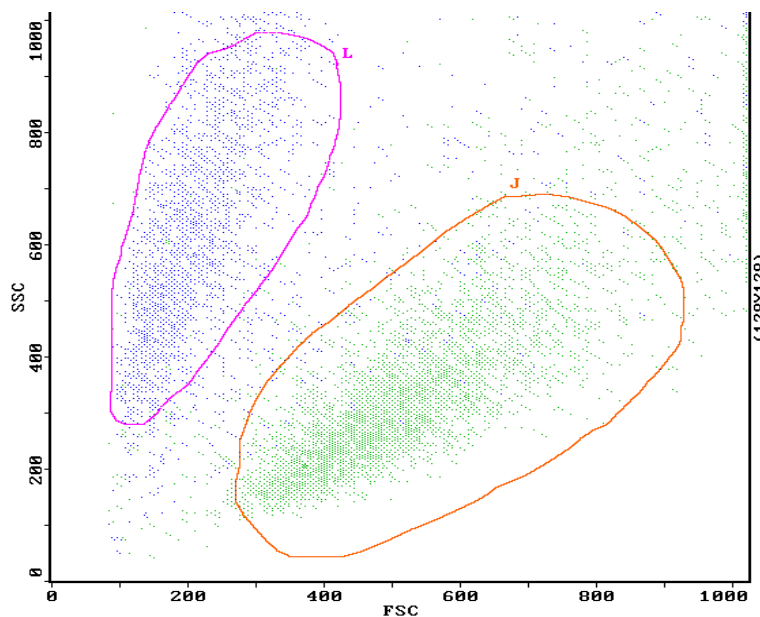


Abb. 10.4: Streulichtsignale von CHO-Zellen mit lebender (grün) und toter (blau) Subpopulation

erfassen, wo bei kleineren Änderungen der Streulichtintensität eine automatische Anpassung der Region erfolgt. Somit ist es möglich, eine sofortige Detektion des Auftretens weiterer Partikelpopulation zu erhalten, was eine schnelle Kontaminationserkennung ermöglicht. Abb. 10.4 zeigt den zweidimensionalen Streulichtplot mit beiden Populationen. Es können bereits grob zwei Subpopulationen von lebenden (grün) und toten Zellen (blau) erkannt werden.

Abb. 10.5 gibt den Verlauf der durchflußcytometrisch detektierten Zellzahl sowie der mikroskopisch bestimmten wieder.

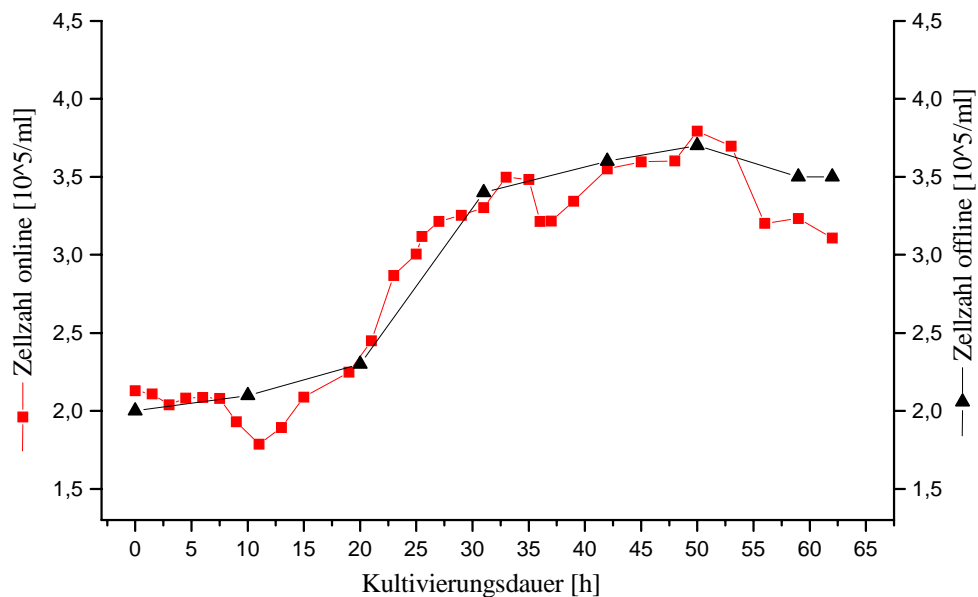


Abb. 10.5: Online-Messungen der Gesamtzellzahlen mit Mikroskop und Cytometer

Beide Zählungen weisen eine gute Übereinstimmung auf. Die Zellzahl zeigt einen typischen Verlauf einer Säugerzellkultivierung, nach der lag-Phase von 20 Stunden ist hiernach der Beginn der exponentiellen Phase am Anstieg der Zellzahl zu erkennen. Die stationäre Phase ist nach 45 Stunden bei  $3.8 \cdot 10^5$  Zellen/ml erreicht. Aufgrund der Kultivierung außerhalb einer humidifizierten Atmosphäre und der durch den Magnetrührer verursachten Scherkräfte wurde hier nicht die höchst mögliche Zelldichte erreicht.

