

Anwendung moderner optischer Analysensysteme in der Biotechnologie

der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Alexander Gierse
Geboren am 24.04.1976 in Uccle / Belgien

Hannover
im Juni 2007

Referent: Prof. Dr. T. Scheper
Institut für technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Koreferent: Priv. Doz. Dr. C. Kasper
Institut für technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion 23.05.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Durchflusszytometrie.....	3
2.2. Säugetierzellkultivierung.....	9
2.3. Hefekultivierungen	13
2.4. 2D-Fluoreszenzspektroskopie	16
3. Testung des 2-Reaktorsystem	18
3.1. Aufbau des 2-Reaktorsystems.....	18
3.2. Charakterisierung des 2-Reaktorsystems	20
3.3. Batch-Kultivierungen im 2-Reaktorsystem.....	27
4. Kontinuierliche Hefe-Kultivierungen	31
5. Vergleich der Fluoreszenzdaten mit anderen Analysen-methoden	39
5.1. Durchflusszytometrie.....	39
5.2. In-situ-Mikroskopie	40
6. DNA-Chip Experimente an synchronen Hefekultivierungen	42
6.1. Durchführung von FACS zur Vorbereitung für den DNA Chip.....	42
Trennkriterium DNA-Gehalt.....	43
Trennkriterium Größe und Morphologie.....	45
Trennkriterium Lipidgehalt	46
Trennkriterium Proteingehalt	48
6.2. Chipexperiment	52
7. In-vitro-Testung potenzieller Pharmawirkstoffe	55
7.1. Zytostatika	55

7.1.1.	Tonantzitlolon	56
7.1.2.	Chivosazol A	57
7.1.3.	Ratjadon	58
7.2.	<i>Vitalität</i>	58
7.2.1.	Tonantzitlolon und Hydroxylamin-Tonantzitlolon	58
7.2.2.	4.3.2 Chivosazol A und dessen Acetonid.....	59
7.3.	<i>Zellzyklusanalyse</i>	61
7.4.	<i>Nähere Untersuchung von Zellen nach Ratjadon Behandlung mittels DNA-Chiptechnologie</i>	63
8.	IgG2b – Produktionssteigerung der Hybridomzelllinie BA-D5.....	65
9.	Zusammenfassung.....	70
10.	Anhang	74
10.1.	<i>Methoden</i>	74
10.1.1.	Hefekultivierung.....	74
10.1.2.	Online-Analytik.....	74
10.1.3.	Reaktorkessel	76
10.1.4.	Kontinuierliche Kultivierung im Biostat B	77
10.1.5.	Kultivierung in der Reaktorkombination	78
10.1.6.	Säugerzellkultivierung	78
10.2.	<i>Genchipergebnisse</i>	83
11.	Abkürzungsverzeichnis.....	101
12.	Literatur	103

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung neuer optischer Analyseverfahren wie der 2D-Fluoreszenzspektroskopie in der Biotechnologie. Des Weiteren wurden für die Modellsysteme die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit denen der DNA-Chiptechnologie verglichen.

Das Mischungsverhalten eines neuen Reaktorsystems, bestehend aus einem großen Kultivierungsreaktor (20 L) und einem kleinen Testreaktor (300 mL), wurde anhand von Pulsversuchen näher charakterisiert. Anschließend wurde das Reaktorsystem am Beispiel einer Hefekultivierung getestet. In einem CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) wurde das synchrone Wachstum der Hefezellen optimiert. Gleichzeitig wurde die Analyse der kontinuierlichen Kulturen, die der Beschreibung des Stoffwechselsverhaltens und des Teilungszyklus dienen, überarbeitet. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag hierbei auf der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse. Zusätzlich wurden die synchron wachsenden *Saccharomyces cerevisiae* weiter in ihren Zellzyklusstadien angereichert, um diese mit einem zellzyklusspezifischen DNA Chip zu untersuchen.

Zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte von Wirksubstanzen auf Säugerzellen kann u.a. der MTT-Test eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden mit diesem Test synthetisch hergestellte potenzielle Wirkstoffe in vitro auf ihre Wirksamkeit gegenüber Säugerzellen hin untersucht. Wirkstoffe, die einen Effekt auf die Viabilität der eingesetzten Zelllinien aufwiesen, wurden detaillierter auf ihre Wirkungsweise mittels der Durchflusszytometrie untersucht. Bei der Substanz Ratjadon, die in früheren Arbeiten schon Apoptose auslösende Eigenschaften gegenüber verschiedenen Säugerzelllinien zeigte, wurden der Wirkmechanismus des Ratjadons und die Stressantworten der Zellen mittels der DNA-Chiptechnologie untersucht.

In dieser Arbeit wurden antikörperproduzierende BA-D5-Zellen nach ihrer Produktivität sortiert. In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der Produktivität einer Antikörperproduzierenden B-Lymphozytenzelle und ihren Oberflächen assoziierten Antikörper beschrieben [Sen *et al.*, 1990]. Zellen, die durch Mutation ihre Eigenschaft Antikörper zu produzieren, verloren haben, besitzen auch keine Oberflächenantikörper. Dieser Unterschied wird zur Erhöhung der Antikörperproduktivität durch Selektion der Zellen ausgenutzt. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörpers werden die antikörperproduzierenden Zellen von den nicht produzierenden Zellen durch *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) abgetrennt [Kromenaker *et al.*, 1994].

Stichworte: Durchflusszytometrie, 2D-Fluoreszenzspektroskopie, FACS

Abstract

This study entails new application areas of 2 D fluorescence spectroscopy as a new optical analytic processes in the field of biotechnology. Furthermore, the results of the flow cytometry were compared to the results of the DNA-chip technology to serve as schemes.

The mixing behaviour of a new reactor system consisting of a big cultivating reactor (20 l) and a small test reactor (300 ml) were closely characterised by performing pulsing trials. Subsequently, the reactor system was tested in a yeast cultivation. In a CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) the synchronous growth of the yeast cells were optimized. At the same time, the analysis of the continuous cultures, serving for the description of the metabolic behaviour and the division cycle, were revised. The study mainly focussed on the specific flow cytometric analysis of the cell cycle. In addition, the synchronically growing *Saccharomyces cerevisiae* were concentrated further in their cell cycle phases to produce a cell cycle specific DNA chip.

For the testing of possible cytotoxic effects of pharmaceutically interesting substances on mammalian cells the MTT-test was applied for the study of synthetically fabricated compounds as potential agents in in vitro tests. Active agents showing an effect on the used cell lines were examined more closely by flow cytometric analyses towards their mode of effectiveness. The formerly found apoptotic effect of the substance Ratjadon on cells was examined as to the mechanism of effectiveness, and the stress answers of the cells were examined by means of the DNA-Chiptechnology.

The BA-D5-cells used in this study are sorted repeatedly on the basis of their fluorescence intensity, and thus the ratio of non-producing cells is minimised. An interrelation between the productivity of an antibody producing B-lymphocyte cell and its surface-associated antibodies has been described in literature [Sen et al., 1990]. Cells, which have lost their ability to produce antibodies by mutation, do not feature surface antibodies. This distinction is benefited from to boost the production of antibodies by selecting the cells. With the help of a fluorescence labelled anti-mouse-IgH-antibody the antibody producing cells are separated from the non-producing cells by means of the *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) [Kromenaker et al., 1994].

Keywords: flow cytometry, FACS, 2 D fluorescence spectroscopy, in vitro toxicity

1. Einleitung und Zielsetzung

Um eine optimale Raum-Zeit-Ausbeute eines biotechnologischen Prozesses zu erreichen, wird der Abbruch des Prozesses anhand eines Parameters bestimmt, wie beispielsweise das Erreichen einer bestimmten Prozesszeit oder das Erreichen einer Schwellkonzentration einer an dem Prozess beteiligten Substanz. Der Einsatz nicht-invasiver optischer Analysesysteme hat sich in der Biotechnologie gegenüber den klassischen Analyseverfahren bewährt. Bei der klassischen Offline-Analytik, wie z.B. der Chromatographie wird eine Probe aus dem Prozess entnommen und zur Analyse gebracht. Die dabei erhaltenen Informationen stehen erst mit einer Verzögerung zur Verfügung. Bei der zweidimensionalen (2D-) Fluoreszenzspektroskopie können verschiedene Prozessparameter simultan erfasst werden. Dabei werden große Datenmengen generiert, die aufgrund der komplexen Wechselwirkungen in biologischen Systemen schwer interpretierbar sind. Mit Hilfe chemometrischer Auswerteverfahren können auch nicht direkt erfassbare Informationen aus den Spektren gewonnen werden.

Die Durchflusszytometrie wurde in den 70er Jahren für die medizinische Diagnostik entwickelt. Mittlerweile hat sie sich auch in der Biotechnologie und Biologie als Analysenmethode und als präparatives Instrument etabliert. Im Gegensatz zur 2D-Fluoreszenzspektroskopie werden keine intrinsischen Fluorophore vermessen sondern es wurden viele Färbemethoden entwickelt, die sich zur Untersuchung einer Reihe von biologischen Fragestellungen anwenden lassen.

Die DNA-Chiptechnologie wurde Ende der 80er Jahre entwickelt [Fodor et al, 2004] und heute lassen auf einem einzigen Chip über 100.000 bekannte Gene identifizieren sowie deren Aktivität untersuchen. Die Änderung der Genexpression lässt sich auf einem Chip untersuchen auf dem zwei Proben mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung aufgetragen sind. Ziel dieser Arbeit war es die 2D-Fluoreszenzspektroskopie, die Chiptechnologie und die Durchflusszytometrie auf neue Fragestellungen anzuwenden.

2-Reaktorsystem

Das Mischungsverhalten eines neuen Reaktorsystems, bestehend aus einem großen Kultivierungsreaktor (20 L) und einem kleinen Testreaktor (300 mL), soll anhand von Pulsversuchen näher charakterisiert werden. Anschließend soll das Reaktorsystem am Beispiel einer Hefekultivierung getestet werden.

Kontinuierliche Hefekultivierung

In einem CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) soll das synchrone Wachstum der Hefezellen optimiert werden. Gleichzeitig soll die Analyse der kontinuierlichen Kulturen der Beschreibung des Stoffwechselverhaltens und des Teilungszyklus dienen. Der Schwerpunkt der Untersuchungen soll hierbei auf der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus im Vergleich zur 2D-Fluoreszenzspektroskopie liegen. Weiterhin werden die Ergebnisse mit der In-situ Mikroskopie verglichen.

DNA-Chipexperiment an synchronen Hefekultivierungen

Synchron wachsende *Saccharomyces cerevisiae* weisen eine Synchronität von ca. 80 % in der G1-Phase des Zellzyklus auf. Für die Durchführung eines DNA-Chip Experiments sollten die Hefen zu 100 % in der G1, S und G2-Phase vorliegen. Hierfür sollen die Hefen durch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) nach ihren Zellzyklusphasen sortiert werden.

In-vitro-Testung

Bei der In-vitro-Testung sollen neue Wirkstoffe auf ihre proliferationshemmende Wirkung auf Säugerzellen untersucht werden. Zur Verfügung stehen drei synthetisch hergestellte Wirkstoffe, die an unterschiedlichen humanen Tumorzelllinien getestet werden sollen. Mit durchflusszytometrischen Untersuchungen soll die Funktionsweise der Proliferationshemmung näher untersucht werden. Bei Apoptose auslösenden Substanzen soll dann die Genaktivität der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit der DNA-Chiptechnologie bestimmt werden.

Produktionssteigerung von Hybridomzellen

Diese Arbeit untersucht die Möglichkeit der Antikörperproduktionssteigerung der kommerziell erhältliche Hybridomzelllinie BA-D5 [Schiaffino *et al.*, 1989] durch Selektion hochproduzierender Einzelzellen. Zusammenhänge zwischen der Produktivität einer Zelle und ihren Oberflächen assoziierten Antikörper werden in der Literatur beschrieben [Sen *et al.*, 1990]. Mutierte Zellen können ihre Eigenschaft Antikörper zu produzieren verlieren und besitzen keine Oberflächenantikörper. Mit Hilfe eines Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugierten Anti-Maus-IgG-Antikörpers werden die antikörperproduzierenden Zellen von den nicht produzierenden Zellen mittels FACS abgetrennt [Kromenaker *et al.*, 1994]. Anhand der Fluoreszenzintensität werden die BA-D5-Zellen mehrfach sortiert, um so der Anteil an unproduktiven Zellen zu minimiert.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Durchflusszytometrie

In der Zytologie wird der Aufbau und die Funktion von pflanzlichen, tierischen und humanen Zellen und ihrer Organellen untersucht. Durch die Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie und Färbemethoden werden Informationen über die zu untersuchenden Zellen gewonnen, wie z.B. über die Differenzierung und die Viabilität der Zelle. Der Nachteil der Mikroskopie besteht darin, dass jeder Betrachter eine subjektive Analyse erstellt und nur eine relativ kleine Zahl von Zellen beobachtet werden kann. Der Bedarf, viele Zellen in kürzester Zeit objektiv zu messen führte zur Entwicklung der Durchflusszytometrie. Die Geräte, mit denen man durchflusszytometrische Analysen durchführt, heißen Durchflusszytometer, eine Spezialform ist das „FACS“. Der Ausdruck „FACS“ ist ein registriertes Markenzeichen der Firma Becton-Dickinson und steht für Fluorescence Activated Cell Sorting. Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, dass Zellen in Suspension an einem Objektiv einzeln vorbeigeführt werden und dabei von einem fokussierten Lichtstrahl getroffen werden. Dabei wird Licht aufgrund unterschiedlicher optischer Dichten gestreut oder durch Fluoreszenzfarbstoffe emittiert und durch Photomultipliern und Photodioden gemessen. Die Durchflusszytometrie ist bereits seit vielen Jahren in der Medizin etabliert und wird in der Zelldiagnostik verwendet, mit deren Hilfe sich spezifische Tumor-Antigene, Proliferationsaktivität und Zellzyklusanomalien schnell und zuverlässig nachweisen lassen. Durchflusszytometer der letzten Generation können bis zu 10 verschiedene Messgrößen für jede Zelle erfassen. Die Ergebnisse einer Messung werden in Histogrammen als Verteilung gegen die Zellpopulation aufgetragen. Bei einer Messung lassen sich morphologische Größen, wie die Zellgranularität und die Zellgröße, im Seitwärtsstreulicht und im Vorwärtsstreulicht erfassen. Wobei das Vorwärtsstreulicht mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität einer gemessenen Zelle korrelieren. Des Weiteren lässt sich die Fluoreszenzintensität von markierten Partikeln bzw. Zellen im Durchflusszytometer erfassen. Die Fluoreszenzintensität hängt dabei von dem eingesetzten Farbstoff und der untersuchten Zelle ab, da die Eigenschaften der Zelle, wie beispielsweise der DNA-Gehalt, ausschlaggebend für die Menge an gebundenen Farbstoff sind. Es existiert eine Reihe von Farbstoffen, die für unterschiedliche Fragestellung eingesetzt werden.

Funktionsweise des Durchflusszytometers

Durchflusszytometer sind aus drei Komponenten aufgebaut: dem Flüssigkeitssystem zum Transport der Zellen zur Detektionskammer, dem optischen System zur Bestrahlung der Zellen und Erfassung der Signale und dem elektronischen System zur Steuerung und zur Datenerfassung und -auswertung.

Flüssigkeitssystem

Der schematische Aufbau des Flüssigkeitssystems ist in Abbildung 2-1 wiedergegeben. Die Zellen werden durch Überdruck von dem Probenröhrchen in die Detektionszelle gebracht. Durch hydrodynamische Fokussierung wird erreicht, dass die Zellen den Analysepunkt einzeln und nacheinander passieren. Bei dieser Fokussierung wird der Probenstrom durch einen in umgebenden isotonischen und partikelfreien Hüllstrom verjüngt. Durch die laminare Strömung wird eine Vermischung der beiden Flüssigkeiten verhindert. Dieser Flüssigkeitsstrom fließt anschließend durch eine Küvette in geschlossenen Systemen bzw. durch eine Düse in offenen Systemen. Bei reinen Durchflusszytometern wird zur Analytik der Probenstrom nach der Messung verworfen. Bei den FACS-Geräten kann die gewünschte Zellpopulation nach dem Messen noch durch elektrostatische Aufladung aus der restlichen Population herausortiert werden. Der Küvettendurchmesser in geschlossenen Durchflusszytometern ist nicht veränderbar, wobei in offenen Systemen der Düsendurchmesser von 50-400 μm einsetzbar ist. Die kritischen Parameter des Flüssigkeitssystems bei einer Messung ist der Hüllstromdruck (sheath pressure) und die Druckdifferenz zum Probenstrom (sample differential). Der Hüllstromdruck ist bei einer Messung fest eingestellt und wird nur bei einer Veränderung des Düsendurchmessers angepasst. Die Erhöhung der Druckdifferenz beeinflusst den Durchmesser des Probenstroms und führt zu einer breiteren Verteilung der Zellen im Laserfokus und damit zu einer größeren Varianz des Signals (Abbildung 2-1).

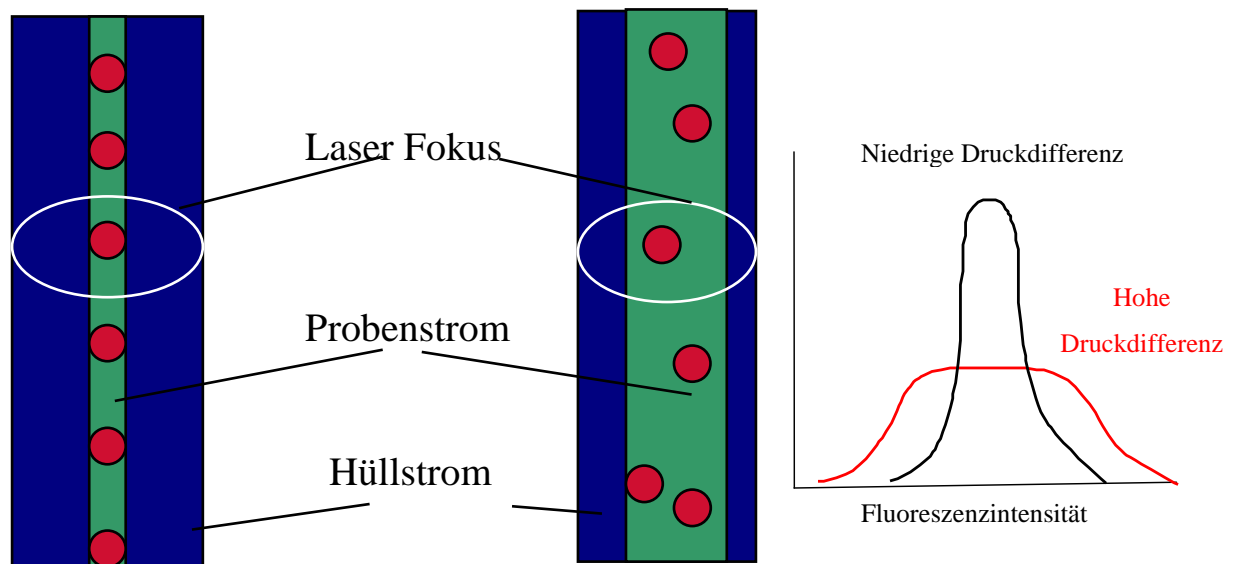


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Einflusses des Probendrucks. Die Erhöhung des Probendrucks hat Einfluss auf den Durchmesser des Probenstroms und somit auf die Varianz des Signals.

Optisches System

Das optische System besteht aus der Lichtquelle, den Detektoren für das Vorwärts-(FSW) und Seitwärtsstreulicht (SSW) sowie aus Strahlenteilern und optischen Filtern. In allen Durchflusszytometern ist die Optik so angeordnet, dass der Probenstrom, das einfallende Licht und das Seitwärtsstreulicht jeweils senkrecht zueinander stehen, wie in

Abbildung 2-2 dargestellt. Als Lichtquelle werden heutzutage bis zu maximal drei unterschiedliche Lasern benutzt. Ein Argon-Ionen Laser mit seiner Anregungswellenlänge von 488 nm wird in allen Durchflusszytometern als Primärlichtquelle eingesetzt. Das Vorwärtsstreulicht wird durch eine Linse gesammelt und durch ein Diodenarray im 2-18° Winkel gemessen. Das Seitwärtsstreulicht wird ebenfalls durch eine Linse gesammelt und durch dichroitische Spiegel in bis zu 10 Wellenlängenbereiche aufgeteilt und durch Photomultiplier (PMT) detektiert.