Abb. 10.6 verdeutlicht den Verlauf der Vitalität und der mittleren Zellgröße. Die Vitalität weist nach kurzem Absinken auf unter 60% nach 6 Stunden einen konstanten Anteil lebender Zellen von 70% auf. Die mittlere Zellgröße zeigt, nachdem sie die ersten 24 Stunden zwischen 14 und 15  $\mu\text{m}$  liegt, einen Abfall zum Ende der Kultivierung auf 11  $\mu\text{m}$ . Das Sinken

der Zellgröße dürfte zu Beginn der exponentiellen Phase auf den erhöhten Anteil neuer kleinerer Tochterzellen zurückzuführen sein. Zum Ende der Kultivierung ist der Einfluß des gestiegenen Anteils toter Zellen und von Zellbruchstücken zu erkennen, welche bei der über

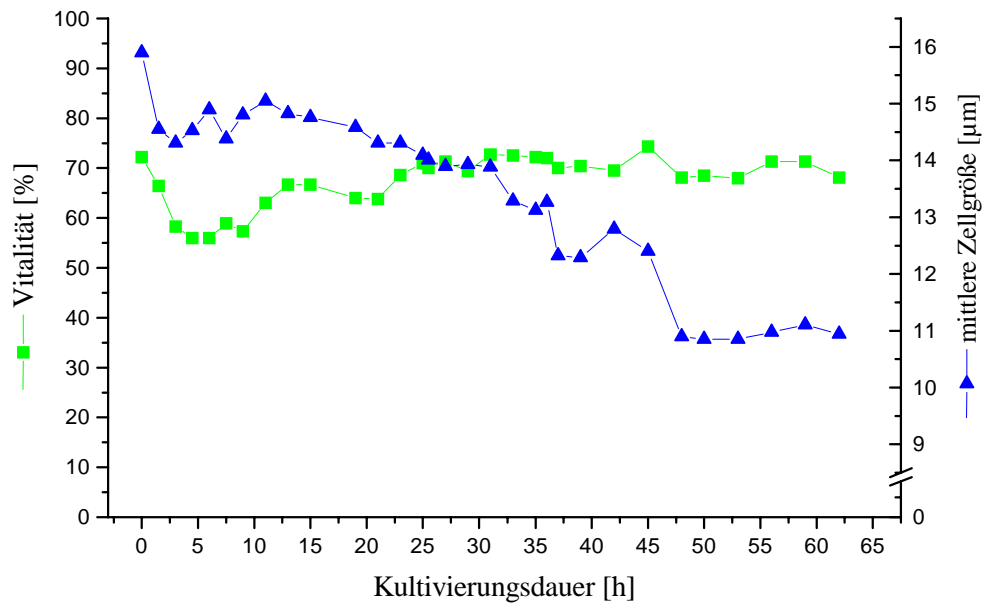


Abb. 10.6: Online-Bestimmung der Vitalität und der mittleren Zellgröße

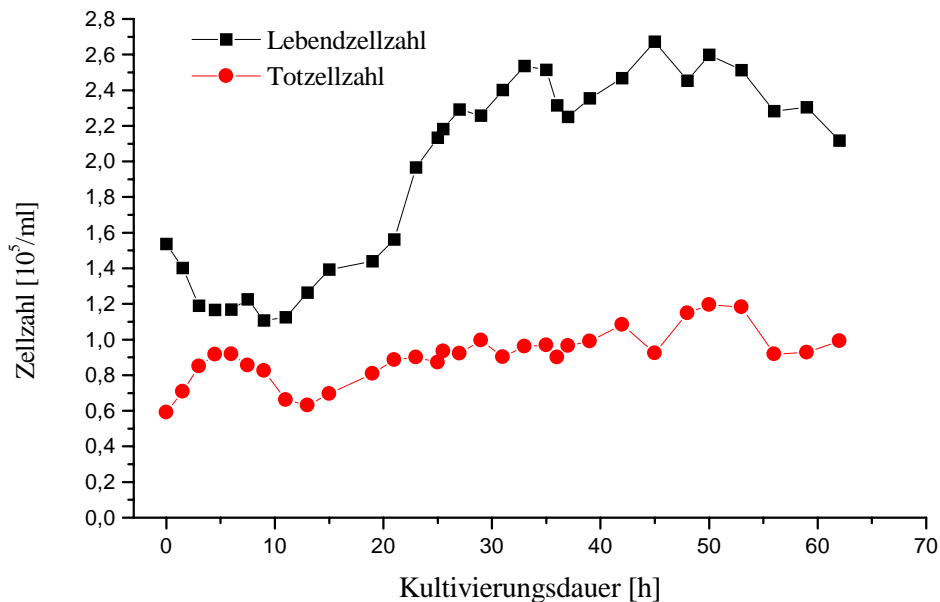


Abb. 10.7: Verlauf der Lebend- und Totzellzahlen

alle detektierten Zellen gemittelten Zellgröße den Durchschnittswert erniedrigen.

Die durch die Propidiumiodiddetektion schnell erhaltenen Vitalitätswerte in einer simultanen online-Messung zusammen mit der Bestimmung der Gesamtzellzahl ermöglichen den Erhalt der Leben- und Totzellzahl, dessen Verlauf in Abb. 10.7 dargestellt ist. Somit ist es möglich den Anteil des produktiven Anteils der Kultivierung schnell zu erhalten.

## **10.4 Zusammenfassung und Diskussion**

Durch die Kombination der Durchflußcytometrie, der Fließinjektionsanalyse sowie der softwareunterstützten Regelung ist gelungen, die vielfältigen Möglichkeiten der Durchflußcytometrie auch online zu nutzen.

Das Verfahren bietet die Möglichkeit die Verweilzeit in der Probeschleife zu variieren und kann somit die Färbezeiten dem jeweiligen Farbstoff und den verwendeten Mikroorganismen anpaßt werden, um eine optimale Färbung in möglichst kurzer Zeit zu erreichen. Mit Hilfe der Magnetventilsteuerung ist es möglich, über externe Steuerprogramme den Probeneinzug in das Cytometer zu veranlassen und die Detektionszeiträume anzupassen.

Am Beispiel der Kultivierungen von *Pseudomonas* und CHO-Zellen konnte gezeigt werden, wie online die Detektion der Zellzahl, der mittleren Größe der Zellen und der Vitalität möglich sind. Aus diesen Daten kann schnell der Anteil lebender und toter Zellen ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung zu den offline erhaltenen Werten. Durch das Implementieren einer Autogate-Funktion in die Auftragung der Streulichtsignale kann weiterhin ein Beitrag zu einer rechtzeitigen Erkennung von mikrobiellen Kontaminationen geleistet werden.