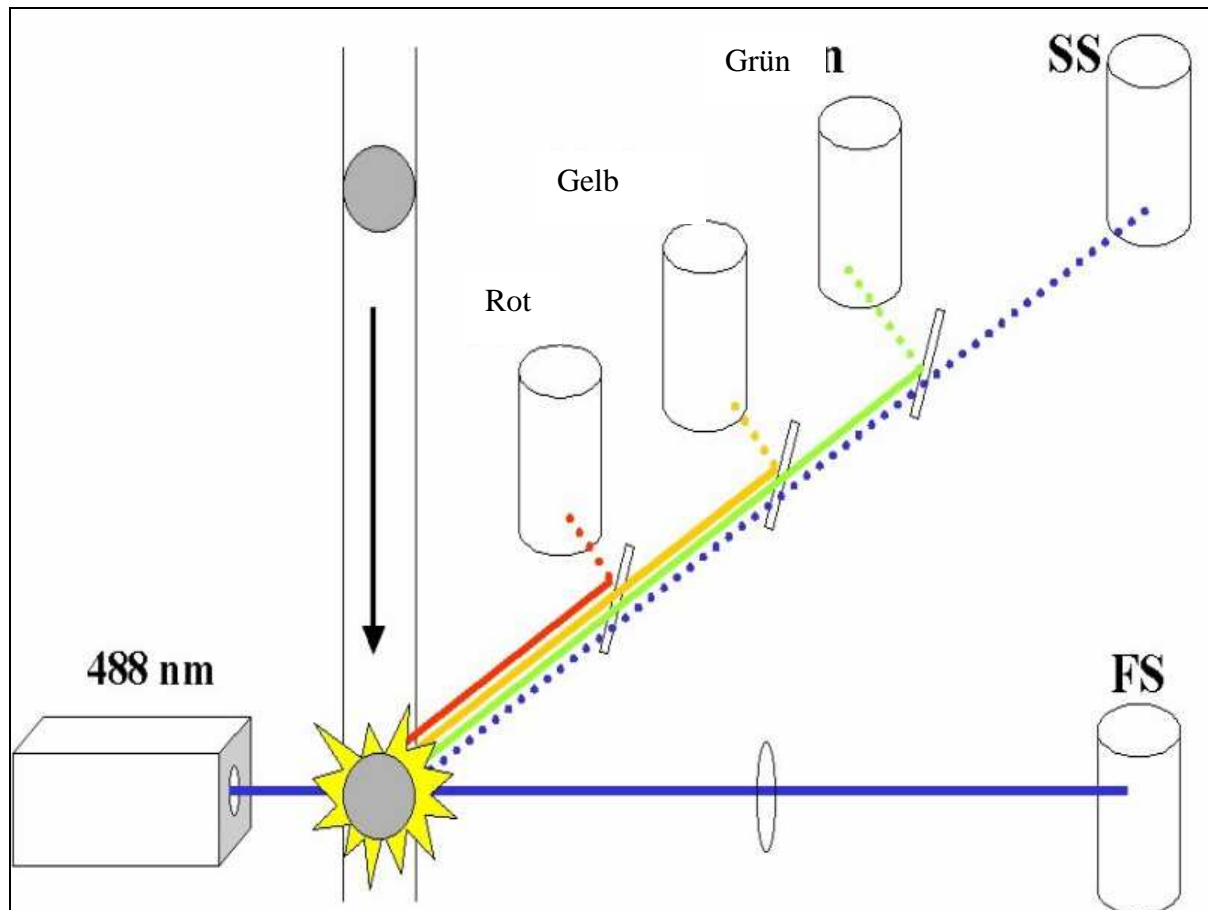


Abbildung 2-2: Schematischer Aufbau des optischen Systems in einem Durchflusszytometer.

Elektronisches System

Das elektronische System besteht aus den PMTs und den Dioden, die das einfallende Licht in elektrische Signale umwandeln. Durch einen Computer wird der Druck der Flüssigkeitsströme und die Verstärkungsspannung der PMTs gesteuert. Die Messdaten werden als Rohdaten für jeden Messkanal (FSW, SSW und Fluoreszenzsignale) gespeichert und lassen sich dann in sogenannten Histogrammen oder Dotplots darstellen. Bei den Histogrammen werden die Daten eines Messkanals gegen die Partikelzahl aufgetragen, bei Dotplots werden zwei Messkanäle gegeneinander aufgetragen. Durch Markieren bestimmter Bereiche in den Histogrammen und Dotplots lassen sich Filter für weitere Untersuchungen erstellen (Gating).

FACS

Um auch präparativ zu arbeiten wurden Sortiereinheiten an die Durchflusszytometer angefügt. Dadurch ist es möglich, Zellen nach definierten messbaren Charakteristika zu isolieren. Erste

Sortiereinheiten beruhen darauf, dass der Flüssigkeitsstrom nach dem Messpunkt durch ein Ventil auf zwei Abflussleitungen aufgespalten wurde. Durch die Mechanik ist diese Art des Sortierens sehr langsam bzw. eine höhere Geschwindigkeit resultiert in einer geringeren Reinheit. Moderne Sortiereinheiten basieren darauf, dass der Probenstrom durch Schwingungen eines Piezoelements zu einem stabilen Tropfenstrom übergeht. Die Probenstromtropfen können elektrostatisch aufgeladen und in einem elektrischen Feld abgelenkt werden. Um einen konstanten Abrisspunkt des Probenstroms zu erhalten, wird eine konstante Schwingung erzeugt, die von dem Durchmesser des Probenstroms abhängig ist. Die Bestimmung des Abstandes zwischen den Tropfenabrisspunkt und dem Messpunkt ist von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Sortierung. Der schematische Verlauf des Tropfenstromes ist in Abbildung 2-3 wiedergegeben.

Nach Verlassen der Düsenöffnung passiert die Zelle den Analysenpunkt und die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden an den Computer weitergeleitet und verarbeitet. Wird eine Zelle detektiert die die Kriterien zum Sortieren erfüllt, wird der Flüssigkeitsstrom zu dem Zeitpunkt an dem die Zelle sich am Tropfenabrisspunkt befindet, mit einer elektrischen Ladung versehen. Die elektrostatische Aufladung des Tropfens bewirkt, dass sich dieser durch Ablenkplatten in bis zu 4 unterschiedliche Probenröhrchen leiten lässt. Unsortierte Zellen werden im Zentralstrom dem Abfall zugeführt.

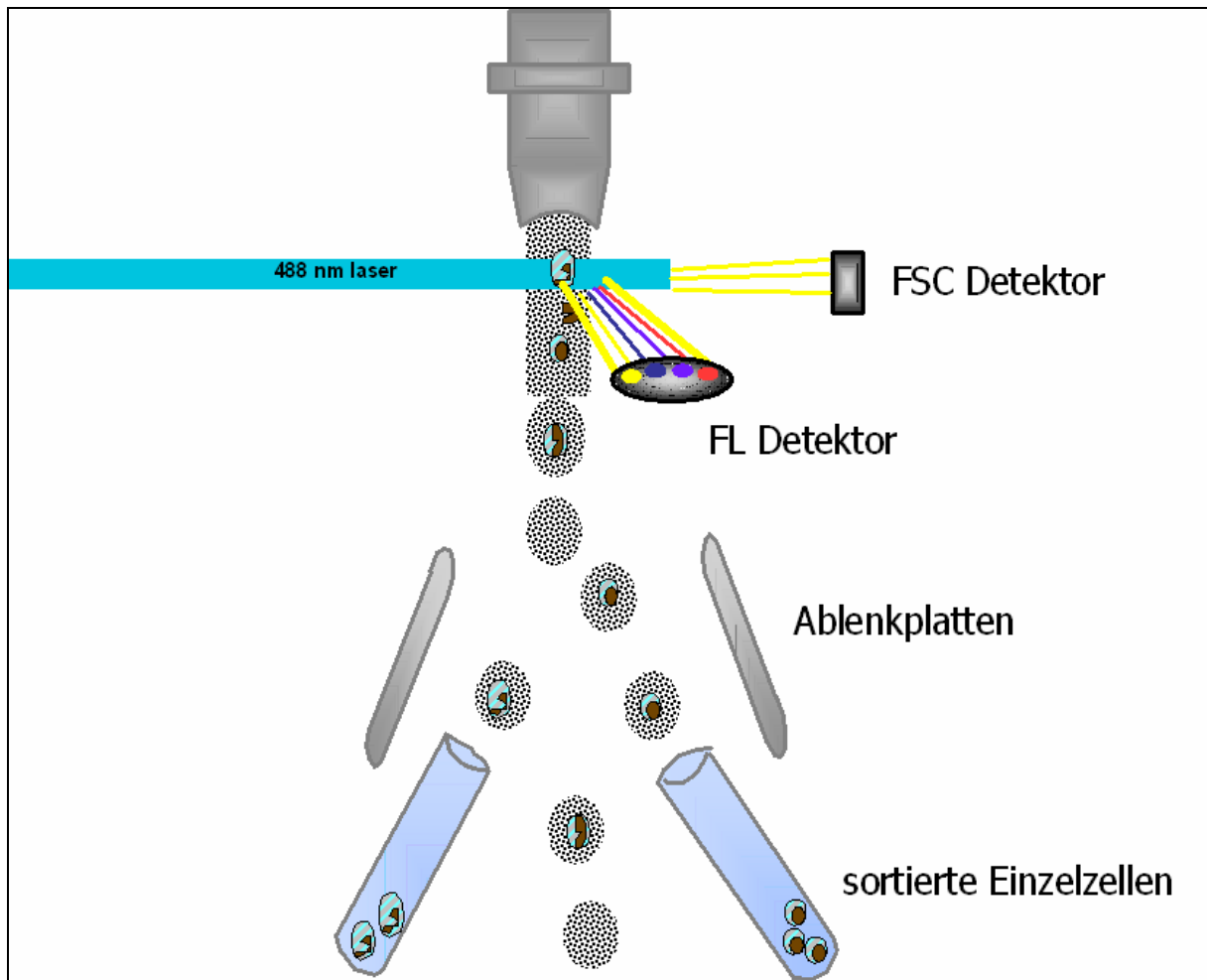


Abbildung 2-3: Schematischer Verlauf des Tropfenstroms in einem FACS

2.2. Säugetierzellkultivierung

Bei der Säugerzellkultivierung wird zwischen adhärenenten und in Suspension wachsenden Zellen unterschieden. Adhärenente Zellen verankern sich an die Oberfläche des Kultivierungsgefäßes und wachsen in Monolayern. Sie können mittels proteolytischer Enzyme wie z.B. Trypsin oder mechanisch durch Zellschaber abgelöst werden. Suspensionszellen werden in Spinnerflaschen kultiviert in denen eine Rührvorrichtung die Zellen durch ständiges Rühren vom Absinken auf den Boden abhält.

Die Anwendungsgebiete der Säugetierzellkultivierung beinhalten die Grundlagenforschung zur Funktionsweise und Aufbau der Zellen und deren Differenzierung, die Testung toxikologischer und pharmazeutischer Stoffe *in vitro* und die Produktion wichtiger Biomoleküle wie z.B. Impfstoffe, Hormone, Antikörper und Enzyme.

Zellkulturen, die direkt aus dem Gewebe eines Organismus hergestellt werden, werden als Primärkulturen bezeichnet. Primärkulturen werden in der medizinischen Therapie zur Kultivierung von Organ- oder Gewebezellen eingesetzt, um z.B. neue Haut für Verbrennungsoffer zu gewinnen. Diese Anwendung wird als Tissue Engineering bezeichnet. Durch Kultivierung der Primärkulturen lassen sich Sekundärkulturen erstellen, die noch viele Eigenschaften des Ursprunggewebes besitzen. Nach weiterer Kultivierung der Zellen sterben diese nach einer endlichen Wachstumsphase ab und können ihre ursprünglichen Eigenschaften verlieren. Um Zellen zu erhalten, die sich beliebig oft subkultivieren lassen, können Zellen durch Transformation mit einem tumorinduzierenden Virus immortalisiert werden oder es werden direkt Krebszellen verwendet. Diese Kulturen sind kommerziell erhältlich und werden als Zelllinien bezeichnet.

In der Industrie werden Säugerzellen häufig zur Produktion von Human-Proteinen eingesetzt. Der Nachteil der langsameren Proliferation gegenüber Prokaryoten wird durch die einfachere Aufarbeitung ausgeglichen. So sind z.B. bei der Produktion von Insulin aus *E.coli* noch weitere Spaltungs- und Faltungsschritte notwendig, während dies bei aus Säugerzellen gewonnenen Insulin nicht der Fall ist. Kleinere Produktmengen können in vielen unterschiedlichen spezialisierten Kulturgefäßen produziert werden, für größere Ansätze finden Bioreaktoren mit einem Volumen von 100-10.000 Liter Anwendung.

In-vitro-Untersuchungen

Aus Tierschutzgründen und um die Anzahl und die dadurch verursachten Kosten von Tierversuchen gering zu halten, wurden toxikologische und pharmakologische Untersuchungen vom Tiermodell auf In-vitro-Modelle übertragen.

In der pharmazeutischen Forschung werden neue Wirkstoffe in der so genannten vorklinischen Phase an Zellen getestet. Erst nach erfolgreicher Wirkungsprüfung wird dieser Wirkstoff an Tieren und anschließend an Menschen in der klinischen Phase auf Wirksamkeit und Einsetzbarkeit in der Therapie geprüft. Die In-vitro-Tests werden hier bevorzugt an frischen Primärkulturen durchgeführt, die nach Operationen gewonnen werden können. Diese Primärkulturen haben den Vorteil, dass sie noch organspezifische Eigenschaften aufweisen. Weiterhin kann die In-vitro-Testung noch Aussagen über die Kinetik und Profile des Metabolismus treffen. Hierfür werden hauptsächlich Mikosomen der Leberzellen verwendet.

In der toxikologischen Forschung werden hauptsächlich Zelllinien verwendet. Nur für spezifische Fragestellungen werden Primärzell- oder Gewebekulturen herangezogen, wie z.B. bei Mutagenitätsuntersuchungen. Die am häufigsten in der Toxikologie verwendete In-vitro-Methode ist die Züchtung von Zellen aus unterschiedlichen Organen. Dabei werden frisch isolierte Primärzellen oder Zelllinien verwendet. Moderne In-vitro-Methoden versuchen Zellaggregate zu imitieren, um die Komplexität von Organen zu simulieren [Burzlaff, 2005]. In der Toxikokinetik werden Leberzellen aus verschiedenen Spezies für Metabolismusstudien verwendet. Um die Anzahl der Tierversuche für die toxikologische Beurteilung von Stoffen zu reduzieren, wurden von der OECD Richtlinien zur Durchführung vorgeschlagen. Dabei wird eine Vergleichbarkeit aller Tierversuche angestrebt und die Annerkennung durch alle Staaten. Ausgenommen hierfür ist die Prüfung von Arzneimitteln.

Zellzyklus

Der Zellzyklus von eukaryontischen Zellen wird in fünf Phasen unterteilt (Abbildung 2-4). Sein zeitlicher Ablauf wird durch die Synthese und Abbau von Cyclinen bestimmt.

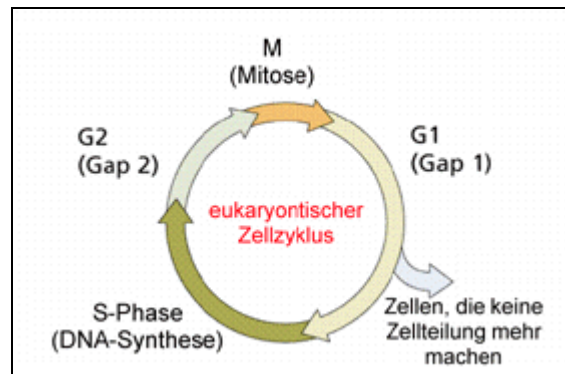


Abbildung 2-4: Übersicht über den Zellzyklus bei Eukaryonten [www.zum.de]

Fehlen Mitogene, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren oder Substrate, befinden sich die Zellen in der G_0 -Phase und teilen sich nicht mehr. Auf bestimmte Signale hin können diese Zellen die G_0 -Phase verlassen und treten in die G_1 -Phase ein. In dieser Phase werden Proteine synthetisiert, die für die darauf folgende S-Phase von Bedeutung sind. Das Zellvolumen nimmt zu. Zwischen G_1 - und S-Phase existiert ein Kontrollpunkt, an dem die Integrität der DNA, die Größe der Zelle und die Verfügbarkeit von Mitogenen geprüft werden. In der S-Phase kommt es zu einer Replikation der gesamten DNA. In der darauf folgenden G_2 -Phase werden Proteine für die M-Phase translatiert. Am Ende der G_2 -Phase befindet sich ein weiterer Kontrollpunkt. Hier wird neben der Größe der Zelle die Vollständigkeit der DNA-Replikation überprüft. In der M-Phase findet die eigentliche Zellteilung statt. Aus einer Zelle entstehen so zwei identische Tochterzellen. Die Kontrollpunkte haben eine große Bedeutung im Zellzyklus. Wird DNA z.B. durch Carcinogene beschädigt, würde dies ein erhöhtes Mutationsrisiko bei der Zellteilung bedeuten. Tritt eine solche Schädigung auf, wird vermehrt das Tumorsuppressor-Protein p53 synthetisiert. Dieses hat zur Folge, dass z.B. das Protein p21 gebildet wird, welches den Übergang von der G_1 - in die S-Phase inhibiert. Kann der Fehler nicht behoben werden, kommt es durch p53 zur Initiation von Apoptose.

Apoptose und Nekrose

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Dieses Selbstmordprogramm kann durch äußere Einflüsse eingeleitet werden (z.B. durch Immunzellen) oder aufgrund zellinterner Prozesse ausgelöst werden (z.B. nach unvollständiger DNA-Replikation). Der apoptotische Vorgang verläuft nach einem immer exakt gleichen Schema. Im Vergleich dazu ist die Nekrose ein passiver Vorgang der meist durch äußere Einflüsse wie z.B. einer Verletzung hervorgerufen wird. Das bei der Nekrose freiwerdende Zytoplasma führt im

umgebenen Gewebe meist zu Entzündungsreaktionen. Die unterschiedlichen Verläufe der Apoptose und Nekrose sind in Abbildung 2-5 dargestellt. Einige der apoptotischen Erscheinungen lassen sich durchflusszytometrisch nachweisen. Das Phosphatidylserin das bei Beginn der Apoptose von der zytoplasmatischen auf die Außenseite der Zellmembran translokalisiert wird, kann durch das Membranundurchlässige Protein Annexin V selektiv mit einer sehr hohen Spezifität gebunden werden. Das Annexin V Protein ist durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert, hat aber den Nachteil das nekrotische Zellen aufgrund ihrer fehlenden Membranintegrität auch durch Annexin V gefärbt werden. Diese werden mit einem weiteren membranundurchlässigen Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Propidiumiodid, ein DNA spezifischer Farbstoff) ausgeschlossen. Die Apoptose kann durch eine Reihe von äußeren Einflüssen ausgelöst werden wie durch Zugabe von Chemikalien wie z.B. Tri-n-butylzinn, Zugabe eines Fas-Liganden, einen kurzem Hitzeschock bei 42°C oder auch UV- und γ -Strahlung.

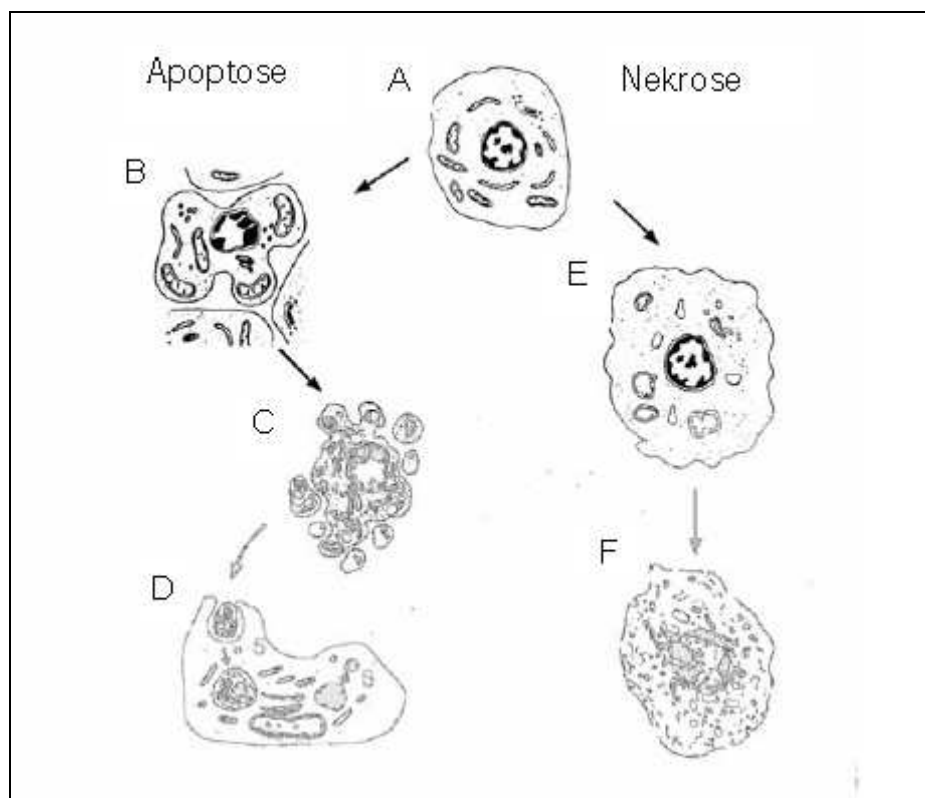


Abbildung 2-5: A: gesunde Zelle, B: Kernkondensation, Translokation von Phosphatidylserin, C: Bildung von Apoptosekörperchen, D: Phagozytose, E: angeschwollene nekrotische Zelle und F: Zellyse. Grafik modifiziert nach Kerr (1995).

2.3. Hefekultivierungen

Je nach Ziel der Kultivierungsexperimente kann die Hefezüchtung auf verschiedene Arten erfolgen. Die häufigsten Methoden sind die Batch- und die kontinuierliche Kultivierung, die im Folgenden beschrieben werden.

Batch Kulturen

Batch-Kultivierungen sind die einfachste Art der Zellzüchtung, da nach einer einmaligen Substratvorlage den Zellen keine weiteren Nährstoffe zugeführt werden. Hefen zeigen beim Wachstum auf Glucose als einziges Substrat in Batch-Kulturen ein Zweiphasen-Wachstum (Diauxie). Beide Wachstumsphasen setzen sich aus einer Lag-Phase und einer Exponentiellen Phase zusammen. Die Lag-Phase ist durch das Ausbleiben der Proliferation trotz günstiger Umweltbedingungen gekennzeichnet und tritt immer dann auf wenn drastische Veränderungen in der chemischen Umgebung der Zellen stattfinden. Während dieser Phase adaptieren die Zellen die neuen Bedingungen und stellen ihren Stoffwechsel auf die Umgebung ein. Nach einer linearen Anlaufphase setzt das exponentielle Wachstum ein. Die Zellvermehrung kann, unter der Voraussetzung, dass kein wachstumsbegrenzender Faktor auftritt, mit einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung beschrieben werden.