## 11 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Entwicklung und Optimierung biotechnologischer Prozesse wird eine leistungsfähige Analytik benötigt, welche zuverlässig, schnell und mit einem möglichst hohen Automatisierungsgrad selbst kleinste Änderungen in biologischen Systemen detektieren kann. Diese Arbeit konnte zu einer Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten der Durchflußcytometrie beitragen, um die Analyse des Zellzustandes bei biotechnologischen Verfahren in vielfältiger Weise zu optimieren.

Die Entwicklung und Etablierung einer Multiparameteranalyse zur simultanen Bestimmung von Zellzahl, Zellgröße, Größenverteilung und Vitalität bietet gegenüber der manuellen mikroskopischen Trypanblaubestimmung klare Vorteile. Wohingegen bei der mikroskopischen Zählung nur maximal wenige hundert Zellen erfaßt werden können, ist es mit Hilfe der Durchflußcytometrie möglich, eine wesentlich größere Zellpopulation bis zu 100.000 Zellen zu detektieren. Dies trägt zu einer stark erhöhten Genauigkeit der Zellzählung und Vitalitätsbestimmung bei. Weiterhin sind für die durchflußcytometrische Bestimmung Meßzeiten von weniger als einer Minute üblich, da bis zu 4000 Zellen/Sekunde erfaßt werden können. Ebenso können im Gegensatz zu Mikroskopie mit derselben Messung die Zellgröße und Größenverteilung bestimmt werden. Diesen Vorteilen steht nur die erforderliche Kalibration des Cytometers mit Standardpartikeln entgegen.

Am Anwendungsbeispiel des Cytostatikums Cycloheximid konnte die Leistungsfähigkeit der durchflußcytometrischen Multiparameteranalyse gezeigt werden. Durch die Bestimmung von Vitalität, Lebend-, Tot-, und Gesamtzellzahl in nur einer Messung sowie der Zellzyklusanalyse konnte schnell die cytotatische Wirkung auf Zellzyklus und Zellzahlentwicklung aufgezeigt werden. In Folge dieser Messungen konnte der LC50-Wert von Cycloheximid auf T-Lymphozyten bestimmt und lineare Abhängigkeit zur Konzentration dargestellt werden.

Für die Bestimmung der toxischen Eigenschaften von Antischaummitteln konnte die Durchflußcytometrie effektiv eingesetzt werden, um schnell die Auswirkungen der Entschäumer auf CHO-Zellkulturen zu bestimmen.

Die gleichzeitig in einer Probe bestimmbaren Parameter Vitalität und Zellzahl mit Mehrfachbestimmungen aus allen 22 untersuchten Produkten ermöglichte es, auch bei großen



Probenmengen in kurzer Zeit die geeignetsten Antischaummittel in ihrer effektivsten Konzentration für CHO-Zellen zu selektieren.

Unter Einbeziehung aller detektierten biologischen Parameter sowie der Bedingung einer leichten Dosierbarkeit und Sterilisation konnte der modifizierte Polyalkoxyether FBA 5057 (Henkel) als erste Wahl zur Eindämmung einer Schaumbildung bei CHO-Zellen bestimmt werden.

Weiterhin wurde ein Verfahren entwickelt, das einen praktikablen Einsatz an Säugerzellen ermöglicht. Hierbei wird durch Verdünnung des Entschäumers eine stabile Emulsion hergestellt. Durch den Effekt des Antischaummittels, sich bei tieferen Temperaturen besser zu lösen, kann nach Abkühlen auf 4 °C eine Sterilfiltration erfolgen. Dies ermöglicht eine direkte Dosierbarkeit in das Zellkulturmedium vor Beginn der Kultivierung. Beim Erreichen der Kultivierungstemperatur entfaltet das Antischaummittel seine volle Wirksamkeit.

Hierbei muß berücksichtigt werden, daß dies für die untersuchte CHO-Zelllinie in BioPro 1-Medium und Kultivierungen in 12-Loch-Platten gilt. Für andere Zelllinien bzw. größere Kulturvolumina sind weiterführende Untersuchungen nötig.

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität von bovinen Lactoferrin steht mit Hilfe der Durchflußcytometrie ein Verfahren zur Verfügung, welches dessen Auswirkungen auf Säugerzellen schnell detektieren kann.

Die durchflußcytometrischen Analysen zeigten die toxischen Auswirkungen von Lactoferrin und des Lactoferrin-Hydrolysates in Konzentrationen von  $5 \cdot 10^{-9}$  mol/l auf die Säugerzellen. Begleitende Untersuchungen der Stoffwechselaktivität bestätigten die cytostatischen Wirkungen dieser Konzentration. Eine Dosis von  $10^{-9}$  mol/l führte zur einer Stimulation der Proliferation von T-Lymphozyten. Dies spiegelt sich sowohl Lebendzellzahlmessungen als auch der Zellzyklusanalyse wieder. Um eine möglichst eindeutige Aussage über die biologische Aktivität von Lactoferrin treffen zu können, hat sich die Vitalität als signifikantester Parameter herausgestellt.

Es wurden mit dieser Zelllinie bisher keine Versuche unternommen, sie serumfrei zu kultivieren. Angesichts der Tatsache, daß bovines Lactoferrin im fötalem Rinderserum enthalten ist, erscheint dies wenig sinnvoll, um zu zeigen in welchem Ausmaß verschiedene Konzentrationen von Lactoferrin auf die Zelllinie einwirken. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen wurden Jurkatzellen in serumreduzierten Medien kultiviert.

Mit dem beschriebenen Verfahren ist es nun möglich, ohne störende Einflüsse des Serums die biologische Aktivität von Lactoferrin zu überprüfen. Hierfür können sowohl Konzentrationen, welche die Zellen stimulieren als auch inhibieren zur Detektion eingesetzt werden. Durch den Einsatz kleiner Kulturgrößen mit einer anschließenden durchflußcytometrischen Analyse können schnell und mit geringerem Aufwand Erkenntnisse über die biologische Aktivität erhalten werden. Somit steht nun auch eine Möglichkeit zur Verfügung die Auswirkungen auf Säugerzellen zu detektieren, was die etablierten Verfahren an Bakterien wirkungsvoll ergänzen kann.

Weiterhin konnte durch die in das Verfahren integrierte Zellzyklusanalyse weitere mechanistische Erkenntnisse zur Wirkungsweise von Lactoferrin gewonnen werden. Es konnte nachgewiesen werden, daß eine Zeitverzögerung in der Stimulation der Proliferation von T-Lymphozyten mit nicht hydrolysierten bLF stattfindet. Durch Hydrolysierung kann somit eine erleichterte Aufnahme von Lactoferrin in die Zellen erreicht werden.

Durch die Detektion der intrazellulären t-PA-Produktion in Kombination mit weiteren durchflußcytometrisch detektierten Parametern konnten weitere Einblicke in die Produktion des rekombinanten Proteins gewonnen werden.

Somit ist eine schnelle Detektion der durch Temperaturniedrigung verringerten Teilungsaktivität und des Übergangs in inaktive Stadien der Kultivierung bei 31°C möglich. Durch die Untersuchungen des Zellzyklusses kann belegt werden, daß die Zellen im Gegensatz zur 37°C-Kultivierung einen konstanten S-Phasen-Anteil bis nach 120 Stunden aufweisen. Dies verdeutlicht, daß die Zellen die Synthese-Phase noch erreichen, sie aber aufgrund der zu geringen Temperatur nicht abschliessen.

Die Erweiterung mit einer Detektion des intrazellulären t-PA-Gehaltes zeigt, daß der intrazelluläre Gehalt der 31°C-Kultivierung gleichauf oder leicht über dem der 37°C-Kultivierung liegt, was auf den erhöhten S-Phasenanteil zurückzuführen sein dürfte. Dadurch das sie den Restriktionspunkt überschreiten, synthetisieren sie DNA und somit auch t-PA, können die Zellteilung aber nicht abschließen, was zu geringen Lebendzellzahlen führt.

Trotz der bei 37° erhaltenen höheren Zellzahlen, vollenden bei dieser Temperatur alle ihre Teilungsvorgänge und benötigen weiterhin Zeit bis eine neue Zellteilung der Tochterzellen erfolgen kann. In diesem Zeitraum kann keine Produktion des rekombinanten Proteins stattfinden.

Die t-PA-Produktion während der aktiven Teilung konnte durch Kombination der intrazellulären t-PA-Messung mit der Zellzyklusanalyse belegt werden.

Durch die Möglichkeit der Detektion intrazelluläre Enzyme durch mit Fluoreszenzfarbstoffen kombinierten Substraten auf Einzelzellbasis konnte das in der Hefe *Kluyveromyces fragilis* produzierte Enzym  $\beta$ -Galactosidase intrazellulär bestimmt werden.

Durch die Zellzyklusanalyse konnte der Beginn der verstärkte Teilungsaktivität nach vier Stunden detektiert werden, bevor dies in der optischen Dichte feststellbar ist. Ein Überschreiten des Restriktionspunktes als Zeichen der aktiven Teilung ist somit bis zur achten Stunde detektierbar, was als Steigerung der optischen Dichte zeitversetzt zu beobachten ist.

Beim Verlauf der intrazellulären mittleren Galactosidasekonzentration ist zu Beginn der Kultivierung ein starker Konzentrationsabfall detektierbar, was auf die in dieser Zeit hohe Teilungsaktivität zurückzuführen sein dürfte, wie der hohe Anteil an Zellen in der S, G2 und M-Phase belegt. Durch die zunehmende Bildung junger kleiner Zellen sinkt die absolute Konzentration in den Zellen. Mit zunehmender Größe steigt auch wieder der intrazelluläre  $\beta$ -Galactosidasegehalt.

Der Einsatz der Durchflußcytometrie an synchronen Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* verdeutlicht die Einsatzmöglichkeiten einer Multiparameter-Analyse, welche einen schnellen Einblick in die laufende Kultivierung gibt. Durch simultane Bestimmung der Vitalität, Lebendzellzahl und der mittleren Größe kann innerhalb weniger Minuten ein Überblick über den aktuellen Zustand der Kultivierung gewonnen werden. Die Zellzyklusanalysen ermöglichen eine zuverlässige Abschätzung des weiteren Kultivierungsverlaufes, wobei durch das Erkennen eines erhöhten Anteils an in die Synthesephase eintretender Zellen, die Erhöhung der Zellzahl bzw. Biomasse vorhergesagt werden kann.

Weiterhin liefert die Korrelation zwischen Zellzyklusanalyse weitere Erklärungen zum Verlauf der CO<sub>2</sub>-Produktion. Der starke Anstieg zu Beginn eines Zyklusses ist somit auf den erhöhten Stoffwechsel durch die gestiegene DNA-Synthese zurückzuführen. Die aktive Teilungsphase liegt an der Schulter des CO<sub>2</sub>-Produktionsverlaufes, was auf eine weniger starke Stoffwechselaktivität hindeutet.

Diese Erklärung des CO<sub>2</sub>-Produktionsverlaufes wird ebenso von dem Verlauf des durchflußcytometrisch bestimmten intrazellulären Lipidgehaltes unterstrichen, dessen Anteil zur Energiegewinnung in aktiven Teilungsphasen der Hefezellen sein Minimum erreicht. Die

aus dem durchflußcytometrischen Bioprozeßmonitoring gewonnenen Erkenntnisse bieten eine ideale Kombination zur Datengewinnung aus 2-D-fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen. Der hiermit detektierte NADH-Gehalt der Hefen liefert im Vergleich zum CO<sub>2</sub>-Verlauf und der Zellzyklusanalyse eindeutige Hinweise auf die erhöhte Stoffwechselaktivität durch seinen parallelen Verlauf zu DNA-Synthese-Phase.