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} x \quad (0.1)$$

x : Zellmassenkonzentration [g/L]

μ_{\max} : maximale Wachstumskonstante

Tritt nur ein einziger limitierender Faktor auf, kann die Wachstumskonstante μ mit der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{[S] + K_M} \quad (0.2)$$

[S]: Konzentration des limitierten Substrats

K_M : Michaelis-Menten-Konstante

Die zwei Wachstumsphasen zeichnen sich durch unterschiedliche Stoffwechselprozesse aus. In der ersten Wachstumsphase wird Glucose oxidoreduktiv zu Biomasse und Ethanol umgesetzt. Die zweite Phase ist durch den Verbrauch des zuvor gebildeten Ethanols sowie anderen zwischenzeitlich gebildeten Metaboliten (z. B. Acetat, Pyruvat, etc.) gekennzeichnet. Durch die kontinuierliche Bildung und den Verbrauch dieser Metabolite sehen sich die Zellen einer sich ständig ändernden chemischen Umgebung ausgesetzt. Diese wirkt sich direkt auf die biologische Aktivität und den Stoffwechsel der Zellen aus [STÄRK, 2002]. In Abbildung 2-6 ist das Wachstum einer Hefe-Batch-Kultur nach einem Vorschlag von LOCHER et al. (1993) in sieben verschiedene Stoffwechselphasen eingeteilt.

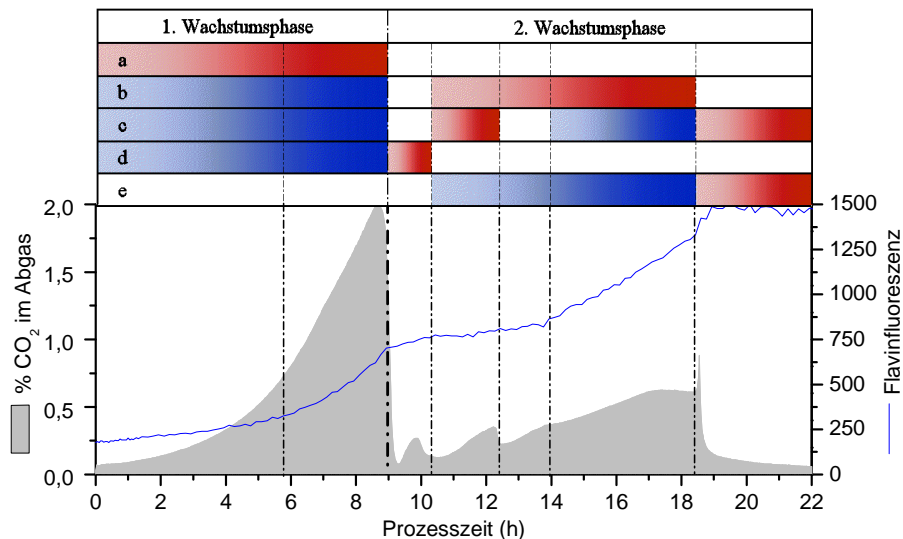


Abbildung 2-6: Verlauf des CO₂-Anteils im Abgas und der Flavinfluoreszenz einer typischen Hefe-Batch-Kultur. Der Prozess ist in sieben verschiedene Stoffwechselphasen eingeteilt wobei jede der Phasen durch die Bildung (blau) und den Verbrauch (rot) verschiedener Metabolite a) Glucose, b) Ethanol, c) Acetat, d) Pyruvat, e) andere org. Säuren gekennzeichnet ist [nach LOCHER et al., 1993].

Zur Verdeutlichung des diauxischen Wachstumsverhaltens ist die mittels Online-2D-Fluoreszenzspektroskopie gemessene relative Flavinkonzentration mit in das Diagramm eingetragen. Der typische Verlauf des CO₂-Anteils in der Reaktorabluft dient als Referenz.

Kontinuierliche Kulturen

Untersuchungen an Zellkulturen, die unabhängig von wechselnden Umwelteinflüssen sein sollen, werden in kontinuierlichen Kultivierungen im CSTR durchgeführt. Durch Online-Überwachung der Kultur ist eine Regelung auf konstante Umweltbedingungen möglich, die

eine hohe Reproduzierbarkeit und Vergleiche mit anderen Kulturen ermöglicht. Durch Änderungen der Kultivierungsbedingungen (pH-Wert, Begasung, Verdünnungsrate, etc.) kann ein direkter Einfluss auf das Wachstums- und Stoffwechselverhalten der Zellen genommen werden. Es besteht z. B. die Möglichkeit, Hefen gezielt zur Produktion von Ethanol anzuregen, was tagtäglich in Brauereien und Winzereien getan wird.

Unter bestimmten Bedingungen kann sich in kontinuierlichen Kulturen ein synchrones Wachstum einstellen. Die Zellen passen dabei ihren Teilungszyklus einander an und treten nahezu gleichzeitig in die einzelnen Stadien der Mitose ein. Autonomes synchrones Wachstum wurde ausschließlich in glucoselimitierten kontinuierlichen Kulturen beobachtet [PARULEKAR et al., 1986] [SONNLEITNER et al., 1986] [AON et al., 1997]. Der einschränkende Faktor dabei ist die Verdünnungsrate. Die genaue Lage der kritischen maximalen Verdünnungsrate (D_k) ist abhängig von der Substrat-Konzentration im Nährmedium. Für eine Glucose-Konzentration von 10 g/L gaben SONNLEITNER et al. (1986) einen Grenzwert von $D_k = 0,3 \text{ h}^{-1}$ an.

Die Induktion des synchronen Wachstums kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Eine bewährte Methode ist die Umstellung einer Batch-Kultur auf einen kontinuierlichen Betrieb. Dieser Substratshift muss nach einer mehrstündigen Hungerphase erfolgen, in der den Zellen keine assimilierbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung stehen darf [PARULEKAR et al., 1986] [BEUSE, 1997]. Ebenfalls möglich ist das Setzen von Substratpulsen (z. B. Glucose, Ethanol, etc.) [PARULEKAR et al., 1986] [MÜNCH et al., 1992] oder der Einschub von Phasen mit Eduktlimitierung (z. B. Hungerphasen oder Begasung mit Stickstoff). Spontane Oszillationen ohne vorherige Initiierung wurden ebenfalls beobachtet [ZAMAMIRI et al., 2001].

Der Mechanismus für das Zustandekommen und die Aufrechterhaltung der Oszillationen ist trotz vieler Untersuchungen an Hefekulturen immer noch nicht vollständig geklärt. Nach Meinung vieler Forschergruppen ist das intermediäre Auftreten von Glucose- oder Ethanolspitzen zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus der Trigger für anhaltende Oszillationen [SONNLEITNER et al., 1986] [MÜNCH et al., 1992]. MARTEGANI et al. (1990) beziehen außerdem die Zellmasse als einen Faktor mit in ihr Modell ein. Alle Ansätze beruhen auf der Annahme einer Durchschnittszelle und berücksichtigen nicht die dynamische Größenverteilung der Zellen.

2.4. 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Zur Beobachtung der Kulturfluoreszenz wurde der BioView-Sensor (Delta Electronics Light & Optics, Dänemark, 1999) eingesetzt. Das robuste Gerät wird durch ein wasserdichtes Edelstahlgehäuse vor chemischen und mechanischen Belastungen geschützt und findet deshalb bevorzugt in technischen Prozessen Verwendung. Die Anregerstrahlung liefert eine gepulste Xenon-Blitzlichtlampe (Hamamatsu, Japan). Als Detektor dient ein Photomultiplier. Die exziterte und emittierte Strahlung wird durch zwei voneinander unabhängig rotierenden Filterräder monochromatisiert. Der Arbeitsbereich erstreckt sich von 270 bis 550 nm (Exzitation) und von 310 bis 590 nm (Emission) bei einer Bandbreite von 20 nm je Filter. Durch die hohe Filterwechselgeschwindigkeit von 250 ms, beträgt die Aufnahmedauer eines Spektrums aller Wellenlängenkombinationen, bei Dreifachmessung und Mittelwertbildung, ca. 1,5 min. Drastische Veränderungen der Kulturfluoreszenz während einer Messung können damit ausgeschlossen werden. Der funktionelle Aufbau des BioView-Sensors ist in Abbildung 2-7 dargestellt.

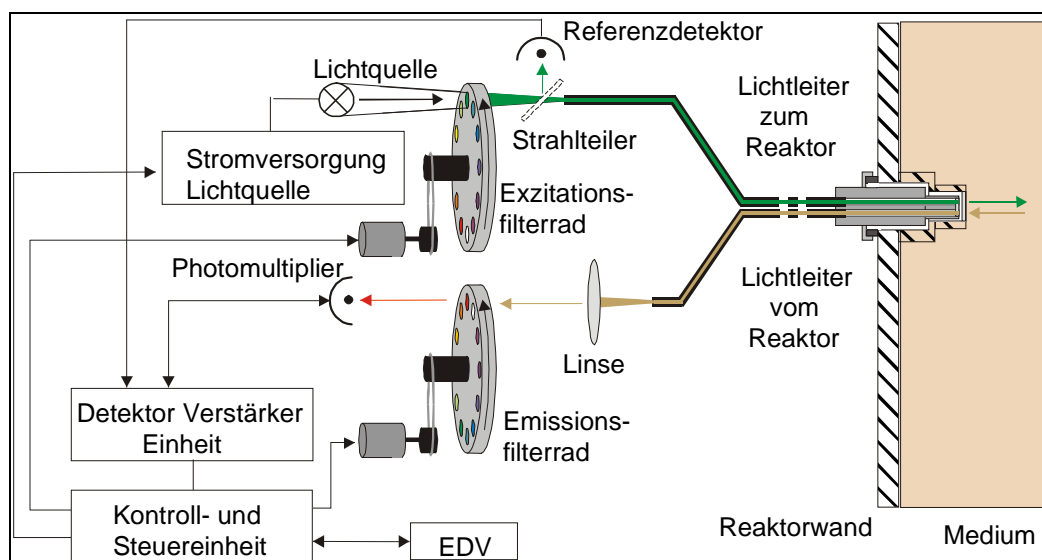


Abbildung 2-7: Schematischer Aufbau und Strahlengang des BioView-Sensors [Schweder, 2001].

Gemessen wurden sämtliche dem Gerät möglichen Wellenlängenkombinationen. Besondere Aufmerksamkeit dabei erhielten drei Gebiete im Spektrum, die den Exzitations-/Emissionsbereich natürlich vorkommender Fluorophore kennzeichnen. Tabelle 2-1 enthält eine Zusammenstellung dieser Verbindungen.

Tabelle 2-1: In der Hefekultur messbare Fluorophore und ihre Exzitations-/Emissionsmaxima.

Fluorophor	(ex/em) _{max} [nm]
NADH	340/460 [Guilbault,1973]
Tryptophan, Tyrosin	287/348 [Wolfbeis, 1985]
Flavine FAD	370/520 [Wolfbeis, 1985]
FMN	450/520 [Wolfbeis, 1985]

Da keine Vermessung der Reinsubstanzen erfolgte, können sich die Maxima durch Überlagerungen und andere Einflüsse (Temperatur, pH-Wert, Lösungsmittel, Streulicht, etc.) verschieben.

Der BioView-Sensor wird über einen Flüssigkeitslichtwellenleiter in einem dafür vorgesehenen Port mit Quarzglasscheibe (25 mm) nach der Sterilisation des Reaktors an diesem angebracht und fixiert. Die Messungen erfolgen ohne Probenahme direkt in der Kultur (in-situ), und ohne das Wachstum zu stören (nicht-invasiv). Das Gerät ist besonders für quantitative Analysen geeignet. Da eine Kalibration aufgrund der sich ändernden und nicht vollständig zu reproduzierenden Verhältnisse im Reaktor nicht möglich ist, können ausschließlich die relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) gemessen werden. Diese lassen wiederum nur Rückschlüsse auf Konzentrationsänderungen der Fluorophore im Reaktor zu und nicht auf Absolutwerte.

3. Testung des 2-Reaktorsystem

Kultivierungen in Reaktoren sind in vielen Fällen aufwändig und benötigen nicht selten eine Vorbereitungszeit von mehreren Tagen. Die reinen Experimente an den Kulturen hingegen sind oft innerhalb von einigen Stunden abgeschlossen. Viele Versuche erfordern außerdem durch Puls- oder Begasungsexperimente einen Eingriff in den Wachstumsprozess der Zellen. Für einen erneuten Versuch ist dann ein Abbruch und der Wiederaufbau der Anlage erforderlich. Die im Rahmen der Arbeiten entwickelte und erstellte 2-Reaktoranlage bietet die Möglichkeit, mehrere Experimente mit einem einzigen Aufbau durchzuführen. Nach Befüllen eines kleinen Testreaktors aus dem großen Kultivierungsreaktor können hier Experimente durchgeführt werden, ohne den Wachstumsprozess der Zellen im Kultivierungsreaktor zu stören. Denkbar sind dabei mehrere Arten der Versuchsführung. Die Versuche können parallel zu dem Bioprozess im Kultivierungsreaktor durchgeführt werden. Der Testreaktor kann auch getrennt werden und so als eigenständiger Batch-Prozess laufen mit dem weitere Experimente mit dem gleichen Inokulum durchgeführt werden können. Es können auch kontinuierliche Bioprozesse durchgeführt werden um z.B. im Falle von Hefe-Kultivierungen eine Initiation von synchronem Wachstum zu zeigen und zu untersuchen.

3.1. *Aufbau des 2-Reaktorsystems*

Es wurde ein Reaktorsystem bestehend aus einem Kultivierungsreaktor und einem Testreaktor neu aufgebaut. Das System wurde mit einem Biostat C (15 L Kultivierungsreaktor) und einem Biostat Q (300 mL Testreaktor) realisiert. Die beiden Reaktoren werden mit Schläuchen und Ventilen so verbunden, dass mit Hilfe von Peristaltikpumpen ein ständiger Austausch zwischen den beiden Reaktoren möglich ist. Zusätzlich wird an beide Reaktoren ein mit Medium befülltes Vorratsgefäß angeschlossen. In Abbildung 3-1 ist der schematische Aufbau des 2-Reaktorsystems zu sehen. Ein weiterer Vorteil der Reaktorkombination ist die bessere Vergleichbarkeit der Versuche untereinander. Da die Experimente an derselben Kultur durchgeführt werden, sind Schwankungen in biologischen Systemen in den Versuchsbedingungen nahezu ausgeschlossen.

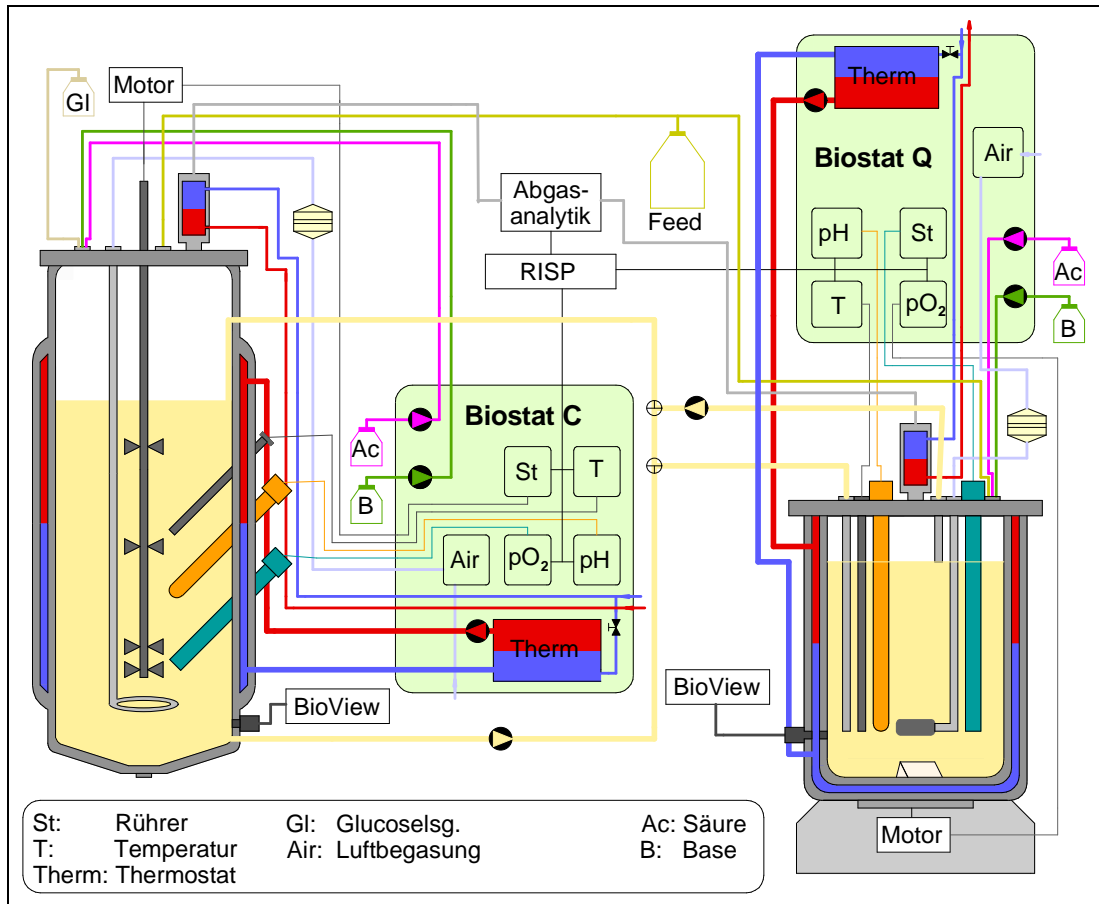


Abbildung 3-1: Schematischer Aufbau der Reaktorkombination aus den Anlagen Biostat C und Q.

Durch den Aufbau des Schlauch-Ventil-Systems kann das 2-Reaktorsystem auf drei verschiedene Arten betrieben werden, wie in der Abbildung 3-2 schematisch dargestellt ist.

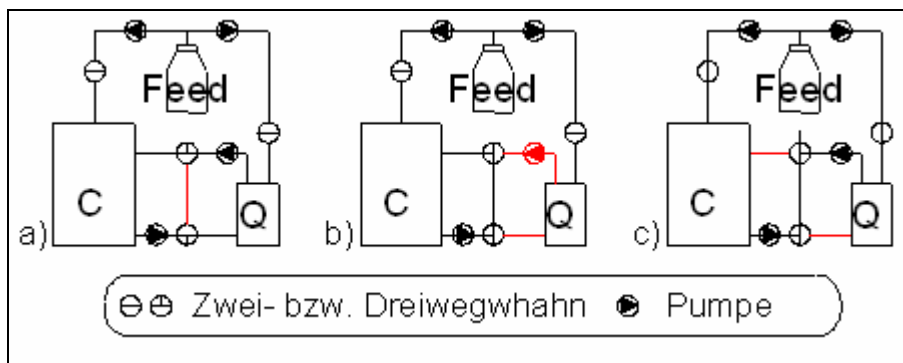


Abbildung 3-2: Verschiedene Betriebsarten der aufgebauten Reaktorkombination. a) Biostat C und Q werden zusammen als ein einheitliches Batch-System betrieben. b) Biostat C und Q werden als zwei getrennte Batch-Systeme betrieben. c) Biostat C wird als Fedbatch und Biostat Q als kontinuierliche Kultivierung betrieben. Die roten Linien kennzeichnen in jedem Fall bei der Betriebsart nicht benutzte Schlauchabschnitte.

Über zwei Drei-Wege-Ventile können die Schlauchverbindungen so geschaltet werden, dass die Reaktoren miteinander verbunden oder getrennt voneinander als Batch-Kultivierung betrieben werden können. Durch den Anschluss eines Vorratsgefäßes können beide Reaktoren auch zur Fedbatch-Kultivierung benutzt werden. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit im Biostat Q Reaktor kontinuierliche Kultivierungen durchzuführen. Frisches Kulturmedium kann fortdauernd über das Vorratsgefäß zugeführt und die überschüssige Kulturbrühe in den Biostat C gepumpt werden. Da die Verbindungsschläuche während einer Kultivierung nicht gereinigt werden, müssen die nichtbenutzten Abschnitte möglichst klein gehalten werden, um Zellablagerungen zu vermeiden. Der Biostat Q verfügt zudem über einen seitlichen Ausgang, über den er vollständig entleert werden kann.

3.2. Charakterisierung des 2-Reaktorsystems

Zur Charakterisierung des Reaktorsystems wurde es mit einem definierten Volumen an Flüssigkeit gefüllt. In dem Biostat C wurde bei laufenden Pumpen Pulse einer Riboflavin-Lösung als Tracer zugegeben und in beiden Reaktoren durch Detektion der Riboflavinfluoreszenz mit dem BioView die Änderung der Konzentration des Vitamins verfolgt. Aufgenommen wurde der Verlauf der Wellenlängenkombinationen ex430/em510, ex430/em530, ex450/em510 und ex450/em530. Für eine weitergehende Charakterisierung wurde die Pump-rate des Zulaufs des Biostat Q variiert. Die Einstellungen und die sich daraus ergebenden Kenngrößen lassen sich aus Tabelle 3-1 entnehmen.

Die Ergebnisse der ersten drei Versuche sind in Abbildung 3-3 wiedergegeben. Dargestellt ist der zeitliche Fluoreszenzverlauf der Wellenlängenkombination ex450/em510 nm im Testreaktor für die drei verschiedenen Pumpraten. Die Fluoreszenzintensität ist der Tracerkonzentration direkt proportional. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde das Riboflavin eingespritzt. Die Konzentration im Kultivierungsreaktor zu diesem Zeitpunkt wird mit c_0 bezeichnet. Alle Messwerte wurden durch die maximal gemessene Riboflavinkonzentration (c_{\max}) geteilt und so normiert. Ein registrierbarer Anstieg der Fluoreszenzintensität stellt sich bei allen drei Kurven erst nach Verstreichen einer gewissen Dauer ein, die von der Verteilungsgeschwindigkeit des Tracers im Reaktor und von der Totzeit des Zulaufs abhängig ist.