Ein weiterer Schritt zu einer möglichst automatisierten Analysetechnik gelang durch die Kombination der Durchflußcytometrie und der Fließinjektionsanalyse. Es besteht nun die Möglichkeit, die vielen Vorteile der Durchflußcytometrie auch online zu nutzen.

Das Verfahren bietet die Möglichkeit die Verweilzeit in der Probeschleife zu variieren und kann somit die Färbezeiten dem jeweiligen Farbstoff und den verwendeten Mikroorganismen anpaßt werden, um eine optimale Färbung in möglichst kurzer Zeit zu erreichen. Mit Hilfe der Magnetventilsteuerung ist es möglich, über externe Steuerprogramme den Probeneinzug in das Cytometer zu veranlassen und die Detektionszeiträume anzupassen.

Weiterhin können bakterielle Kontaminationen schnell erkannt werden, was an einem übermäßigen Absinken der mittleren Größe der detektierten Mikroorganismen erkennbar wäre. Ebenso könnte die neue Population im zweidimensionalen Streulichtplot erkannt werden.

Am Beispiel der Kultivierungen von *Pseudomonas* und CHO-Zellen konnte gezeigt werden, wie online die Detektion der Zellzahl, der mittleren Größe der Zellen und der Vitalität möglich ist. Aus diesen Daten kann schnell der Anteil lebender und toter Zellen ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung zu den offline erhaltenen Werten. Die hieraus resultierende Transparenz der Fermentation ermöglicht es somit, sofort regulierend in die Prozeßsteuerung eingreifen zu können.

Die weitere Entwicklung der Durchflußcytometrie als Analysenverfahren wird zukünftig von der immer größer werdenden Verfügbarkeit von Fluoreszenzfarbstoffen und monoklonaler Antikörper profitieren. Somit werden stets neue intrazelluläre Parameter detektierbar, welche weitere Aufschlüsse über die Mechanismen der Produktexpression als auch des Zellzustandes ermöglichen. Dieses führt zu einem immer tieferen Verständnis der Kultivierungsabläufe, was zur weiteren Optimierung von biotechnologischen Produktionsprozessen genutzt werden kann.

## 12 Literaturverzeichnis

Akerlund T, Nordstrom K, Bernander R., Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of Escherichia coli, J Bacteriol (1995) Dec;177(23):6791-7

Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Watson, J. D., Molecular biology of the cell, Garland Publishing, Inc., New York & London, 3<sup>rd</sup> ed., 1994

Al-Rubeai M et. al., Flow cytometric studies of cultured mammalian cells, J Biotechnol, 1991, Jun, 19 (1), 67-81

Al-Rubeai, M. Lloyd, D.R., The Cell Cycle, The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation

Al-Rubeai, M. Welzenbach, K. Lloyd, D. R. Emery, A. N., A rapid method for evaluation of cell number and viability by flow cytometry, Cytotechnology, 1997, **24**: 161-168

Arndt, S., Schnelle Wirkungsprüfung potentieller Therapeutika auf Proliferation und Stoffwechsel mit Hilfe durchflußcytometrischer Messungen, Diplomarbeit, Universität Hannover, 1998

Bailey, J.E., Mc Quitty, D.N. et. al., Measurement of structured microbial population dynamics by Flow Microfluorometry, 1978, AICHE **24**: 570-577

Bi, B. Y. Leveugle, B. Y. Liu, J. L. Collard, A. Coppe, P. Roche, A.-C. Nillesse, N. Capron, M. Spik, G. Mazurier, J., Immunolocalization of the lactoferrin receptor on the human T lymphoblastic cell line Jurkat, Eur. J. Cell Biol., 1994, **65**: 164-171

Bi, B. Y. Liu, J. L. Legrand, D. Roche, A.-C. Capron, M. Spik, G. Mazurier, J., Internalization of human lactoferrin by Jurkat human lymphoblastic T-cell line, Eur. J. Cell Biol., 1996 Mar, **69** (3): 288-296

Bley T., Müller S., Lösche A. et. al., Flow cytometric monitoring of bacterial cell states under growth limiting conditions, IFAC Computer Applications in Biotechnology, 213-216, (1995)

Buch T., Charakterisierung des Temperatureinflusses auf verschiedene rekombinante Säugerzelllinien zur Optimierung des Produktionsprozesses von Glykoproteinen in Rührkesselreaktoren, Dissertation, Universität Hannover, 1997

Cole et. al., In vivo clearance of t-PA, Fibrinolysis (1993), 7: 15-22

Coulter<sup>®</sup> Epics XL/XL-MCL Durchflußzytometriesystem, Bedienungsanleitung, 1996

Degelau A., Bley T., Scheper T et. al, J Biotechnol (1992), 25(1-2):115-44, Immuno- and flow cytometric analytical methods für biotechnological research and process monitoring

Degelau, A., Durchflußzytometrie in der Biotechnologie, Diplomarbeit, Universität Hannover, 1989

Degelau, A., Durchflußzytometrie als Analysemethode in der Biotechnologie, Dissertation, Universität Hannover, 1993

Diaper, J. P. Tither, K. Edwards, C., Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992, **38**: 268-272

Fantes P., Brooks R., The Cell Cycle. A practical approach, Oxford University Press, 1993

Finke, R., Grundlegende Untersuchungen zur Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Vitalitätsbestimmung mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Diplomarbeit, Universität Hannover, 1998

Freeman, DA, Crissman HA, Evaluation of six fluorescent protein stain for the use in flow microfluorometry, Stain Technol 50:279, 1975

Gutwald S., Über die Wirkungsweise mechanischer Schaumzerstörer mit Prallverdichtung, Dissertation, Universität München, 1996

Haugland, Detecting Enzymatic Activity in Cells Using Fluorogenic Substrates". Biotech Histochem 70, 243 (1995)

Hashizume, S. Kuroda, K. Murakami, H., Cell culture assay of biological activity of lactoferrin and transferrin, Methods Enzymol., 1987, **147**: 302-314

Hermann C., Lösche A., Müller S., Bley T., Babel W., Flow cytometric discrimination between *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V and *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 by fluorescently labelled rRNA-targeted oligonucleotides probes and DNA staining. Acta Biotchnol. 17 (1997) 19-38

Höfer et. al., Foam and Foam Control, in: Ullmanns´ Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1998

Iatropoulos, M.J. Williams, G.M., Proliferation markers, Exp. Toxicol. Pathol. 1996 Feb; **48** (2-3): 175-181

Joshi MS, Gowda LR and Bhat SG (1987) Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide. Biotechnology letters 9(8): 549-554

Jalal, F. et. al., Polarized distribution of neutral endopeptidase 24.11 at the cell surface of cultured human intestinal epithelial Caco-2 cells. Biochem. J. (1992), 288: 945-951

Joshi MS, Gowda LR, Katwa LC and Bhat SG (1989) Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin . Enzyme Microb Technol 11:439-443

Kishore, G. et. al., Membrane Bound Neuraminidase in Rat Liver, J. Biol. Chem., (1975), 250: 2655-2659

Knüchel, R. ,Durchflußzytometrische Analytik und Zellsortierung, Pathologie, 1994, **15**: 85-95  
Lebaron, P., Catala, N. Parthuisot, Effectiveness of SYTOX Green Stain for Bacterial Viability Assessment, Appl Environ Microbiol 64, 2697 (1998)

Lee, B.K. Wilkie, D., Sensitivity and Resistance of Yeast Strains to Actidione and Actidione Derivatives, Nature, 1965 Apr; **206**: 90-92

Linz, F. ,Durchflußcytometrie zur Prozeßbeobachtung in der Biotechnologie,Dissertation, Universität Hannover, 1989

Lloyd DR et al., The role of cell cycle in detertmining gene expression and productivity in CHO cells, Cytotechnology, 30, 49-57, 1999

Lloyd, D,Flow Cytometry in Microbiology, Springer-Verlag, London, 1993

Lönnerdal, B. Iyer, S.,Lactoferrin: Molecular structure and biological function,Annu. Rev. Nutr., 1995, **15**: 93-110

Marchetti, M. Pisani, S. Antonini, G. Valenti, P. Seganti, L. Orsi, N, Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of herpes simplex virus type 1 and 2, BioMetals, 1998, **11**: 89-94

Melamed, R. M. Lindmo, T. Mendelsohn, M. L, Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 2<sup>nd</sup> ed., 1990

Molecular Probes, Material Saferty Data Sheet, 1996

Mosmann, T. ,Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays,Journal of Immunol. Methods, 1983, **65**: 55-63

Müller, K. R. Lohs, K.,Toxikologi,Akademie-Verlag, Berlin, 1987

Ormerod, M. G.,Flow Cytometry,Irlpress, Oxford, New york, Tokyo, 1990

Pakdaman, R. Petitjean, M. El Hage Chanine, J.-M..Transferrins.Eur. J. Biochem., 1998, **254**: 144-153

Porro D, et al., A double flow cytometric tag allows tracking of the dynamics of cell cycle progression of newborn Saccharomyces cerevisiae cells during balanced exponential growth, (1995), Yeast, 212-234



Rabinovitch, P. S., WinCycle, Phoenix Flow Systems, Washington, 1995

Roth, et al. , Bacterial Viability and Antibiotic Susceptibility Testing with SYTOX Green Nucleic Acid Stain." Appl Environ Microbiol 63, 2421 (1997)

Rubel TC, Antifoaming and Defoaming Agents, Chemical Process Review, NDC, 1972

Sanches, L. Calvo, M. Brock, J. H., Archives of Disease in Childhood, 1992, **67**: 657-661

Scheper T., Messung zellinterner und zellexterner Parameter zur Fermentationskontrolle, Dissertation, Universität Hannover, 1985

Shapiro H., Practical Flow Cytometry, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley-Liss, 1995

Sigma Product Information Sheet, Saponin from Quillaja Bark, 1996

Sinn HP, et al., DNA cytometry in breast carcinoma. Review of method and value in assessing prognosis, Pathologe. 1997 Jan; 18(1):19-26.

Smith P.K. et al., (1985) Measurement of Protein using BCA, Anal Biochem, 150, 76-85

Suller, Fluorescence Monitoring of Antibiotic-Induced Bacterial Damage Using Flow Cytometry, D. Lloyd. Cytometry 35, 235 (1999)

Wedler, G., Lehrbuch der Physikalischen Chemie, VCH, Weinheim, 3. Aufl., 1987

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
bLF	bovines Lactoferrin
CAFCA	Computer Assisted Flow Injektion Control & Analysis
CH	Cycloheximid
CHO	Chinese Hamster Ovary
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FC	Flow Cytometry
FDG	Fluoro-di-galactopyranoside
FIA	Fließinjektionsanalyse
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
gem.	gemessen
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
INF	Interferon
Kap.	Kapitel
l	Liter
LF	Lactoferrin
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

---

PC	Personal Computer
rel.	relativ
RNA	Ribonucleinsäure
s	Sekunde
SSC	Side Scatter
TCI	Institut für Technische Chemie
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
t-PA	tissue-Plasminogen Activator
Upm	Umdrehungen pro Minute
YSI	Yellow Springs Instruments

## Zellzyklusanalyse mit Sytox Green

Fixieren:

Probe auf max.  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml verdünnen

Medium abzentrifugieren

gut durchmischen

in ca. 100µl PBS aufnehmen

ca. 1-2 ml eiskaltes 70%iges Ethanol hinzufügen

gut durchmischen

bei  $-20^\circ\text{C}$  im Dunkeln ca. 3 Mon. haltbar

Herstellung der Färbelösung:

Konzentration Sytox Green in DMSO: 5 mM

Konzentration Färbelösung: 5 µM

verdünnen der Stammlösung Sytox Green mit Citratpuffer (50 mM, pH 7.0)

Probenvorbereitung

1. Fixierte Zellsuspension auf ca.  $1-2 \cdot 10^7$  Zellen/ml einstellen
2. Ethanol abzentrifugieren (3000 U/min, 3 min), Überstand verwerfen
3. + 100 µl Tween 20-Lösung (0.5 % Tween 20 in PBS)
4. +100 µl RNase-Lösung (2 mg RNase/ml PBS)
4. 2h Minuten inkubieren bei Raumtemperatur, dunkel
5. + 2 ml Sytox Green Färbelösung
6. 30 min Stunden inkubieren Raumtemperatur im Dunkeln
7. Durchflußcytometrische Messung der grünen Fluoreszenz (525 nm) mit Dublettendiskriminierung

## Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid

### Fixieren

Probe auf max.  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml verdünnen

Medium abzentrifugieren

gut durchmischen

aufnehmen in ca. 100  $\mu$ l PBS

ca. 1-2 ml eiskaltes 70%iges Ethanol hinzufügen

gut durchmischen

bei  $-20^\circ\text{C}$  im Dunkeln ca. 3 Mon. haltbar

### Probenvorbereitung:

Ethanol abzentrifugieren

in ca. 100  $\mu$ l PBS aufnehmen

100  $\mu$ l PBS mit 0.5% Tween 20 hinzugeben

100  $\mu$ l RNase (Type III-A, bovine, 2mg/ml PBS)

abzentrifugieren und Überstand verwerfen

+ 1 ml Propidiumiodid-Lösung (50  $\mu$ g PI/ml PBS)

30 min Inkubation bei RT, dunkel

### Messung

PI-Fluoreszenz bei 590 nm nach Dublettendiskriminierung

## **Herstellung anti-t-PA-FITC**

Hierfür werden die Antikörper auf eine Konzentration von (1mg/ml) in einer Kühlzentrifuge (2000g, 4°C) aufkonzentriert. Das erhaltene Antikörperkonzentrat wird mit Natriumhydrogencarbonat-Puffer versetzt (pH=9). Nach Zugabe von FITC (2mg/ml) erfolgte die Reaktion für 2h im Dunkeln. Eine Abtrennung des überschüssigen Farbstoffes erfolgt durch Trennung auf einer Sepharose-Säule (Sigma, 5ml). Die erhaltene Fraktion mit anti-t-PA-FITC kann nun für die durchflußcytometrischen Analysen eingesetzt werden.

## **Detektion des intrazellulären t-PA-Gehaltes**

Die Zellproben werden zentrifugiert (1500 g, 3min), um das Kulturmedium zu entfernen. Zum Fixieren wird frisch hergestellte Formaldehydlösung (4% Formaldehyd in PBS, 4°C) hinzugefügt. Nach einer Einwirkzeit von zwei Stunden werden die Proben abzentrifugiert (1500 g, 3 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wird mit 100 µl Saponin-Lösung (0,5%; Sigma) versetzt und die entstandene Suspension gut durchmischt. 5µl der hergestellten anti-t-PA-Antikörper-Lösung werden zur Zellsuspension gegeben und diese 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Falls eine gleichzeitige Zellzyklusanalyse erfolgen soll, wird im Anschluß unter Zugabe von Propidiumiodid-Lösung und RNase nochmals 30 min im Dunkeln inkubiert. Hiernach wird die Saponin/Antikörper-Lösung durch Zentrifugation entfernt und das Pellet zweifach mit PBS gewaschen. Eine durchflußcytometrische Detektion erfolgt im Bereich von 520 nm für den t-PA-Gehalt sowie zusätzlich bei 590 nm im Falle einer integrierten Zellzyklusanalyse.

## **Mikroskopische Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung**

Die Zellsuspension und der Trypanblaulösung werden mit einer Pipette homogen durchmischt (je 100 µl) und in eine Thoma-Zählkammer pipettiert. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops mit Phasenkontrasteinrichtung (Olympus BH-2, OM-System) werden bei 200facher Vergrößerung tote und lebende Zellen ausgezählt. Da Trypan Blau eine cytotoxische Wirkung hat, beträgt die Einwirkzeit auf die Zellsuspension maximal 60 s. Das Volumen der Flüssigkeit über den beiden Zählfeldern der Thoma-Zählkammer entspricht 0,1 µl, so daß die

Anzahl der Zellen pro Milliliter durch Multiplikation des Zählergebnisses mit dem Faktor  $10^4$  erhalten wird.

### **Durchflußcytometrische Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung**

Die Zellsuspension (1ml) wird 3 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach Aufnahme ml PBS und Versetzen mit 100 µl Propidiumiodid erfolgt die Vitalitätsbestimmung am Cytometer innerhalb der nächsten 3 min, da Propidiumiodid toxisch wirkt und bei längerer Inkubationszeit die Ergebnisse verfälschen würde. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sollten mindestens 5000 Zellen detektiert werden. Bei der Auswertung des Histogramms muß darauf geachtet werden, daß nur die Hauptpopulation der Zellen detektiert wird, so daß keine Zellbruchstücke, die innerhalb des Meßfensters liegen bei der Vitalitätsbestimmung berücksichtigt werden finden.