Tabelle 3-1: Einstellungen und Kenngrößen bei der Charakterisierung des 2-Reaktorsystems

Pumpgeschwindigkeit	1,5 mL/s	2,7 mL/s	3,3 mL/s	1,5 mL/s
Rührerdrehzahl Kultivierungsreaktor	1000 min ⁻¹			
Rührerdrehzahl Testreaktor	750 min ⁻¹			
Gesamtarbeitsvolumen des Systems, davon	8000 mL			6000 mL
Volumen Kultivierungsreaktor,	7635 mL			5635 mL
Volumen Testreaktor,	300 mL			300 mL
Schlauchvolumen Zulauf,	35 mL			35 mL
Schlauchvolumen Ablauf	30 mL			30 mL
hydrodynamische Verweilzeit im Kultivierungsreaktor	5090 s	2828 s	2313 s	3756 s
hydrodynamische Verweilzeit im Testreaktor	200 s	112 s	92 s	200 s

Nach der Totzeit folgt ein steiler Anstieg der Kurven, wobei der Graph mit der höchsten Fließgeschwindigkeit erwartungsgemäß die stärkste Steigung aufweist. Mit fortschreitender Zeit nähern sich alle Kurven einem Maximalwert.

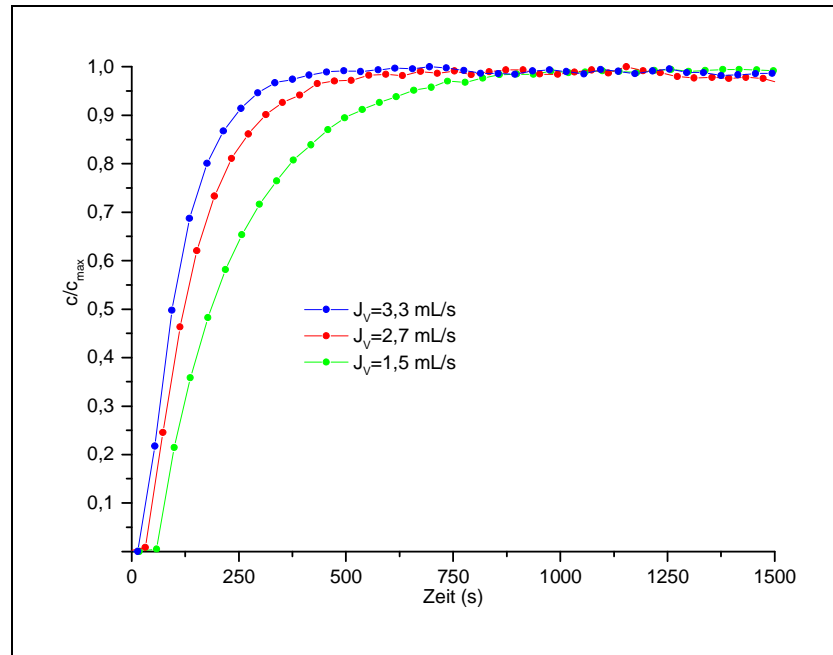


Abbildung 3-3: Normierter Verlauf der Riboflavinkonzentration bei einem Gesamtarbeitsvolumen von je 8 L und drei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten. Basierend auf den Intensitätswerten der Wellenlängenkombination $\lambda_{\text{ex450/em510}}$.

In Abbildung 3-4 ist bei längeren Laufzeiten eine Abnahme der Tracerkonzentration zu erkennen. Dieser Effekt wird durch ein theoretisches Modell beschrieben.

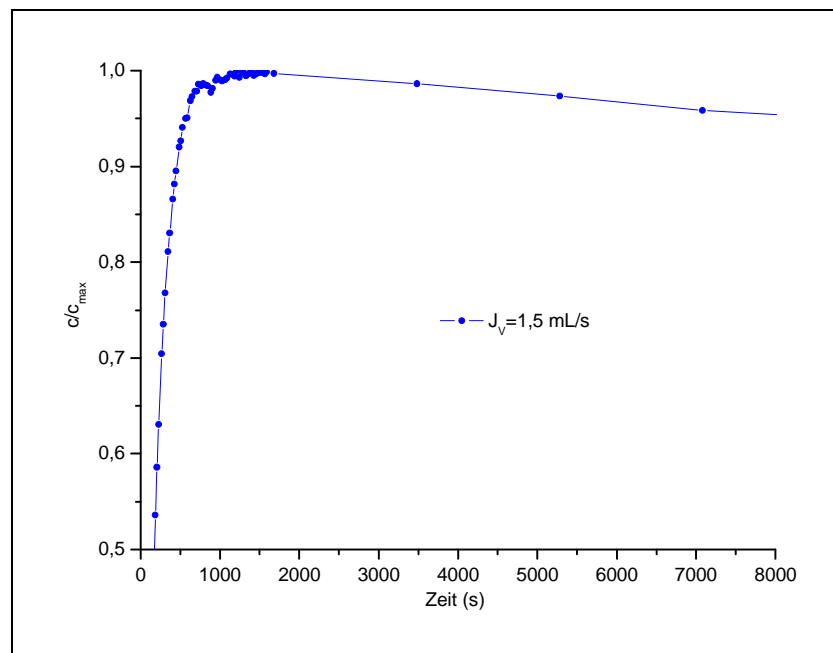


Abbildung 3-4: Normierter Verlauf der Riboflavinkonzentration bei einem Gesamtarbeitsvolumen von 6 L und einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 mL/s. Basierend auf den Intensitätswerten der Wellenlängenkombination $\lambda_{\text{ex450/em510}}$.

Durch die Kreisschaltung beeinflussen sich die beiden Reaktoren gegenseitig (Rückkopplung). Das Ausgangssignal des Kultivierungsreaktors, das einer Störfunktion entspricht, wird somit zum Eingangssignal des Testreaktors und umgekehrt. Die Schlauchabschnitte des Zu- und Ablaufs werden an dieser Stelle nicht berücksichtigt. Durch simultanes Lösen der aufgestellten Differentialgleichungen (0.3) und (0.4) können die Verhältnisse in den Reaktoren berechnet werden.

$$\frac{dc_c(t)}{dt} = \frac{c_Q(t) - c_c(t)}{\tau_c} \quad (0.3)$$

$$\frac{dc_Q(t)}{dt} = \frac{c_c(t) - c_Q(t)}{\tau_Q} \quad (0.4)$$

c_c ist die Konzentration und τ_c die hydrodynamischer Verweilzeit im Kultivierungsreaktor (Biostat C), c_Q die Konzentration und τ_Q die hydrodynamischer Verweilzeit im Testreaktor (Biostat Q).

Der Konzentrationsverlauf im Testreaktor wird durch Gleichung (0.5) beschrieben. Mit der Konstanten t_z wird die Verzögerung des Konzentrationsanstiegs im Reaktor durch den Zulauf erfasst. Für $t > t_z$ gilt:

$$c_Q = \frac{c_0 \tau_c \left(1 - e^{-\frac{(\tau_Q + \tau_c)(t - t_z)}{\tau_Q \tau_c}} \right)}{\tau_Q + \tau_c} \quad (0.5)$$

t_z : gibt die Totzeit des Zulaufs an. Mittels Variation der Konstanten c_0 und t_z wurde das Modell an die Messdaten bei verschiedenen hydrodynamischen Bedingungen angepasst. Abbildung 3-5 zeigt den Vergleich zwischen Modell und Messwerten.

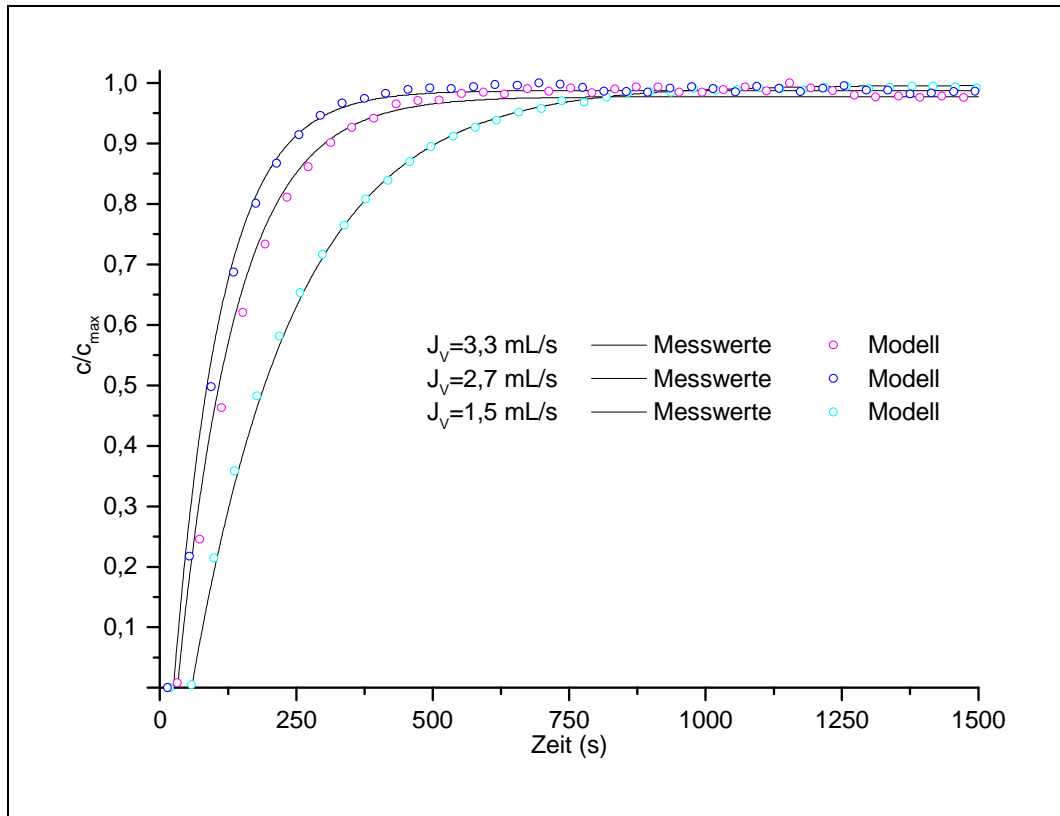


Abbildung 3-5: Vergleich des theoretischen und gemessenen Konzentrationsverlaufs des Tracers im Testreaktor bei einem Gesamtarbeitsvolumen von je 8 L und drei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten, basierend auf den Intensitätswerten der Wellenlängenkombination $\lambda_{\text{ex450/em510}}$.

Bedingt durch den Aufbau des Reaktorsystems stimmt die Endkonzentration des Tracers in den Reaktoren nicht mit der Anfangskonzentration c_0 im Kultivierungsreaktor überein. Durch die Rückführung des Inhalts des Testreaktors stellt sich vielmehr eine Gleichgewichtskonzentration im System ein, welche sich bei Kenntnis der Reaktorvolumina nach Gleichung (0.6) berechnen lässt.

$$c_{GG} = \frac{c_0 V_C}{V_{ges}} \quad (0.6)$$

c_{GG} gibt die Gleichgewichtskonzentration an, V_C ist das Volumen des Kultivierungsreaktors (Biostat C) V_{ges} ist das Gesamtarbeitsvolumen.

Der Vergleich der Werte in Tabelle 3-2 zeigt, dass die modellbasierende Gleichgewichtskonzentration um 0,08 vom aus den Messwerten berechneten Wert abweicht. Umgerechnet entspricht dieses einer Volumenabweichung von 20 % im Testreaktor. Wie in Abbildung 3-6

zu erkennen ist, nimmt die Differenz zwischen Modell- und Messwerten mit fortschreitender Laufzeit stetig zu.

Tabelle 3-2: Vergleich der erwarteten und modellbasierenden Gleichgewichtskonzentration im Reaktorsystem bei einem Gesamtarbeitsvolumen von 8 L.

Gesamtarbeitsvolumen	Aus Messwerten berechnete Gleichgewichtskonzentration	modellbasierende Gleichgewichtskonzentration
8 L	$0,954 \cdot c_0$	$0,962 \cdot c_0$

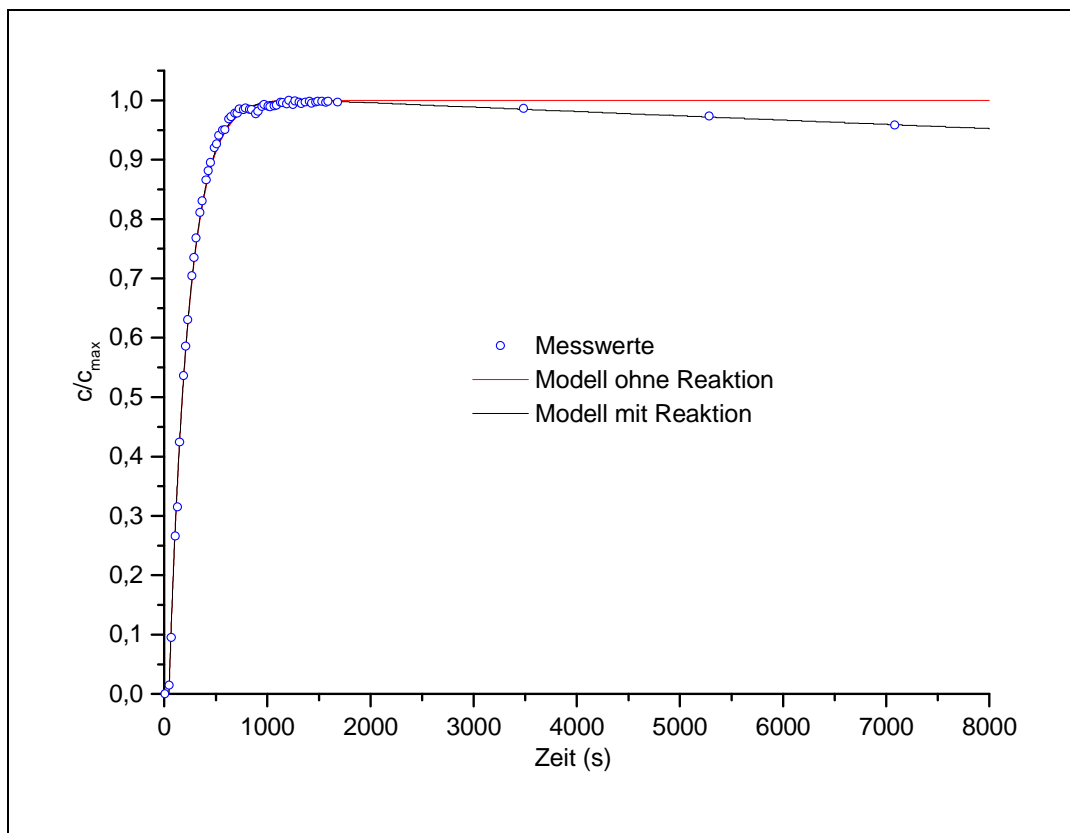


Abbildung 3-6: Vergleich des theoretischen und gemessenen Konzentrationsverlaufs des Tracers im Testreaktor bei einem Gesamtarbeitsvolumen von 6000 mL und einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 mL/s. Basierend auf den Intensitätswerten der Wellenlängenkombination $\lambda_{\text{ex}450/\text{em}510}$.

Die Abnahme der Riboflavinkonzentration kann durch das bestehende Modell nicht erklärt werden. Unter der Annahme, dass das als Tracer eingesetzte Riboflavin einem Zerfallsprozess erster Ordnung unterliegt, wurde das Modell um einen Reaktionsterm erweitert.

$$\frac{dc_c(t)}{dt} = \frac{c_Q(t) - c_c(t)}{\tau_c} - kc_c(t) \quad (0.7)$$

$$\frac{dc_Q(t)}{dt} = \frac{c_c(t) - c_Q(t)}{\tau_Q} - kc_Q(t) \quad (0.8)$$

k ist die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion. Daraus folgend errechnet sich der Konzentrationsverlauf im Testreaktor nach Gleichung 5.7.

$$c_Q = \frac{c_0 \tau_c \left(e^{-k(t-t_z)} - e^{-\frac{(\tau_c + \tau_Q + k\tau_c\tau_Q)(t-t_z)}{\tau_c\tau_Q}} \right)}{\tau_c + \tau_Q} \quad (0.9)$$

Das Modell wurde wiederum durch Variation der Konstanten c_0 , t_z und k an die Messwerte angepasst. Wie in Abbildung 3-6 zu sehen ist, wird der Verlauf der Riboflavinkonzentration nun auch bei langen Laufzeiten korrekt wiedergegeben. Eine Gegenüberstellung der aus den Messwerten berechneten und der modellbasierenden Gleichgewichtskonzentrationen in Tabelle 3-3 ergab zudem eine sehr gute Übereinstimmung. Die Geschwindigkeitskonstante des Riboflavinzerfalls wurde auf $7,45 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

Tabelle 3-3: Vergleich der erwarteten und modellbasierenden Gleichgewichtskonzentration mit und ohne Reaktionsterm im Reaktorsystem bei einem Gesamtarbeitsvolumen von 6 L.

Gesamtarbeitsvolumen	Aus Messwerten berechnete Gleichgewichtskonzentration	modellbasierende Gleichgewichtskonzentration ohne Reaktionsterm	modellbasierende Gleichgewichtskonzentration mit Reaktionsterm
6 L	$0,939 \cdot c_0$	$0,949 \cdot c_0$	$0,939 \cdot c_0$

3.3. Batch-Kultivierungen im 2-Reaktorsystem

Es wurden in der Reaktorkombination Hefekultivierungen durchgeführt. Der 20-L-Kultivierungsreaktor der Biostat C Anlage wurde mit 5 L Schatzmann-Medium befüllt. Im Anschluss an die Kalibration der pH-Elektrode erfolgte die automatisierte Dampfsterilisation (30 min bei 121 °C) des Mediums und der Auslasshähne. Über eine Anstechgarnitur wurde der Reaktor mit dem autoklavierten Feed-Gefäß und den pH-Korrekturflüssigkeitsflaschen verbunden. Der Behälter mit der Glukoselösung wurde separat durch eine eigene Anstechgarnitur angeschlossen. Der 300-mL-Reaktor der Biostat Q Anlage wurde 30 min bei einer Temperatur von 121 °C autoklaviert. Der Zusammenschluss der Kessel erfolgte ebenfalls über Anstechgarnituren. Die Begasung und das Thermostat der beiden Reaktoren sowie die Pumpen für den Kreislauf wurden eingeschaltet. Nach einer Polarisationszeit von mindestens 12 h wurden nach Zugabe der Glukoselösung die pO₂-Elektroden kalibriert. Nach Zugabe der sterilfiltrierten, 1:3-verdünnten Vitamin- und Antibiotikalösungen wurde der 20-L-Reaktor mit der Vorkultur beimpft und die Datenaufzeichnung gestartet. In jedem Reaktor konnten die respiratorischen Parameter und die Kulturfluoreszenz gesondert gemessen werden. Während die Reaktoren verbunden waren erfolgte die pH-Korrektur durch den Biostat C. Erst nach der Trennung der Kessel wurde jedes System durch die eigene Steuereinheit geregelt. Tabelle 3-4 beinhaltet die Prozessparameter der Kultivierung.

Tabelle 3-4: Prozessparameter der Hefe-Kultur in der Reaktorkombination.

Reaktor	Kultivierungsreaktor Biostat C	Testreaktor Biostat Q
pH-Wert	5	
Rührerdrehzahl	1000 min ⁻¹	750 min ⁻¹
Arbeitsvolumen	6,3 L	300 mL
Temperatur	30 °C	
Begasungsrate	9 L/min	1 L/min
Glukose	18 g/L	
Pumpgeschwindigkeit	2,2 mL/s	

Während der Batch-Phase erfolgte der Betrieb der Anlage als ein gekoppeltes System. Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde in beiden Reaktoren beobachtet und miteinander

verglichen. Abbildung 3-7 zeigt die Gegenüberstellung des CO₂-Anteils im Abgas und des Gelöstsauerstoffs der Reaktoren.

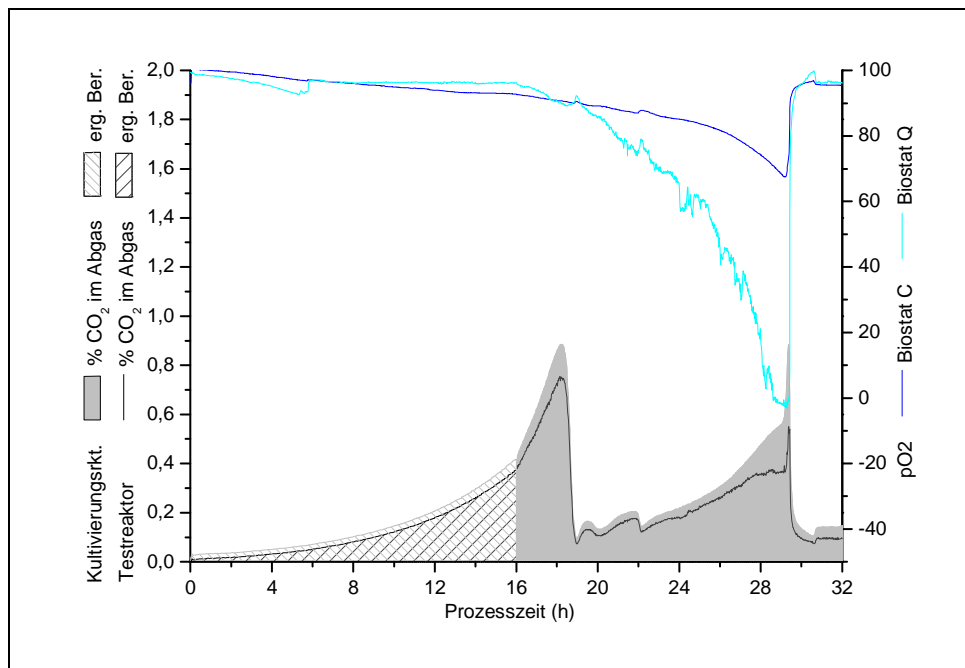


Abbildung 3-7: Vergleich der CO₂-Verläufe und des Gelöstsauerstoffs der Hefe-Batch-Kultur im Test- und Kultivierungsreaktor der Reaktorkombination.

Alle Prozessgrößen zeigen den für eine Hefe-Batch-Kultur typischen Verlauf. Die Gesamtdauer der Kultivierung betrug ca. 32 Stunden. Die erste Wachstumsphase war nach 18 Stunden abgeschlossen. Die zweite Wachstumsphase hatte eine Länge von 13 Stunden. Die geringe konstante Differenz der CO₂-Kurven von 0,04 % bis zur 28. Kultivierungsstunde ist auf systematische Abweichungen der Abgasanalytiken zurückzuführen. Die Sauerstoffsättigung im Biostat-Q-Reaktor sank ab der 28. Kultivierungsstunde auf 0 %. Zeitgleich stieg der Unterschied der CO₂-Kurven innerhalb kurzer Zeit auf bis zu 0,2 %. Das Zurückbleiben des CO₂-Ausstoßes im Biostat-Q-Reaktor ist demnach bedingt durch eine Sauerstofflimitierung der Kultur. Nachdem sämtliche verstoffwechselbare Kohlenstoffquellen verbraucht waren, stellte sich die konstante Differenz von 0,04 % wieder ein. Der Gelöstsauerstoffgehalt im Biostat-C-Reaktor erreichte seinen Tiefpunkt von 65 % in der 29. Kultivierungsstunde. Die vollständige Sauerstoffversorgung der Kultur im Biostat C ist zu jeder Zeit gewährleistet.

Die Zellen zeigten in beiden Reaktoren das für Hefen typische diauxische Wachstumsverhalten. Abbildung 3-8 zeigt den Verlauf der Flavinfluoreszenz in beiden Reaktoren. Nach

STÄRK (2002) besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellmassenkonzentration und der Kulturfluoreszenz im Flavinbereich (ex410/em490 nm).

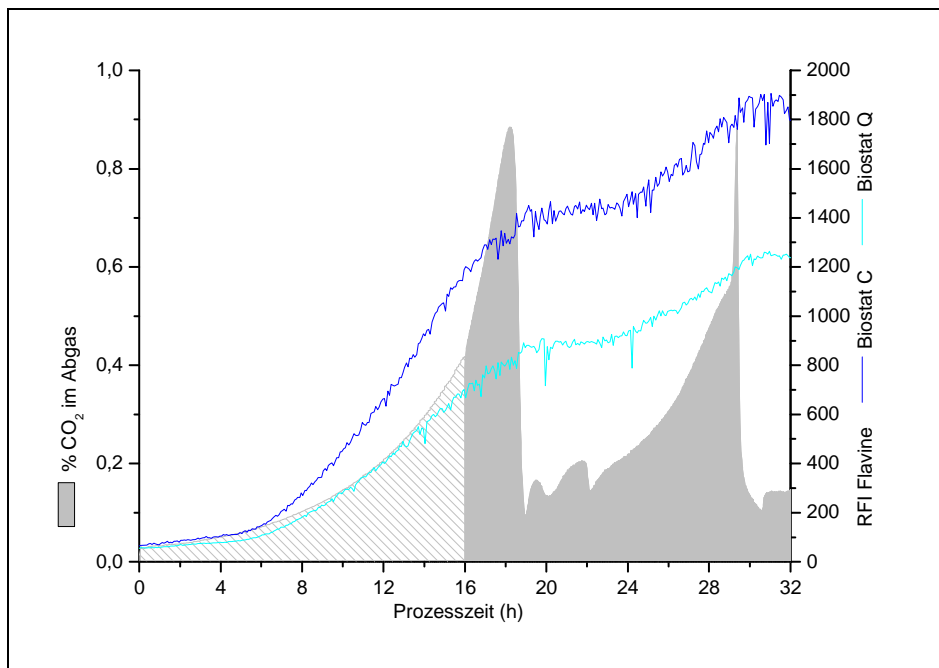


Abbildung 3-8: Vergleich der Flavinfluoreszenzen der Hefe-Batch-Kultur in den Reaktoren Biostat C und Biostat Q der Reaktorkombination. Zur Orientierung dient der CO₂-Verlauf im Abgas des Biostat-C-Reaktors.

Als weiteres Vergleichskriterium sollen die Wachstumskonstanten herangezogen werden. Aufgrund des oben erwähnten Zusammenhangs werden für die Bestimmung der Wachstumskonstanten die Messdaten des BioView-Sensors verwendet. Aus dem Geschwindigkeitsgesetz des Zellwachstums ergibt sich nach Integration die Wachstumsgleichung.

$$\ln(x) = \mu_{\max} t + \ln(x_0) \quad (5.8)$$

Nach der logarithmischen Auftragung der Flavinfluoreszenz gegen die Zeit in Abbildung 3-9 lassen sich die Wachstumskonstanten aus der Steigung bestimmen. Das exponentielle Wachstum beginnt nach der Adaption der Zellen an die neue Umgebung erst nach Abschluss einer linearen Anlaufphase. Die Ermittlung der Steigung der Wachstumsabschnitte erfolgt mittels linearer Regression. Die berechneten Werte sind in Tabelle 5.5 aufgeführt.

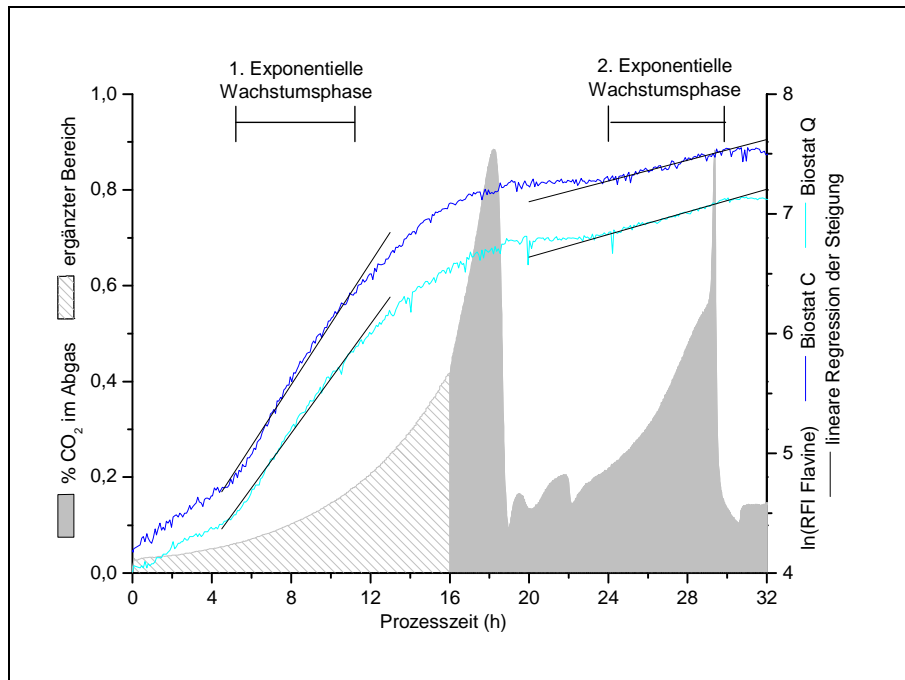


Abbildung 3-9: Logarithmische Auftragung der Flavinfluoreszenzen der Hefe-Batch-Kultur in den Reaktoren Biostat C und Biostat Q der Reaktorkombination. Zur Orientierung dient der CO₂-Verlauf im Abgas des Biostat-C-Reaktors. Tabelle 3.5 stellt die Ergebnisse einander gegenüber.

Tabelle 3-5: Wachstumsraten der zwei Wachstumsphasen in den Reaktoren Biostat C und Biostat Q der Reaktorkombination.

Reaktor	Biostat C	Biostat Q
1. Wachstumsphase	0,255 h ⁻¹	0,227 h ⁻¹
2. Wachstumsphase	0,043 h ⁻¹	0,047 h ⁻¹

Die Wachstumskonstanten der einzelnen Wachstumsphasen stimmten in beiden Reaktoren gut überein. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass während einer Batch-Kultivierung die Zellen in beiden Reaktoren das gleiche Wachstumsverhalten aufweisen. Ein Problem stellte die Sauerstoffversorgung im Biostat-Q-Reaktor dar. Der Sauerstoffeintrag hängt in erster Linie von der Rührerdrehzahl ab. Untersuchungen zeigten, dass diese bei der Magnetrührtechnik im Biostat Q nicht beliebig weit erhöht werden kann. Tatsächlich ist bei Verwendung eines prismenförmigen Magnetrührstäbchens mit 750 min⁻¹ bereits die maximale Rührerdrehzahl erreicht. Die Installation eines Kapillarrührers könnte sich aus Platzmangel in dem kleinen 300-mL-Reaktor als schwierig erweisen. Denkbar wäre der Einsatz von sternförmigen Magnetrührstäbchen, die durch zusätzliche Schikanen für eine bessere Umwälzung des Mediums sorgen könnten.

4. Kontinuierliche Hefe-Kultivierungen

In kontinuierlichen Kultivierungen können Hefezellen unter bestimmten Bedingungen ihren Zellzyklus synchronisieren. Während der Fermentation wechseln sich Phasen verschiedenen Stoffwechselverhaltens ab und führen zu einer Oszillation von Prozessgrößen. Die Interpretation der Messdaten liefert viele wichtige Erkenntnisse über das Wachstums- und Stoffwechselverhalten der Zellen.

Die kontinuierlichen Kultivierungen wurden in dem Biostat B System durchgeführt. Der Aufbau der Versuchsanlage kann der Abbildung 4-1 entnommen werden. Die Vorbereitungen der Experimente sowie der Betrieb der Anlage erfolgten analog dem Abschnitt 1.3. Das synchrone Wachstum wurde nach einem Batch-Betrieb und einer darauf folgenden, mindestens dreistündigen Hungerphase durch einen zweistufigen Substratshift initiiert. Die synchron wachsenden Hefen wurden dann kontinuierlich kultiviert.

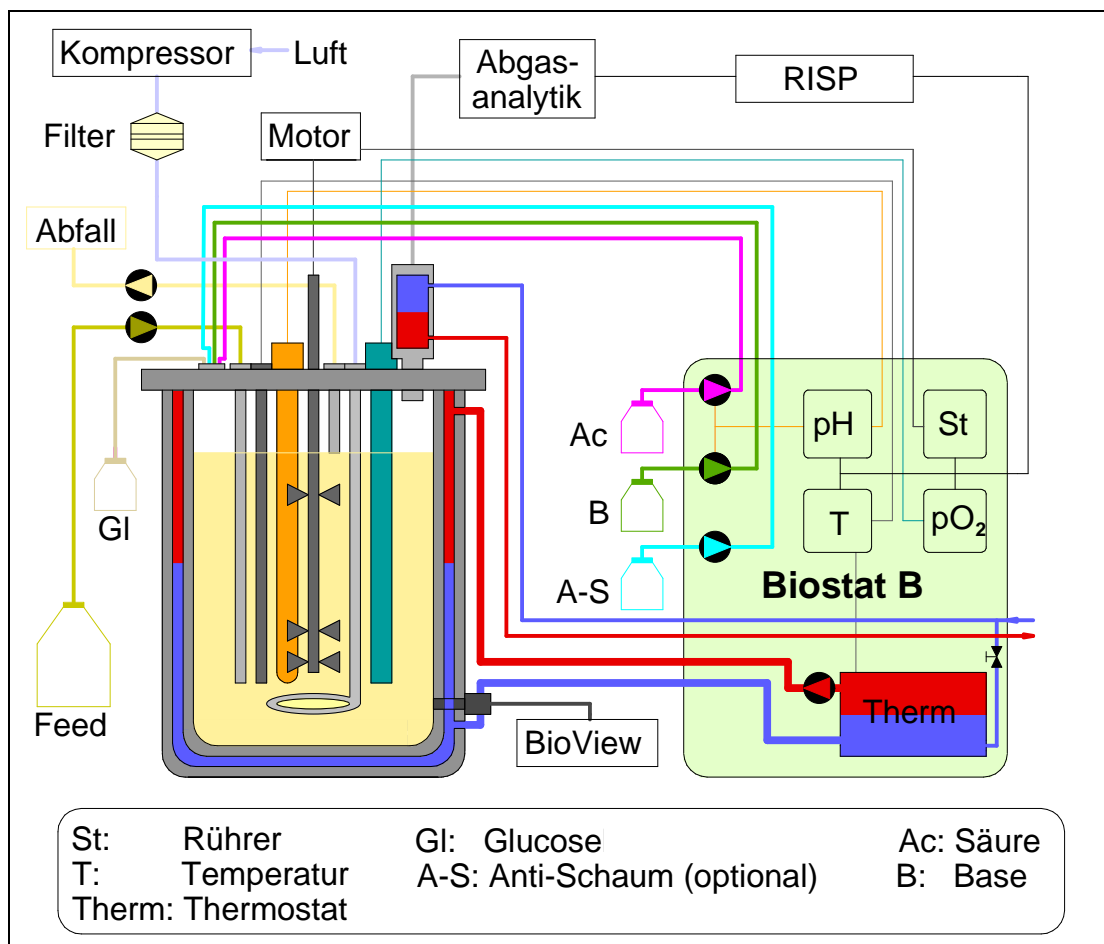


Abbildung 4-1: Schematischer Aufbau der Biostat-B-Anlage.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kontinuierliche Kultivierungen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Tabelle 4-1 zeigt eine Übersicht der Fermentationsparameter der einzelnen Kultivierungen.

Tabelle 4-1: Fermentationsparameter der durchgeführten kontinuierlichen Kultivierungen.

Verdünnungsrate	0,14 h ⁻¹	0,17 h ⁻¹	0,15 h ⁻¹
pH-Wert	5,5	5	5
Rührerdrehzahl	1200 min ⁻¹	800-1200 min ⁻¹	1200 min ⁻¹
Arbeitsvolumen	1,8 L	1,5 L	1,8 L
Temperatur	30 °C		
Begasungsrate	2,85 L/min		

Die Aufzeichnungen der Kulturfluoreszenz lassen ebenfalls Rückschlüsse auf das Stoffwechselverhalten der Hefezellen zu. Die Proteinfluoreszenz in Abbildung 4-2 kann als ein Indikator für die durchschnittliche Zellmasse angesehen werden [PORRO et al., 2003] und steigt im Einklang mit der Biotrockenmasse während der Wachstumsphase an. Die Abnahme der Zellmasse und -größe in der S-Phase ist zum einen auf die Verstoffwechslung der Speicherstoffe und zum anderen auf das steigende Verhältnis von Zellaustrag zu Zellwachstum zurückzuführen. Nur schwach zu erkennen ist in Abbildung 4-2 die Oszillation in der Flavinfluoreszenz. Die Kurve steigt während der Wachstumsphase kaum merklich an und zeigt zum Zeitpunkt des Eintritts in die Synthesephase einen leichten Einbruch.

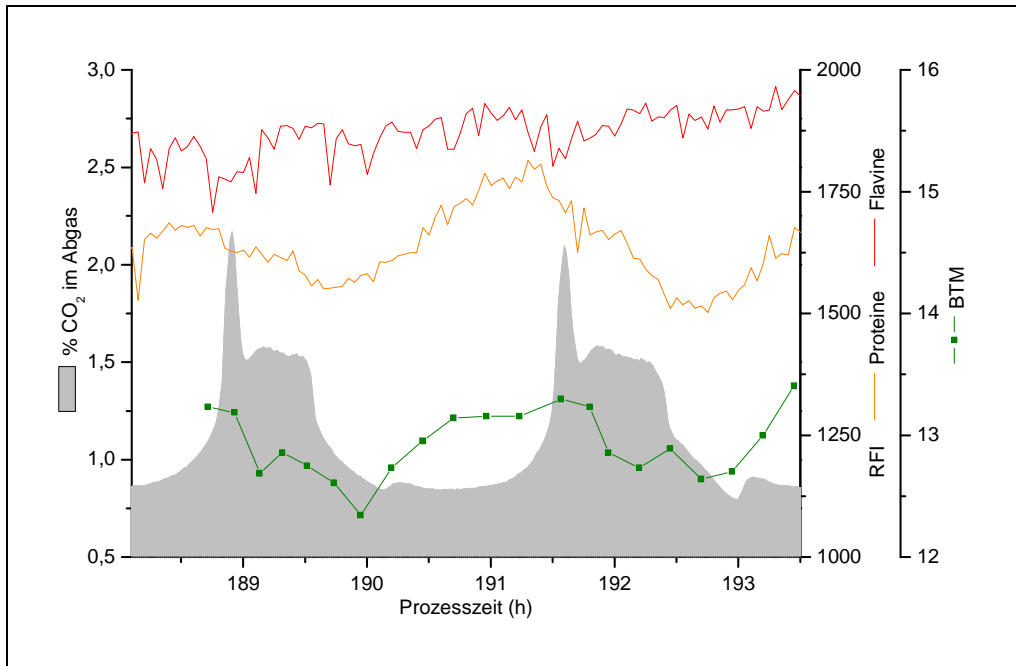


Abbildung 4-2: Oszillation des CO_2 -Gehalts im Abgas, der Biotrockenmasse und der Fluoreszenzintensitäten im Protein- und Flavinebereich einer synchronen Hefekultur bei einer Verdünnungsrate von $0,14 \text{ h}^{-1}$.

Die deutlichsten Schwankungen in der Fluoreszenzintensität zeigt die Konzentration des Elektronentransportmoleküls NADH in Abbildung 4-3. Die oxidierte Form NAD^+ besitzt keine Fluoreszenzeigenschaften in den Bereichen der Anregungswellenlängen. Während der Wachstumsphase ist zunächst eine langsame kontinuierliche Erhöhung zu erkennen, die nur abhängig vom allgemeinen Zellwachstum ist. Der sprunghafte, zeitgleiche Anstieg mit dem respiratorischen Quotienten zeigt hingegen die Umstellung des oxidativen auf den oxidoreduktiven Stoffwechsel an. Bei den Flavinen FMN und FAD handelt es sich ebenfalls um Elektronencarrier (reduzierte Formen: FMNH_2 und FADH_2). Da bei diesen Verbindungen im Gegensatz zum NADH nur die oxidierten Formen fluoreszenzfähig sind, ist hierdurch der Rückgang der Fluoreszenz zu erklären. Durch Division der NADH- durch die Proteinfluoreszenz lässt sich der wachstumsbedingte Teil der Fluoreszenz eliminieren. An der resultierenden Kurve in Abbildung 4-3 lässt sich die Stoffwechselumstellung noch deutlicher erkennen.

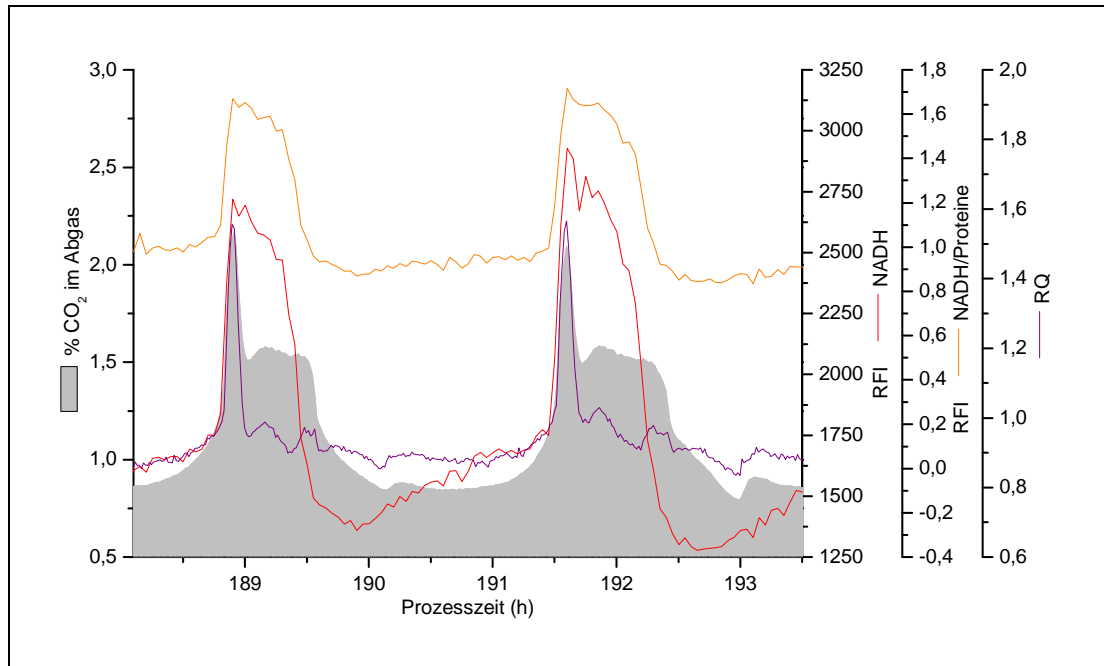


Abbildung 4-3: Oszillation des CO₂-Gehalts im Abgas, des respiratorischen Quotienten und der Fluoreszenzintensitäten von NADH bzw. dem Quotienten NADH/Proteine einer synchronen Hefekultur bei einer Verdünnungsrate von 0,14 h⁻¹.

Die durchflusszytometrischen DNA-Untersuchungen der Kultur unterstützen die aufgestellten Schlussfolgerungen. Abbildung 4-4 gibt die Zusammensetzung der Gesamtpopulation aus den Zellen in den jeweiligen Stadien der Teilung an. Es ist zu erkennen, dass stets ein Mindestanteil von 25 % der Zellen in der G₁-Phase vorliegt. Dieser Zustand kann mit der zytometrischen DNA-Quantifizierung nicht von der G₀-Phase unterschieden werden. Unter der Annahme, dass es sich bei diesen 25 % um Zellen außerhalb des Teilungszyklus handelt, wird dieser Anteil konsequent von den Messwerten der G₁-Phase abgezogen. Es ergibt sich somit ein Maximalanteil von ca. 60 % G₁-Zellen. Verglichen mit den Maximalwerten für die S- und G₂/M-Phasen, die bei 55 bzw. 45 % liegen, kann geschlussfolgert werden, dass die Polarisation der Kultur im Bereich zwischen 45 bis 60 % liegt.

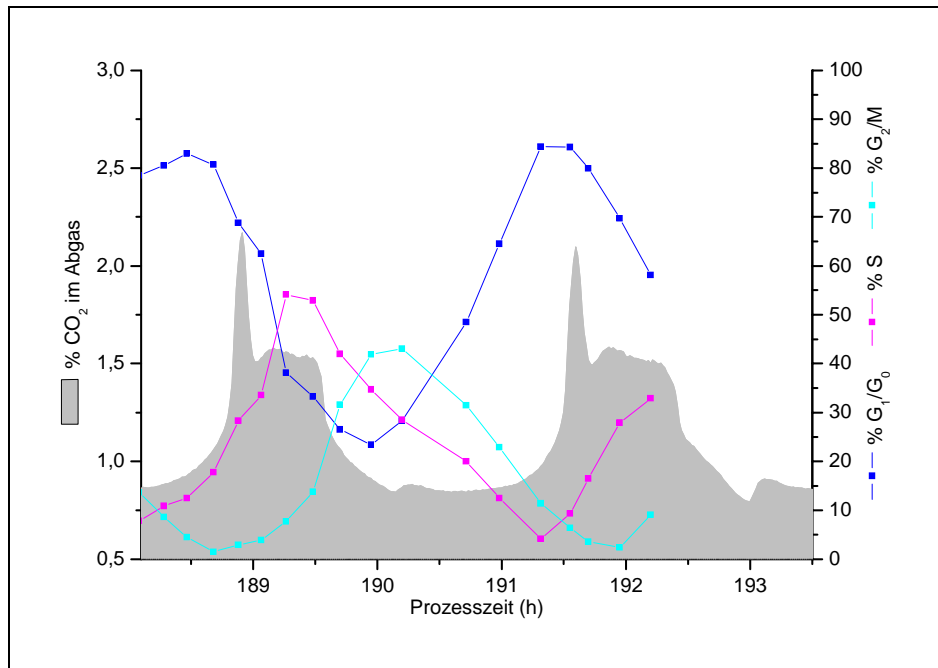


Abbildung 4-4: Oszillation des CO_2 -Gehalts im Abgas und der Zusammensetzung der Zellpopulation (Zellen wurden angefärbt mit SYTOX[®] Green) einer synchronen Hefekultur bei einer Verdünnungsrate von $0,14 \text{ h}^{-1}$.

Trotz der Verwendung eines etablierten Protokolls konnte das synchrone Wachstum der Zellen nicht über den erwarteten Zeitraum von mehreren Tagen aufrechterhalten werden. Auch nach mehrmaliger Initiation betrug die maximale Oszillationsdauer der Kultur maximal zehn Stunden. Nach der Initiierung wurden zunächst zwei scheinbar stabile Zyklen durchlaufen. Innerhalb von zwei schwach ausgeprägten Zyklen brach die Oszillation dann erneut zusammen. Dieses Problem wurde auch schon von [HANTELMANN 2004] beobachtet. Der CO_2 -Gehalt im Abgas, der Gelöstsauerstoff und der respiratorische Quotient (Abbildung 4-5) pendeln sich auf einen Durchschnittswert ein. Die Kulturfluoreszenz zeigt im Protein- und NADH-Bereich ebenfalls ein unabhängiges Teilungsverhalten der Zellen an.

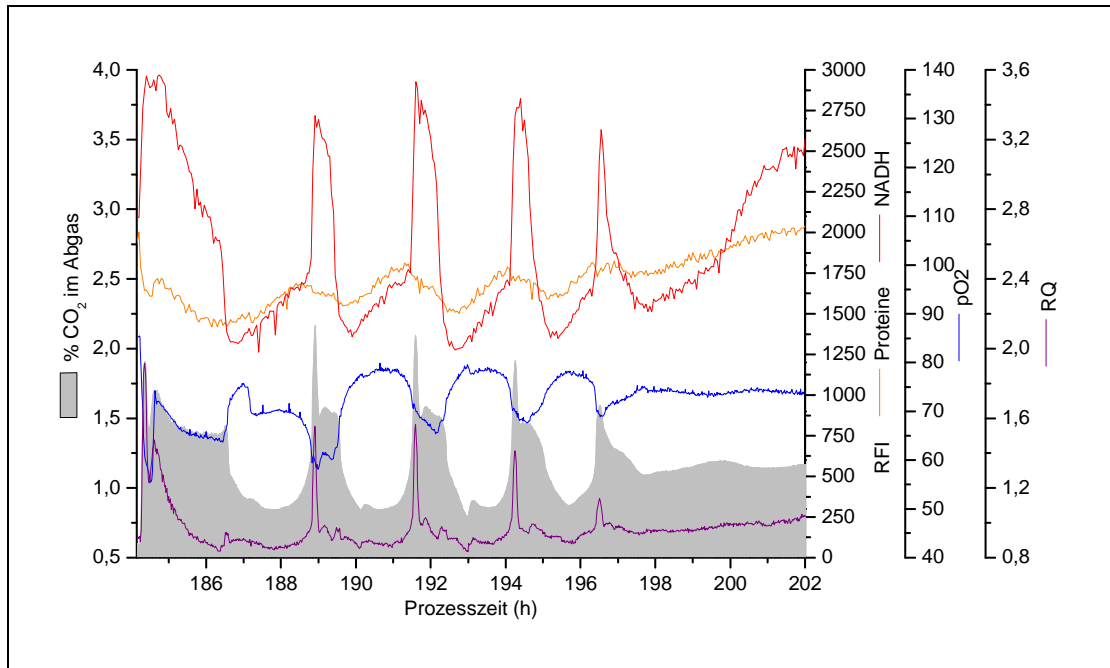


Abbildung 4-5: Ausklingende Oszillation einer Hefekultur mit $D=0,14 \text{ h}^{-1}$. Dargestellt ist der Verlauf des CO_2 -Gehalts im Abgas, der Protein- und NADH-Fluoreszenz, des Gelöstsauerstoffs und des respiratorischen Quotienten.

In der Literatur werden über mehrere Tage stabil oszillierende Kulturen beschrieben [MÜNCH et al., 1992] [MAROSE, 1999] [HANTELMANN, 2005]. Durch Optimierung der Kultivierungsparameter und des Versuchsprotokolls für das verwendete System wurde die Ursache dieses Phänomens ergründet und eine Reproduktion der Literaturergebnisse angestrebt.

Zur Gewährleistung der Sterilität wurde das Schatzmann-Feed-Medium durch zwei Filterkapseln mit einer Porengröße von 1,2 bzw. 0,2 μm in den Vorratsbehälter gepumpt. Es wurde überprüft, ob bei diesem Verfahren neben unerwünschten Mikroorganismen noch weitere wichtige Bestandteile des Mediums aus der Lösung gefiltert wurden. Eine optische Betrachtung ergab bereits nach dem einmaligen Gebrauch eine leichte Rotfärbung der vorher farblosen Filter, die sich nach weiterem Benutzen noch verstärkte. Für eine eindeutigere Aussage wurde eine quantitative Analyse des Mediums durchgeführt. Untersucht wurde der Gehalt an Eisen, Zink, Mangan und Kupfer, da diese Ionen dem Medium lediglich in Spuren hinzugegeben wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 zusammengestellt.

Tabelle 4-2: Mineralgehalt des Schatzmann-Mediums vor und nach der Filtration.

Ion	Fe ³⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺
Soll-Wert (mg/L)	3,1	2,0	3,1	0,6
Analyse vor der Filtration (mg/L)	2,1	1,6	2,3	0,4
Analyse nach der Filtration (mg/L)	0,02	1,4	2,3	0,3

Die Konzentrationen aller Ionen betrug vor der Filtration ca. 2/3 vom Sollwert. Diese Abweichung konnte auf Fehler bei der Präparation des Mediums und bei der Messung zurückgeführt werden. Bis auf kleine Schwankungen blieben die Konzentrationen der Ionen Zn²⁺, Mn²⁺ und Cu²⁺ durch die Filtration unbeeinflusst. Die Konzentration der Fe³⁺-Ionen hingegen nahm stark ab. Vermutlich war bei der Präparation des Feed-Mediums durch die Wechselwirkung der gelösten Komponenten trotz des niedrigen pH-Werts das Eisen als schwerlösliches Eisenhydroxid ausgefallen.

Die Eisenkonzentration könnte als limitierender Faktor einen starken negativen Einfluss auf die Autoregulierung des synchronen Zellwachstums haben. Zur Verifizierung der Annahme wurde eine neue Kultivierung bei pH 5 und einer Verdünnungsrate von 0,15 h⁻¹ durchgeführt. Um das geschilderte Problem zu umgehen, wurde das Schatzmann-Feed-Medium ohne die Mineralsalzlösung angesetzt und durch die Filterkapseln in den Vorratsbehälter gepumpt. Die klare, unverdünnte Mineralsalzstammlösung wurde anschließend extra durch ein Septum sterilfiltriert in das Vorratsgefäß injiziert.

Abbildung 4-6 zeigt die Ergebnisse der Kultivierung. Die Oszillationen konnten über einem Zeitraum von mindestens 80 Stunden aufrecht erhalten werden. Nach einer Einschwingzeit von ca. 40 Stunden wird eine stabile Zyklusdauer von 3 Stunden erreicht. Alle Parameter weisen konstante periodische Schwankungen auf. Die Kurven sind klar und deutlich ausgeprägt.

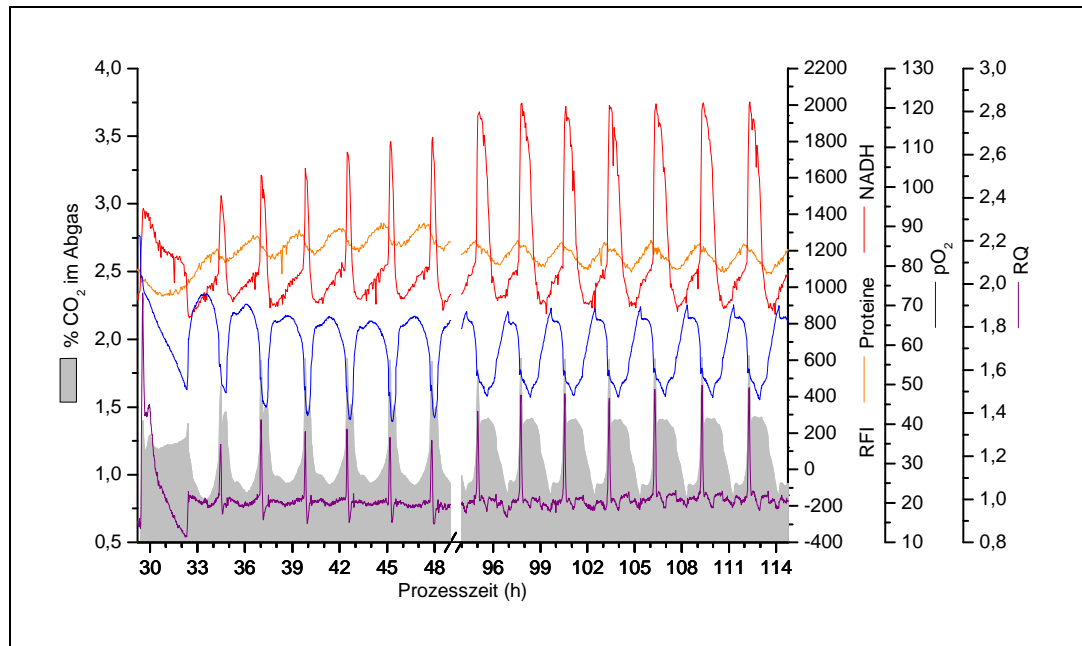


Abbildung 4-6: Stabile Oszillation einer Hefekultur mit einer Verdünnungsrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$. Dargestellt ist der Verlauf des CO_2 -Gehalts im Abgas, der Protein- und NADH-Fluoreszenz, des gelösten Sauerstoffs und des respiratorischen Quotienten.

Das Experiment zeigt, dass die Eisenlimitierung mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache für den Zusammenbruch der Oszillationen darstellt. Die genaue Wirkungsweise des Eisenmangels und der Zusammenhang mit den Regulationsprozessen des synchronen Wachstums konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig.

5. Vergleich der Fluoreszenzdaten mit anderen Analysemethoden

5.1. Durchflußzytometrie

Bei diesen Versuchen wurde das Cytometer „Epics XL“ (Fa. Beckman Coulter, USA,) verwendet. Als Lichtquelle dient ein Argonionenlaser (488nm, 15mW). Das Vorwärtsstreulicht wird direkt in Einstrahlrichtung hinter der Durchflusszelle detektiert. Im rechten Winkel dazu befinden sich Detektoren für Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzlicht. Die Auskopplung der detektierten Strahlung erfolgt über dichroitische Langpassfilter. Für die Fluoreszenzmessung stehen drei verschiedene Sensoren mit austauschbaren vorgeschalteten Bandfiltern zur Verfügung. Die DNA der Zellen wurden mit Sytox Green gefärbt und im Durchflußzytometer vermessen. Bei den Kultivierungen konnte ein Zusammenhang zwischen den gewonnenen Fluoreszenzdaten und den Zellzyklusphasen gezeigt werden, wie in Abbildung 5-1 dargestellt. Bei steigendem Anteil an Zellen in der G1-Phase kann man ein Ansteigen der Protein- und besonders der NADH-Fluoreszenz beobachten. Bei dem weiteren Verlauf der Kultivierung steigt der Anteil der S-Phase wobei die relative Fluoreszenz abnimmt bis sie wieder leicht steigt wenn die Zellen in die G2/M-Phase übergehen.

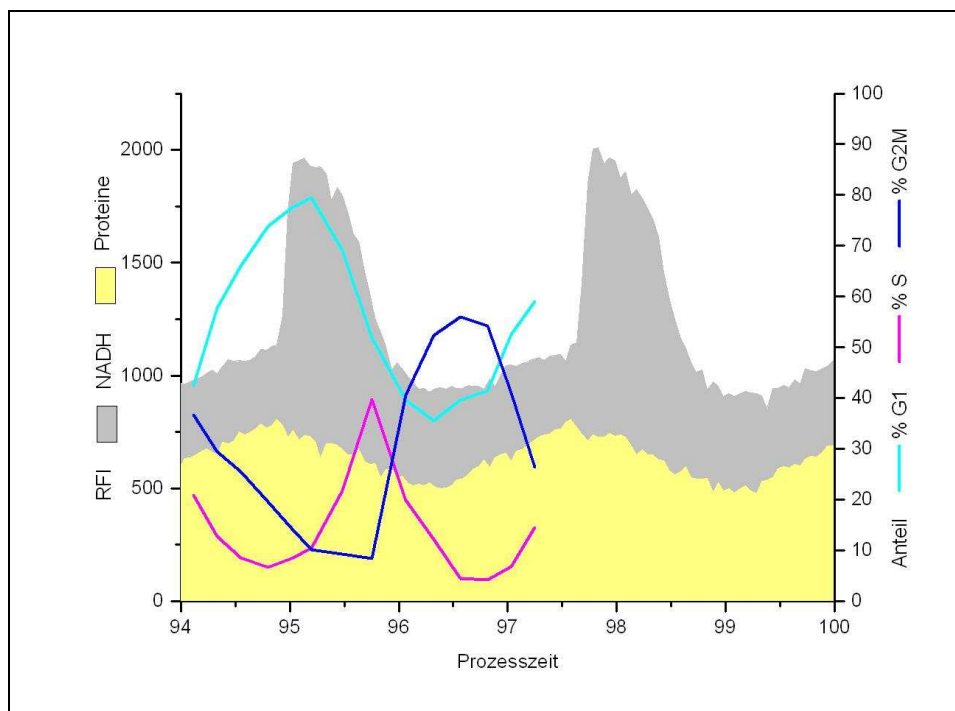


Abbildung 5-1: Vergleich der Zellzyklusphasen mit der Protein- und NADH-Fluoreszenz.

5.2. In-situ-Mikroskopie

Je nach Zellgröße kann das In-situ-Mikroskop mit 4-fach, 10-fach oder 20-fach vergrößernden Objektiven bestückt werden. Im Strahlengang ist eine CCD-Kamera platziert, auf die das reelle Zwischenbild projiziert wird. Das Mikroskop wird über einen seitlichen 25 mm Fermenterport in den Reaktor eingeführt. Die Messzone befindet sich am unteren Ende des Mikroskopkörpers und taucht permanent in das Kultivierungsmedium ein. Während der Kultivierung wurde die Kamera benutzt, um die Zelldichte und die Sterilität der Kultivierung zu beobachten.

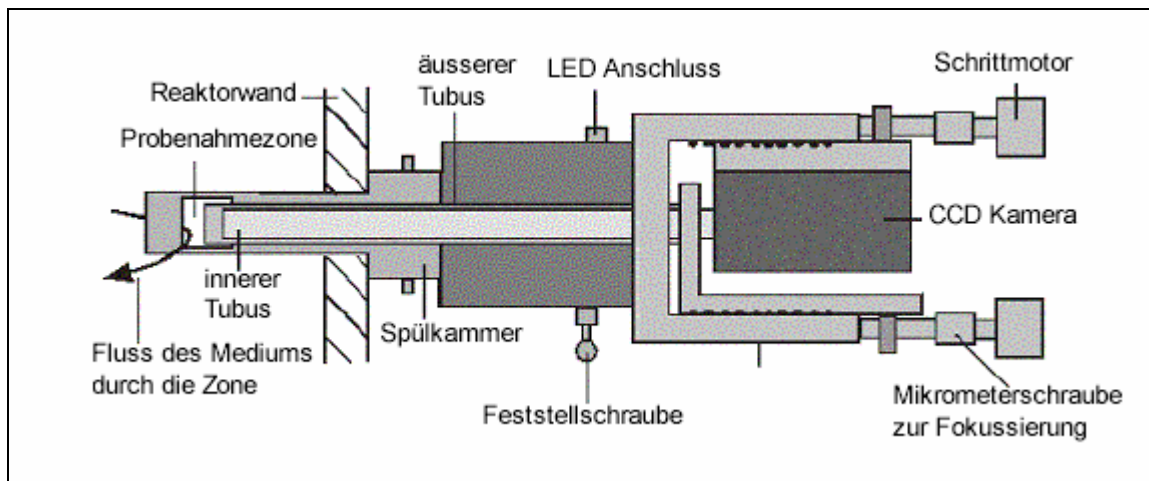


Abbildung 5-2: Schematischer Aufbau des in-situ-Mikroskops.

Die betrachtete Zone beträgt $220 \times 220 \mu\text{m}$ bei einer 20fachen Vergrößerung. Um zufällige Fehler herauszumitteln wurden bei jeder Messung ca. 20 Bilder in Folge aufgenommen. Es wurde die Zellzahldichte bestimmt. Wie erwartet ist die Konzentration der Einzelzellen während der G1-Phase am größten. Der steile Abfall der Einzelzellendichte zu Beginn der Synthesephase indiziert die Sprossung der Hefezellen und spricht ebenfalls für eine hohe Synchronität der Kultur.

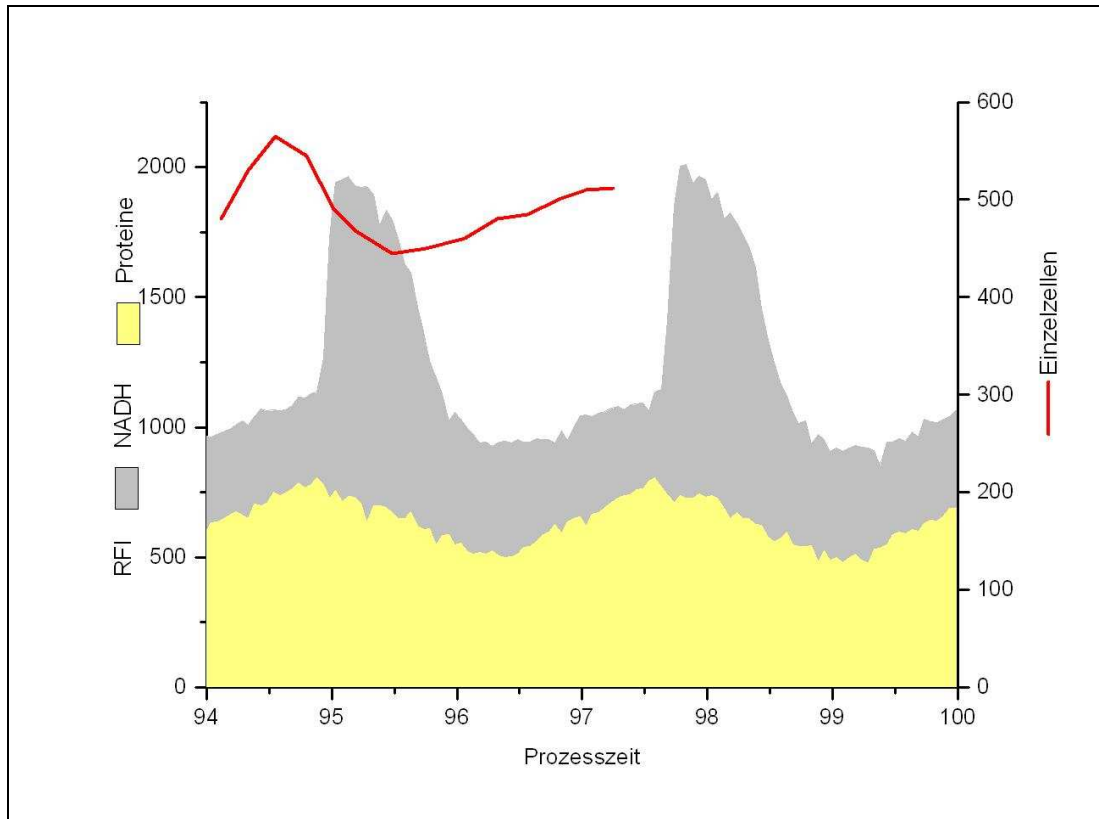


Abbildung 5-3: Vergleich der mit dem In-situ-Mikroskop bestimmte Einzelzellzahl und der Protein- und NADH-Fluoreszenz.

6. DNA-Chip Experimente an synchronen Hefekultivierungen

Die Synchronisation von Hefezellen im Bioreaktor ermöglicht die Präsenz vieler Zellen in der gleichen Phase, die in idealer Weise für Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips benutzt werden können, da ausreichende RNA-Mengen (200 µg pro Chiphybridisierung) isolierbar sind. Die DNA-Chiptechnologie eignet sich besonders für schnelle und effiziente Analysen von biologischen Systemen mit mehreren tausend Genen.

6.1. *Durchführung von FACS zur Vorbereitung für den DNA Chip*

Hefe war der erste Organismus, dessen Genom vollständig entschlüsselt wurde [PÉREZ-ORTÍN et al., 2002]. Mit der Entwicklung von Microarrays zur Genanalyse, sogenannten DNA-Chips, in den späten 90er Jahren wurde ein bedeutsamer Schritt zur Untersuchung der Genexpression getan. Die neuartige Methode etablierte sich binnen kurzer Zeit und wurde zu einem wichtigen Bestandteil in der Medizin und der Biotechnologie. DNA-Chips erlauben die simultane Untersuchung des gesamten Genoms eines Organismus. Die Expression eines Gens äußert sich durch Transkription des zugehörigen Abschnitts der DNA und damit durch Bildung von mRNA (m = messenger). Für die Untersuchung der Genexpression wird die mRNA isoliert, aufgereinigt und mit fluoreszenzmarkierten Nucleotidbasen in cDNA (c = complementary), die wieder den ursprünglichen DNA-Code besitzt, umgeschrieben. Auf den DNA-Chips sind getrennt voneinander in tausenden Spots unverwechselbare Oligo-Nucleotidketten komplementär zur Sequenz jedes Gens immobilisiert. Nach der Hybridisierung der cDNA auf den Spots des Chips wird das Microarray-System auf seine Fluoreszenzeigenschaften hin gescannt. Spots, die einem exprimierten Gen entsprechen, geben ein Signal.

Für eine aussagekräftige Untersuchung ist es von Bedeutung, dass die Zellen des betrachteten Organismus eine einheitliche Aktivität zeigen. Im Falle der Studie der Genexpression während des Teilungszyklus bedeutet dies das Vorhandensein einer möglichst reinen Population an Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus. Selbst synchron wachsende Hefekulturen weisen, wie unter Kapitel 5.1 beschrieben, nur eine Polarisation von etwa 50 bis 60 % auf. Es ist fraglich, ob dieses für eine interpretierbare Analyse ausreichend ist.

Die Durchflusszytometrie ist durch die Option der Zellsortierung ein denkbar ideales Mittel zur Vorbereitung von Proben für die Microarray-Gen-Analyse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine Populationsanalyse durchgeführt, um zu klären nach welchen Kriterien eine Sortierung der Zellen zum Erhalt von möglichst reinen Subpopulationen möglich ist.

Die Analysen für die Vor- und Nachuntersuchungen erfolgten am COULTER EPICS® XL-MCL™. Die Sortierungen der Proben am FACSVantage™ SE wurden nach verschiedenen zytometrischen Charakteristika durchgeführt. Je Durchgang wurden zwei Subpopulationen mit einem Umfang von mindestens 10^6 Zellen aussortiert und einer erneuten zytometrischen DNA-Quantifizierung unterzogen. Die Ergebnisse wurden zur Bewertung der Trennmethode miteinander verglichen.

Trennkriterium DNA-Gehalt

Zellzyklusanalysen von Hefekulturen sind in der Literatur gut dokumentiert [ALBERGHINA et al., 1991] [HUTTER, 1993] [CARLSON et al., 1997]. Die Ergebnisse resultieren bei quantitativer Färbung aus einem direkten proportionalen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und DNA-Gehalt. Abbildung 6-1 zeigt ein Histogramm des DNA-Gehalts einer Zellpopulation bestehend aus 33 % G₁-, 53 % S-, und 14 % G₂/M-Phase.

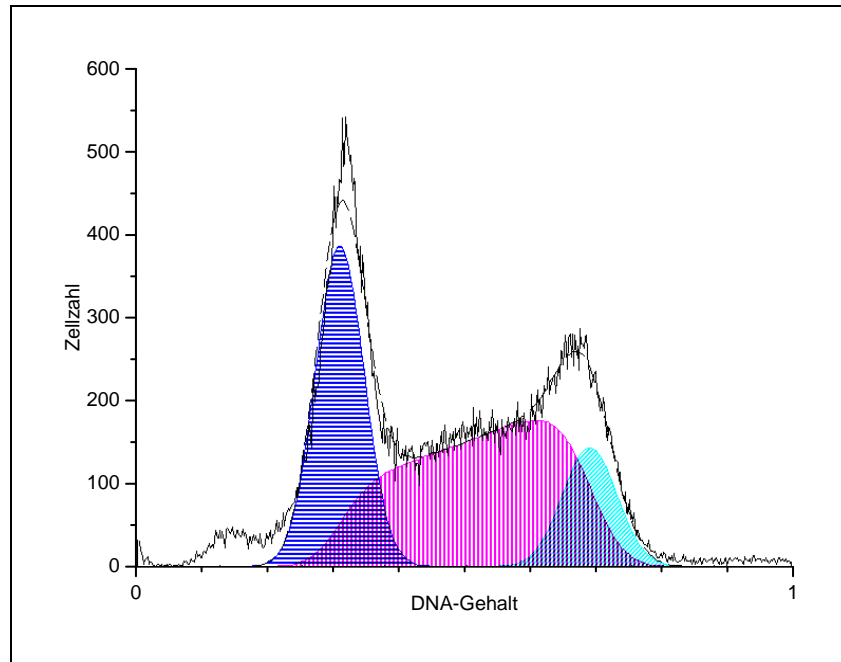


Abbildung 6-1: Mit dem COULTER EPICS® XL-MCL™ aufgenommenes Histogramm des DNA-Gehalts (Farbstoff SYTOX® Green). Das Ergebnis der Auswertung mit dem Programm WinCycle zeigt eine Zusammensetzung aus 33 % G₁-Phase (dunkelblau), 53 % S-Phase (pink) und 14 % G₂/M-Phase (hellblau).

Hefezellen des Stamms *Saccharomyces cerevisiae* besitzen bei optimalen Kultivierungsbedingungen in der G₁-Phase einen diploiden Chromosomensatz (bezeichnet mit 2N). Nach Abschluss der DNA-Replikation liegt kurz vor der Teilung ein tetraploider Chromosomensatz (4N) in der G₂- und der M-Phase vor. Messtechnisch besteht zwischen diesen beiden Stadien mit tetraploiden Chromosomensatz kein Unterschied. Zellen der S-Phase liegen in ihrem DNA-Gehalt zwischen diesen beiden Werten und erzeugen deswegen ein kontinuierliches Signal. Gründe für die Signalverbreiterung der G₁- und G₂/M-Peaks sind statistische Abweichungen bei der Färbung und Messung sowie die Überlappung mit der S-Phase. Bei unzureichenden Kultivierungsbedingungen sind die Zellen in der Lage nach dem Durchlaufen einer Reifeteilung (Meiose) haploide (1N) Sporen zu bilden. Ein statistisch geringer Anteil dieser Zellen ist auch in Abbildung 6-1 zu erkennen. Durch Vereinigung zweier Sporen (Konjugation) kann wieder eine vollständige diploide Zelle entstehen.

Die Sortierung nach DNA-Gehalt ist die naheliegendste Methode zur Trennung der Zellzyklus-Subpopulationen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass für die Anfertigung der DNA-Chips die Erhaltung der RNA eine absolute Notwendigkeit ist. Die Verwendung von nucleinsäurebindenden Farbstoffen bei der Zellsortierung ist schwierig, da zytometrische Untersuchungen des DNA-Gehalts in den meisten Fällen eine Verdauung der RNA voraussetzen. Ohne diese Vorbehandlung würde die ebenfalls fluoreszenzmarkierte RNA das Ergebnis verfälschen. Einige spezielle Farbstoffe gehen aufgrund ihrer Struktur und Chemie

unterschiedlich starke Bindungen mit verschiedenen Basen oder Basenpaaren ein. Durch sie kann eine gezieltere Färbung erreicht werden. Die Farbstoffe Hoechst 33342 und Hoechst 33258 besitzen eine selektive Affinität zu Adenin/Thymin-Gruppen in Polynucleinsäuren, die in der RNA nicht vorkommen. Für die geplanten Sortierungen am FACSVantageTM SE sollten sie deshalb besonders geeignet sein. Mit ihrem Absorptionsmaximum von ca. 350 nm liegen sie außerhalb des Anregungsbereichs des COULTER EPICS[®] XL-MCLTM. Für die Voruntersuchungen wurde deshalb der Farbstoff SYTOX[®] Green verwendet.

Das für Säugerzellen optimierte Färbeprotokoll in Kapitel 10 im Anhang wurde für die Färbung der Hefezellen übernommen. Keine der behandelten Proben zeigte, weder mit Hoechst 33342 noch mit Hoechst 33258, eine detektierbare Fluoreszenzaktivität. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 12 Stunden führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Bei einer Erhöhung der Farbstoffkonzentration um den Faktor 10 erfolgte eine starke Verklumpung der Zellen in der Probe. Im Cell Sorter zeigte sich zwar ein deutliches aber völlig unspezifisches Fluoreszenzsignal, eine Sortierung war damit nicht möglich.

Trennkriterium Größe und Morphologie

Eine weitere veränderliche und durchflusszytometrisch messbare Eigenschaft ist die Zellgröße und -morphologie. Im Zusammenhang mit diesen Parametern steht in der Durchflusszytometrie das Vorwärts- bzw. das Seitwärtsstreulicht. Ein Vorteil dieser Sortierungsmethode ist, dass keine Vorbehandlung der Probe mit Farbstoff notwendig wäre und somit das Risiko eines eventuellen RNA-Verlusts durch Nebenreaktionen während der Farbstoff-Inkubation minimiert wird.

Hefezellen vollziehen eine unsymmetrische Zellteilung. Die Trennung erfolgt in unterscheidbare große Mutter- und kleine Tochterzellen [BEUSE, 1997]. Die Zellen wachsen in der G₁-Phase heran und erreichen ihre maximale Größe mit Beginn der S-Phase. Durch die Ausbildung des Sprosses ändert sich im weiteren Verlauf des Teilungszyklus die Morphologie der Zelle. Diese Veränderungen sollten bei genügend hoher Auflösung in einem 2D-Histogramm bestehend aus Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtintensität zu erkennen sein. Abbildung 6-2 zeigt ein solches Histogramm, aufgenommen von einer Probe mit 33 % G₁-, 53 % S- und 14 % G₂/M-Anteil. Die Regionen I und II kennzeichnen zwei ausgemachte Subpopulationen. Gleichzeitig geben die Markierungen die Lage der gates an, welche die Sortierungskriterien festlegen.

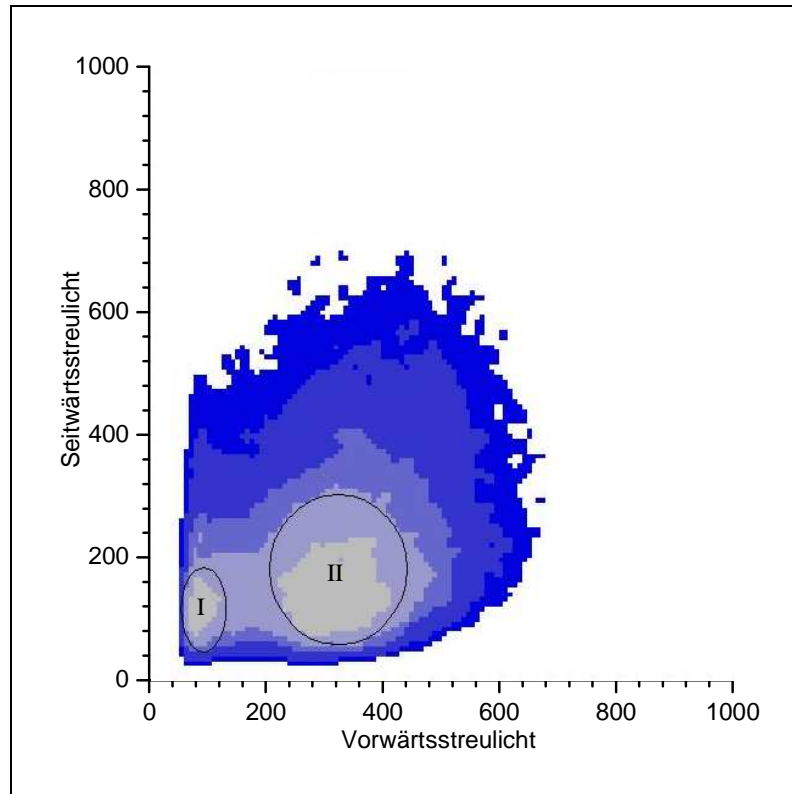


Abbildung 6-2: 2D-Histogramm einer Hefepopulation mit 33 % G₁-, 53 % S- und 14 % G₂/M-Anteil. Dargestellt ist die Intensität des Seitwärtsstreulichts gegen die des Vorwärtsstreulichts. Die Farbsättigung nimmt mit abnehmender Zelldichte zu. Die Bereiche I und II markieren zwei ausgemachte Subpopulationen.

Die Analyse des DNA-Gehalts der Subpopulationen nach der Sortierung zeigte im Vergleich untereinander und mit der ursprünglichen Probe nur eine geringe unspezifische Änderung der Zusammensetzung. Die Auflösung des Streulicht-Histogramms ist zu gering, um eine erkennbare Trennung der Subpopulationen zuzulassen. Objekte einheitlicher Größe weisen im Streulichtspektrum aufgrund unterschiedlicher Orientierungen im Laserfokus eine hohe Signalstreuung auf. Die Populationen zeigen darum eine große Überlappung und die Übergänge sind fließend. Die Zellgröße bzw. -morphologie und damit die zytometrische Größe des Streulichts stellen unter diesen Umständen keine geeigneten Charakteristika für die Sortierung der Zellzyklusphasen dar.

Trennkriterium Lipidgehalt

Für die Messung des Lipidgehalts wurden die Zellen nach dem Protokoll in Kapitel 10 im Anhang mit dem BODIPY[®]-Farbstoff gefärbt. Abbildung 6-3 zeigt ein Histogramm des

Lipidgehalts einer Probe mit der Zusammensetzung aus 33 % G₁-, 53 % S- und 14 % G₂/M-Phase. Auch für den Fall, dass Zellen unterschiedlichen Lipidgehalts in der Probe existieren, ist die Differenz zu gering, um von dem Zytometer aufgelöst werden zu können.

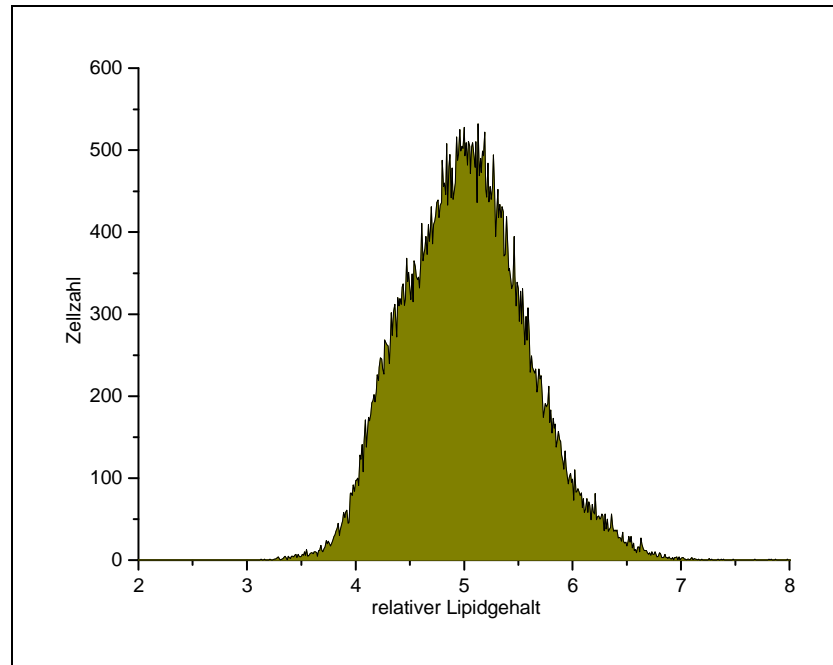


Abbildung 6-3: Histogramm des relativen Lipidgehalts einer Hefepopulation bestehend aus 33 % G₁-, 53 % S- und 14 % G₂/M-Phase.

Die Analyse der zeitlichen Entwicklung der Lipid-Histogramme zeigt lediglich eine oszillierende Schwankung im Gesamtlipidgehalt, zu sehen in Abbildung 6-4. Rückschlüsse auf die einzelnen Zellzyklusstadien können hieraus nicht gezogen werden. Der Lipidgehalt ist deswegen als Trennkriterium ungeeignet.

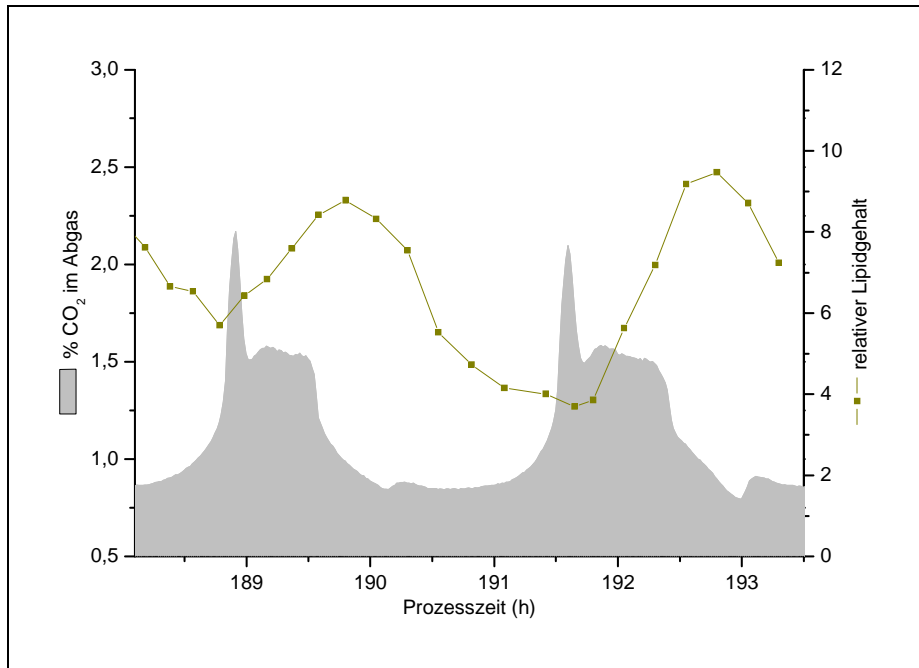


Abbildung 6-4: Änderung der zellinternen relativen Lipidkonzentration während zweier Oszillationszyklen einer synchronen Hefekultur. Der Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas der Kultur dient als Orientierungshilfe.

Trennkriterium Proteingehalt

Für die Messung des Proteingehalts wurden die Zellen nach dem Protokoll in Kapitel 10 im Anhang mit FITC gefärbt. Im Gegensatz zu den Histogrammen des Lipidgehalts sind bei der Proteinmessung zu jeder Zeit zwei Subpopulationen zu erkennen. Ein Sortierkriterium ist damit vorhanden. In Abbildung 6-5 ist die Veränderung des Protein-Histogramms während des Durchlaufs eines Zyklus aufgezeigt. Besonders der erste Peak zeigt eine deutliche Intensitätsveränderung.

Die geringste Größe hat der Peak während des Maximums der G₁-Phase. Während der G₂/M-Anteil der Gesamtpopulation noch fällt, ist bereits einhergehend mit dem Anstieg des S-Anteils ein Wachstum des ersten Peaks zu erkennen. Die stärkste Ausprägung zeigt der Peak im Maximum der G₂/M-Phase. Mit schwindendem G₂/M-Anteil wird der Peak wieder kleiner und erreicht seine geringste Größe wiederum zeitgleich mit dem Maximum der G₁-Phase.

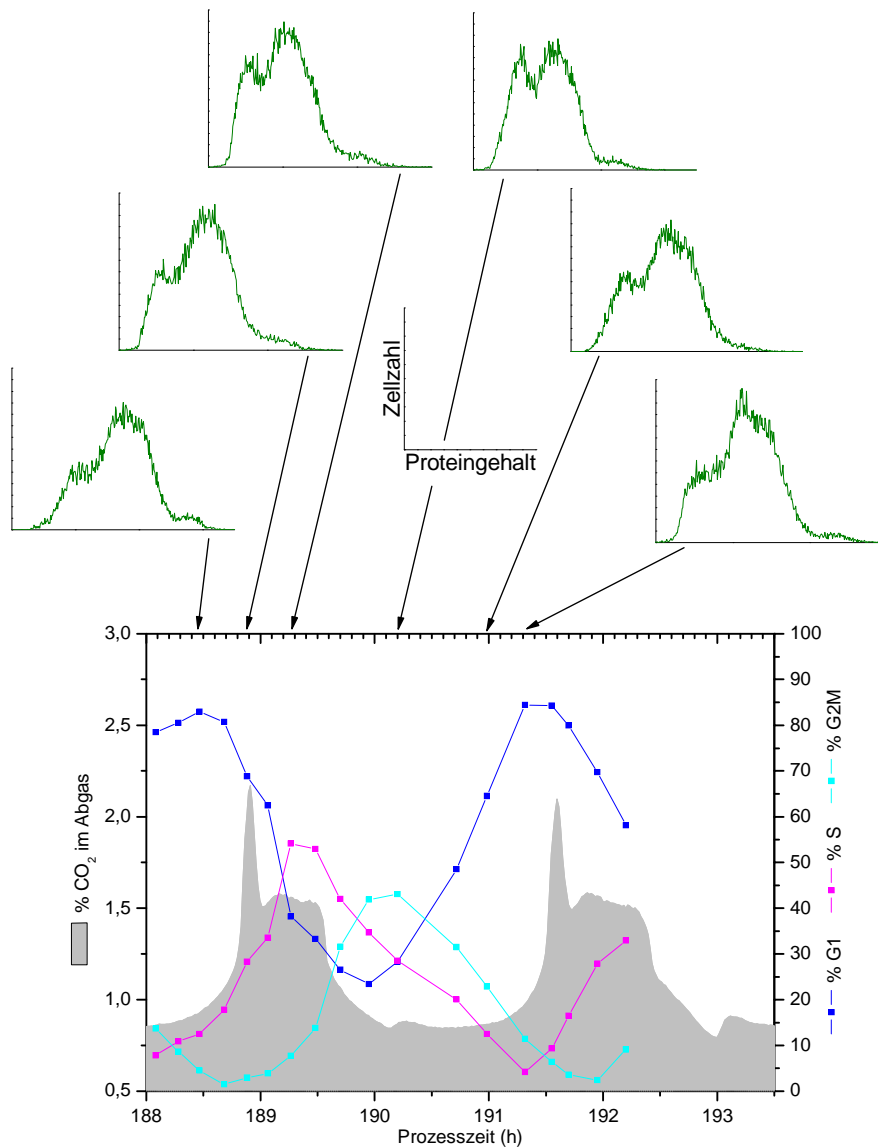


Abbildung 6-5: Veränderung des Protein-Histogramms während des Zellzyklus einer synchronen Hefekultur. Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Probenahme an. Im unteren Diagramm kann die zugehörige Zusammensetzung der Kultur aus den Zellzyklusphasen abgelesen werden. Der Verlauf der CO₂-Konzentration im Abgas der Kultur dient als Orientierungshilfe.

Die geschilderten Zusammenhänge lassen vermuten, dass sich der erste Peak aus den Signalen der Zellen in der S- und G₂/M-Phase zusammensetzt. Der zweite hingegen aus Zellen in der G₁-Phase. Da dieses bedeuten würde, dass die Zellen kurz nach der Teilung in der G₁-Phase den größten Proteingehalt und somit die größte Masse hätten, ist die Schlussfolgerung sehr unwahrscheinlich. Eine numerische Integration der Proteinpeaks ergab zudem keine Korrelation des ersten Peaks mit der G₁-Phase.

Zur Identifizierung der Subpopulationen wurden drei Proben nach ihrem Proteingehalt sortiert. Die Lage der gates, zu sehen in Abbildung 6-6, wurde dabei so gewählt, dass die Überlappung der Peaks in dem sortierten Bereich möglichst gering ist, um eine bestmögliche Trennung zu bewirken.

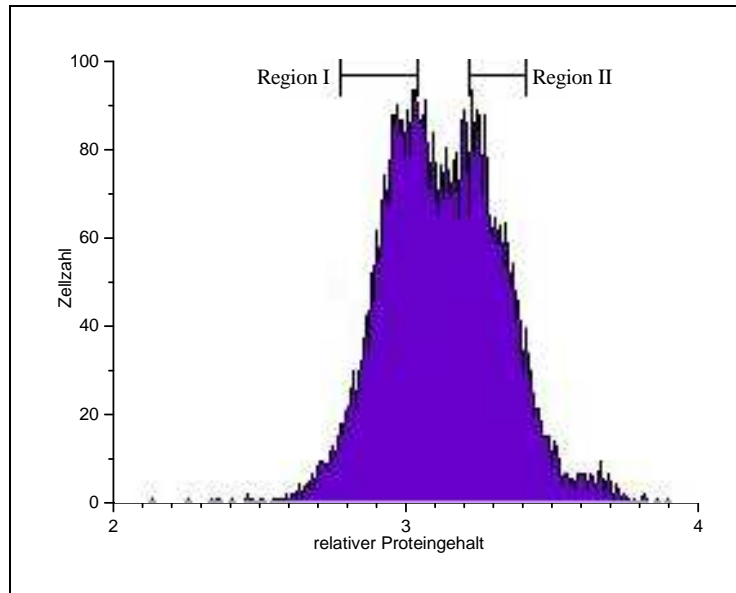


Abbildung 6-6: Histogramm des relativen Proteingehalts einer Hefepopulation bestehend aus 33 % G_1 -, 19 % S- und 48 % G_2/M -Phase. Am oberen Bildrand zu sehen ist die Lage der für die Sortierung verwendeten gates, welche mit Region I bzw. Region II bezeichnet sind.

Abbildung 6-7 zeigt das Ergebnis am Beispiel einer Probe mit der ursprünglichen Zusammensetzung aus 33 % G_1 -, 19 % S- und 48 % G_2/M -Phase. Die DNA-Analyse der Subpopulationen zeigt eine Anreicherung von G_1 -Zellen und eine Abnahme von G_2/M -Zellen in der Region I. Im Vergleich zu der unsortierten Probe stieg der G_1 -Anteil um 27 % auf 61 %. Der G_2/M -Anteil fiel um 31 % auf 17 %. In der Region II bietet sich genau das entgegengesetzte Bild. Hier ist sich eine Anreicherung von G_2/M -Zellen um 12 % auf 60 % und eine Abnahme von G_1 -Zellen um 12 % auf 22 % zu erkennen. Der Anteil der S-Phase bleibt nahezu konstant. Zellen in diesem Stadium liegen kontinuierlich im gesamten Signalbereich verstreut.

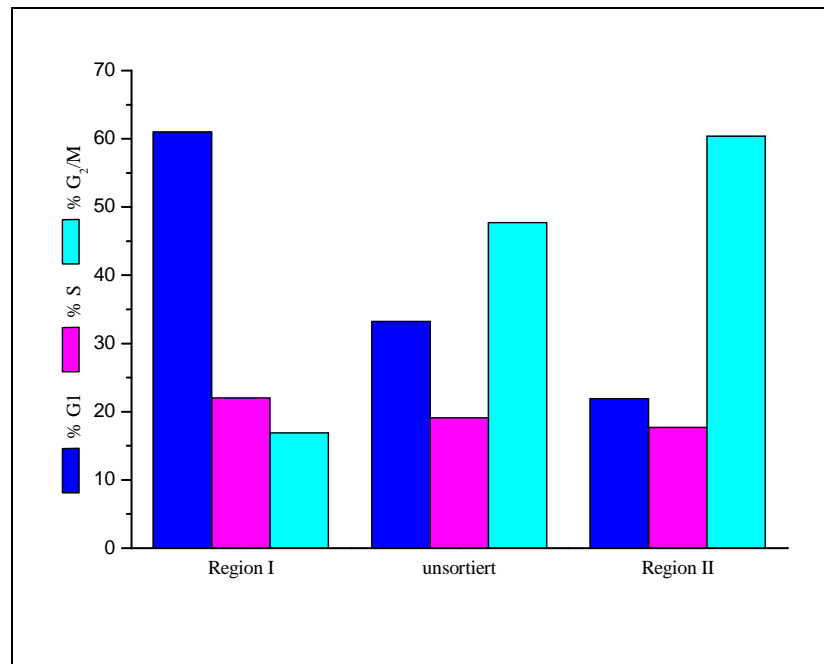


Abbildung 6-7: Zusammensetzung der unsortierten Gesamtpopulation, sowie der Subpopulationen in den Regionen I und II.

Wie schon in Kapitel 6 beschrieben resultieren aus der unsymmetrischen Zellteilung zwei unterschiedliche Arten von G_1 -Zellen, große Mutter- und kleine Tochterzellen. Im Vergleich dazu sind die Größenunterschiede zwischen ausgewachsenen G_1 -Zellen und Zellen in der S- und G_2/M -Phase gering. Aus dem Ergebnis und den geschilderten Zusammenhängen kann geschlussfolgert werden, dass sich hinter dem ersten Peak in der Region I hauptsächlich kleine Tochterzellen in der G_1 -Phase verbergen. Der Restanteil von G_1 -Zellen in der Region II sollte demnach überwiegend aus großen Mutterzellen bestehen. Das Heranwachsen die Tochterzellen mit fortschreitender G_1 -Phase sollte daher mit einer Intensitätsabnahme der ersten Peaks im Protein-Histogramm verbunden sein, was auch bei der Messung in Abbildung 6-5 beobachtet wurde.

Die Auflösung des Protein-Histogramms ist hoch genug und die Überlappung der Peaks gering genug, um eine teilweise Trennung der Populationen zu ermöglichen.

6.2. Chipexperiment

S. cerevisiae war als erster Eukaryont vollständig durchsequenziert (s.S. 42) und inzwischen gibt es DNA Chips mit dem gesamten Hefegenom, wie z.B. von der Firma Ocimum, <http://www.ocimumbio.com>; Yeast OciChip™, der kommerziell gehandelt wird. *S. cerevisiae* hat als Modellorganismus für Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips mehrere Vorteile: Sie verbindet als einzelliger Eukaryont eine hohe Ähnlichkeit zu Säugerzellen mit prokaryontischer Handlichkeit: Hefen besitzen eine kurze Generationszeit, sind ungefährlich und auf preiswerten Medien auch in großen Mengen mit geringem apparativem Aufwand leicht kultivierbar.

Das Prinzip eines Array-Experiments besteht darin, alle auf dem Array befindlichen Genproben simultan mit einer Nukleinsäureprobe zu hybridisieren. Dazu wird in erster Linie fluoreszenzmarkierte cDNA eingesetzt. Entscheidend ist hierbei, dass die durch reverse Transkription von RNA aus Zellen gewonnene cDNA im Idealfall alle dort spezifisch exprimierten Gene umfasst. Das parallele Hybridisieren einer Nukleinsäureprobe mit einer Vielzahl von komplementären Genproben auf einem DNA-Array führt zu einem charakteristischen Hybridisierungsmuster mit entsprechender Hybridisierungsintensität. Hier zeigt sich der entscheidende Vorteil dieser Technologie gegenüber anderen Methoden zur Untersuchung von Genexpression. Während sich herkömmliche Methoden auf die Untersuchung einzelner Gene beschränken, liefert ein DNA-Array ein komplettes Genexpressionsprofil der untersuchten Zelle, hier der synchronisierten Hefezelle. Besonders interessant ist die hierdurch gegebene Möglichkeit, die zellzyklusabhängige Genexpression zu untersuchen. Das Erfassen von Unterschieden in der Genexpression ist durch das gleichzeitige Hybridisieren von Zellen aus der G1- bzw. der S-Phase möglich. Außerdem erlaubt der Vergleich statistisch signifikanter Hybridisierungssignale und ihrer Stärke mit vorherig gespeicherten Array-Daten ähnlicher Experimente nicht nur die Analyse der unterschiedlichen Genexpression in G1- und S-Phase, sondern ermöglicht auch Einblicke in den zeitlichen Verlauf des Genexpressionsprofils von Hefezellen unter verschiedenen Synchronisationsbedingungen.

Neben der Grundlagen-Untersuchung zellzyklusspezifischer Genexpression ist ebenfalls eine anwendungsorientierte Analyse von Biosynthesegenen von großer Bedeutung z.B. für die pharmazeutische Industrie, um Hefen biotechnologisch als Produzenten diverser Biomoleküle einzusetzen, z.B. des Antibiotikums Cephalosporin C. Von besonderem Interesse ist folglich die Interaktion zwischen zellzyklusabhängiger Genexpression und der Produktion von Molekülen, die entweder aus zelleigenen Mediatorstrukturen abgeleitet oder über heterologe Genexpression induzierbar sind.

Versuchsablauf:

- Chemostatkultivierungen synchronisierter Hefezellen,
- Probenahme aus dem Reaktor,
- Isolierung der Total-RNA.
- Reverse Transkription, cDNA-Synthese, Fluoreszenzmarkierung
- Hybridisierung auf *whole genome* Hefearrays.

Bei der anschließenden Auswertung dieser Chips entstehen sehr große Datensätze, die nur mit Hilfe modernster bioinformatischer Methoden effizient analysiert werden können. Diese Analysen wurden von der Arbeitsgruppe von Hitzmann durchgeführt und sind inzwischen so weit fortgeschritten, dass ein zellzyklusspezifischer *low-density*-Chip konzipiert werden konnte. Ausgehend vom Vergleich der Genregulation in synchronisierten Hefen zwischen G1 und S-Phase sind ca. 140 spezifische Gene besonders interessant, für die mittels spezieller Software (GCG) 50mer-Oligonukleotide aus dem 3'-Bereich des jeweiligen Gens designed und auf Einzigartigkeit geprüft wurden. Mittels der Software lässt sich das Hybridisierungsverhalten der ausgewählten Oligodeoxynukleotide simulieren und einander angleichen. Wichtige Parameter hierbei sind die einheitliche Länge der Oligonukleotide, ein ähnlicher GC-Gehalt und eine übereinstimmende Schmelztemperatur. Somit wird zum einen ein gleiches Hybridisierungsverhalten der Oligonukleotide auf dem Chip gewährleistet und zum anderen die Einmaligkeit der Oligosequenzen im Genom sichergestellt. Insgesamt wurden 140 Oligonukleotide ausgewählt und in Auftrag gegeben. Die Gene sind im Anhang tabellarisch aufgeführt:

Das Ziel des Projekts ist die Entwicklung eines zellzyklusspezifischen Hefechips, um anschließend die Genexpression in synchronisierten Hefezellen zu analysieren und für Fermentationszwecke zu nutzen. Ausgehend von Hybridisierungen auf *Whole-genome* Microarrays wurden globale Genexpressionsprofile in *S. cerevisiae* erfasst und analysiert. Die hierbei auftretenden Unterschiede in der Genexpression zwischen G1- und S-Phase des Zellzyklus bildeten die Grundlage zur Entwicklung eines spezifischen Zellzyklus-Chips. Durch diese Screening-Experimente auf *whole genome arrays* wurden 140 differentiell regulierte Gene erfasst und ausgehend von den codierenden Sequenzen dieser Gene, die über Datenbanken zugänglich sind, die Sondenmoleküle für den Chip designed und ihre Synthese in Auftrag gegeben. Diese Oligonukleotide stehen ab sofort für *low-density-arrays* zur Verfügung, die im Institut für Technische Chemie mit einem Affymetrix 417 Arrayer gedruckt werden.

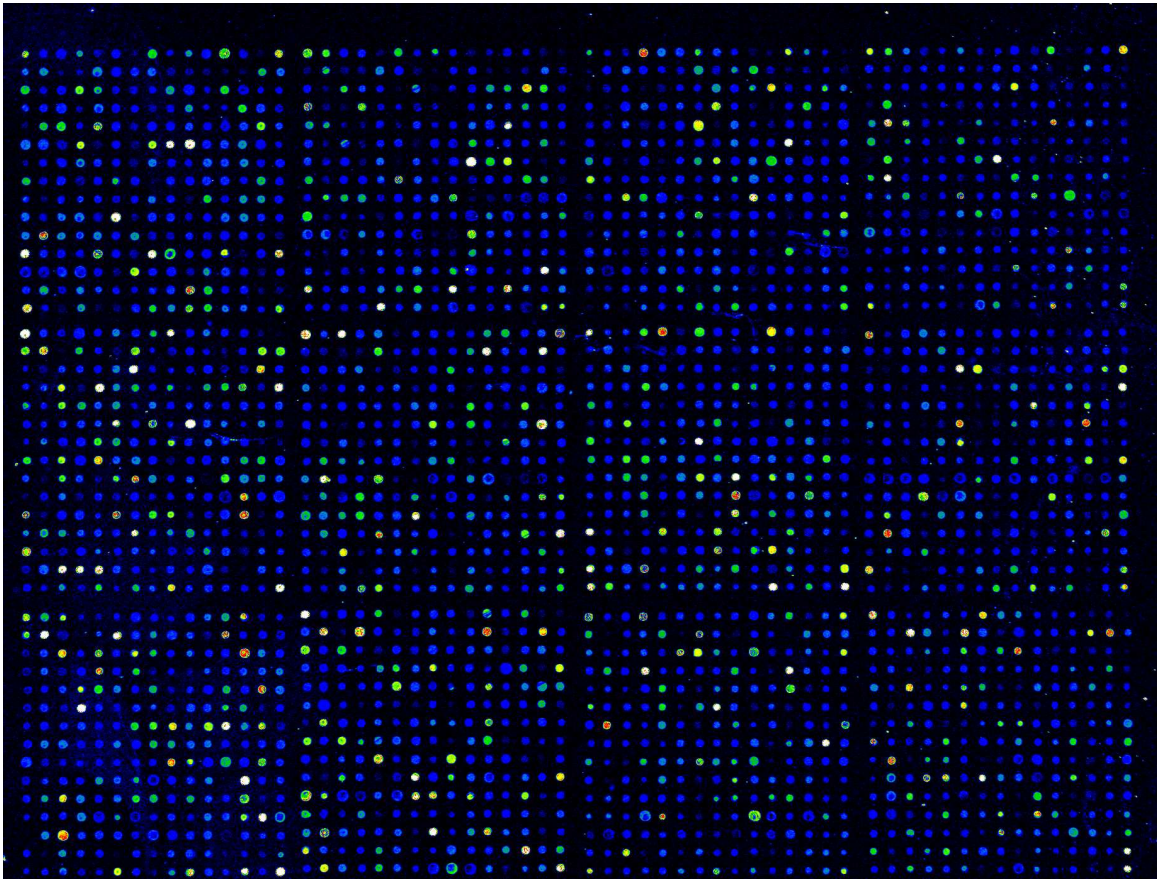


Abbildung 8.1: kompletter Hefe Chip mit dem Fluoreszenzmarker Cy3 gefärbt und gescannt.

7. In-vitro-Testung potenzieller Pharmawirkstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mehrerer synthetisch hergestellter Wirkstoffe mit Hilfe eines Proliferations-Schnelltests erforscht. Als Schnelltest wurde der so genannte MTT-Test (MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) eingesetzt. Das MTT wird dem Zellmedium zugegeben und reagiert in den Mitochondrien der Zellen zu einem blauen, unlöslichen Formazansalz. Nach Resolubilisierung des Formazansalzes kann die Absorption bei 570 nm gemessen werden. Die gemessene Intensität ist proportional zur Zellzahl. Die Substanzen wurden an den Krebszelllinien Colo320 (Darmkarzinom), HepG2 (Leberkarzinom), HeLa (Gebärmutterhalskarzinom) und A549 (Lungenkarzinom) getestet. Dabei zeigten sich bei den Wirkstoffen Chivasazol A und Tonantzitlon proliferationsunterdrückende Eigenschaften. In früheren Arbeiten [Burzlaff, 2002] wurde unter anderem der Wirkstoff Ratjadon auf seine tumorunterdrückenden Eigenschaften untersucht. Hier wurden detaillierte Studien über die Wirkungsweise mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie durchgeführt.

7.1. Zytostatika

Mit dem Begriff Zytostatika werden Stoffe bezeichnet, die auf Säugerzellen toxisch wirken. Zellen, die sich im Zellzyklus, befinden sind besonders anfällig gegen Zytostatika. Bei Krebszellen, die nur noch den Zellzyklus durchlaufen und sich nicht in der G₀-Phase aufhalten, lassen sich die Zytostatika als Chemotherapeutikum einsetzen. Die bisher bekannten Zytostatika werden in vier Gruppen eingeteilt:

Allkylierende Verbindungen	Reagiert mit der DNA, wie Epoxide, Methansulfonate und Cyclophosphamid
Antimetabolite	Wirken hemmend auf wichtige Enzyme, wie Purin-Derivate und Methotrexat
Zytostatische Naturstoffe	Als Mitosehemmer wirkende Stoffe aus Mikroorganismen, wie Colcemid, Mithramycin und Azaserin
Sonstige Verbindungen	Hydrazone, Hydroxyharnstoffe-Derivate, etc.

Die in dieser Arbeit untersuchten Stoffe Tonantzitlon, Ratjadon, Chivosazol A und JJ34 gehören den zytotoxischen Naturstoffen an.

7.1.1. Tonantzitlon

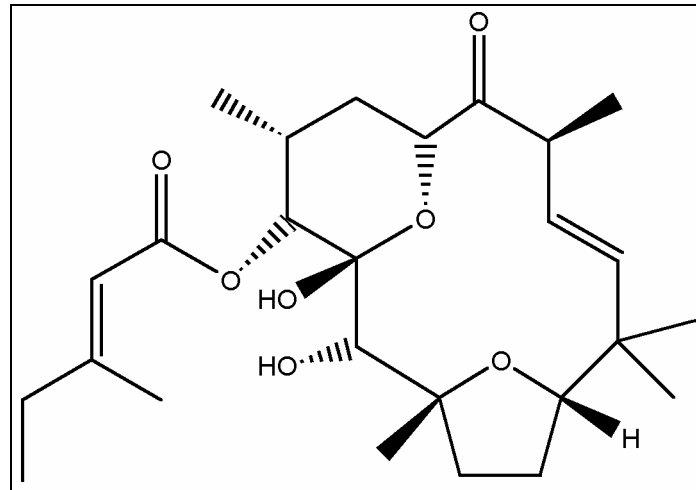


Abbildung 7-1: Strukturformel von Tonantzitlon

Tonantzitlon ist ein Naturstoff, der aus der mexikanischen Pflanze *stilinga sanguinolenta* erstmals 1997 isoliert wurde [Jasper, 2005]. Eine Vermutung des Wirkmechanismus ist die Veränderung des Aufbaus der Mitose-Spindeln in sich teilenden Zellen. Anstatt der normalen bipolaren Spindel wird oft nur eine Monoaster gebildet. Es handelt sich hierbei um einen Makrocyclus des Flexibilan-Typs. Da sich dieses Diterpen durch seine schlechte Wasserlöslichkeit auszeichnet, wurde ebenfalls das besser wasserlösliche Hydroxylamin-Tonantzitlon getestet.

7.1.2. Chivosazol A