Die Zellzahlbestimmung am Durchflußcytometer erfolgt durch eine definierte Zeitbegrenzung (20 Sekunden). Diese sollte nicht zu lang gewählt werden, da so der Fehler, der durch Sedimentation entsteht, stark verringert werden kann. Die Probe kann direkt und ohne Vorbehandlung im Cytometer detektiert werden. Im Histogramm kann die eingezogene Anzahl der Zellen direkt abgelesen werden. Nach erfolgter Kalibration mit Polystyrolpartikeln der Größe 10,5 µm kann die genaue Zellzahl der Probe pro Milliliter berechnet.

### **Zellcounter**

Der Zellcounter Casy 1DT (Schärfe System) kann Partikel zwischen 4-20 µm detektieren. Es werden dabei dreimal 400 µl Flüssigkeit eingezogen. Die Partikel werden vom Gerät jeweils gezählt, gemittelt und rechnerisch auf einen Milliliter Probe bezogen. Zuvor werden 50 µl einer Probe mit 10 ml (PBS) verdünnt, da die Anzahl der gezählten Teilchen  $2 \cdot 10^5$  nicht überschreiten darf. Das Mischungsverhältnis muß in den Zellcounter eingegeben werden. PBS sollte vorher filtriert werden (Membrex 25), damit es möglichst partikelfrei ist. Die Teilchenzahl in PBS wird gemessen und von der Teilchenzahl der Probe subtrahiert.

## MTT-Test

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in PBS gelöst (5 mg/ml) und anschließend steril filtriert. Der Test wird in Mikrotiterplatten (0,35 ml, Biomedicals) durchgeführt. 10 µl der gelben MTT-Lösung werden in jedes Well pipettiert und mit 100 µl der zu untersuchenden Zellsuspension gut gemischt. Anschließend werden die Zellen bei 37°C unter Ausschluß von Licht 4 Stunden lang bei 5% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 100 µl der Solubilisierungslösung in jedes Well pipettiert. Die Wells müssen erneut unter humifizierter Atmosphäre (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, dunkel) über Nacht inkubiert werden, um das Herauslösen des Formazansalzes aus den Zellen zu gewährleisten. Jeweils eine Reihe der zwölf Parallelen enthält die gleiche Konzentration der zu untersuchenden Zellen. Eine Reihe wird nicht behandelt und dient als Kontrolle. Die Farbintensität wird mit Hilfe des Immunoreaders NJ-2000 (Intermed) bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen kann. Aus den erhaltenen Absorptionen der acht gleichen Wells wird der Mittelwert gebildet und ins Verhältnis zur Zellzahl gesetzt. Der MTT-Test detektiert dabei den Grad der Aktivierung der Zellen.

## Standardanalytik

Die Beschreibung der Analysenverfahren sind den SOPs des TCI entnommen worden.

## Proteinbestimmung durch BCA-Test

In Form des wasserlöslichen Na-Salzes ist die Bicinchoninsäure ein sensitives, stabiles und hochspezifisches Nachweisreagenz für Cu<sup>+</sup>, welches in Anwesenheit von Protein durch Reduktion von Cu<sup>2+</sup> entsteht. Die Bicinchoninsäure bildet mit dem einwertigen Cu<sup>+</sup> in alkalischer Lösung einen intensiv purpurfarbenen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

Der Test wird auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Eichstammlösung wird eine Albuminlösung mit einer Konzentration von 1mg/ml (Kontrollwert: E<sub>280</sub> = 0,75) hergestellt.

Die Gebrauchslösung wird unmittelbar vor der Messung aus den beiden Standardlösungen A und B (Sigma, Deisenhofen) im Verhältnis A:B wie 50:1 hergestellt. Nach Inkubation der Mikrotiterplatte (ca. 60 min bei 37°C) wird die Extinktion am ELISA-Reader bei einer



Wellenlänge von 560 nm in Doppelbestimmung gemessen. Über die Eichgerade der Standards wird die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

### **Optische Dichte (OD) (online)**

Die optische Dichte ( $OD_{590}$ ) der Kulturlösung wird während der Kultivierung als Extinktion online bei einer Wellenlänge von 590 nm im Photometer mit Hilfe einer Durchflußküvette der Schichtdicke 0,2 mm gemessen (590 nm, Photometer Pharmacia, Schweden). Die Küvette befindet sich im Bypass.

### **Glucose-Analytik mit dem Glucoseanalysator**

Die Bestimmung der D-Glucosekonzentration erfolgt mit dem YSI Analysator Modell 2700 Select (Yellow Springs Instruments, USA). Der Analyt wird durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucoseoxidase umgesetzt, wobei in stöchiometrischer Menge Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) entsteht. Dieses wird an einer Platinelektrode elektrochemisch zu Sauerstoff oxidiert. Die Stromstärke des resultierenden Stromflusses ist proportional zur Analytkonzentration. Interferenzen durch andere oxidierbare Substanzen werden durch eine Zelluloseacetat-Membran vor der Elektrode verhindert. Die Kalibrierung des Analysators erfolgt mit Hilfe einer Standardlösung der Glucosekonzentration 2 g/l

## **Lebenslauf**

**Name:** Marco Rieseberg  
**Geburtsdatum:** 11. November 1970  
**Geburtsort:** Wolfenbüttel

### **Schulbildung**

1977 bis 1983 Grundschrift und Orientierungstufe in Wolfenbüttel  
1983 bis 1990 Theodor-Heuss-Gymnasium in Wolfenbüttel  
Mai 1990 Abitur

### **Studium**

Oktober 1990 bis  
Dezember 1996 Chemie-Studium an der Universität Hannover

Juli 1992 Diplom-Vorprüfung

Juli bis Dezember 1996 Diplomarbeit bei PD Dr. Gerlinde Kretzmer zum Thema „Online-Messungen von L-Glutamin mittels Fließinjektionsanalyse an CHO-Zellkulturen“

seit Mai 1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper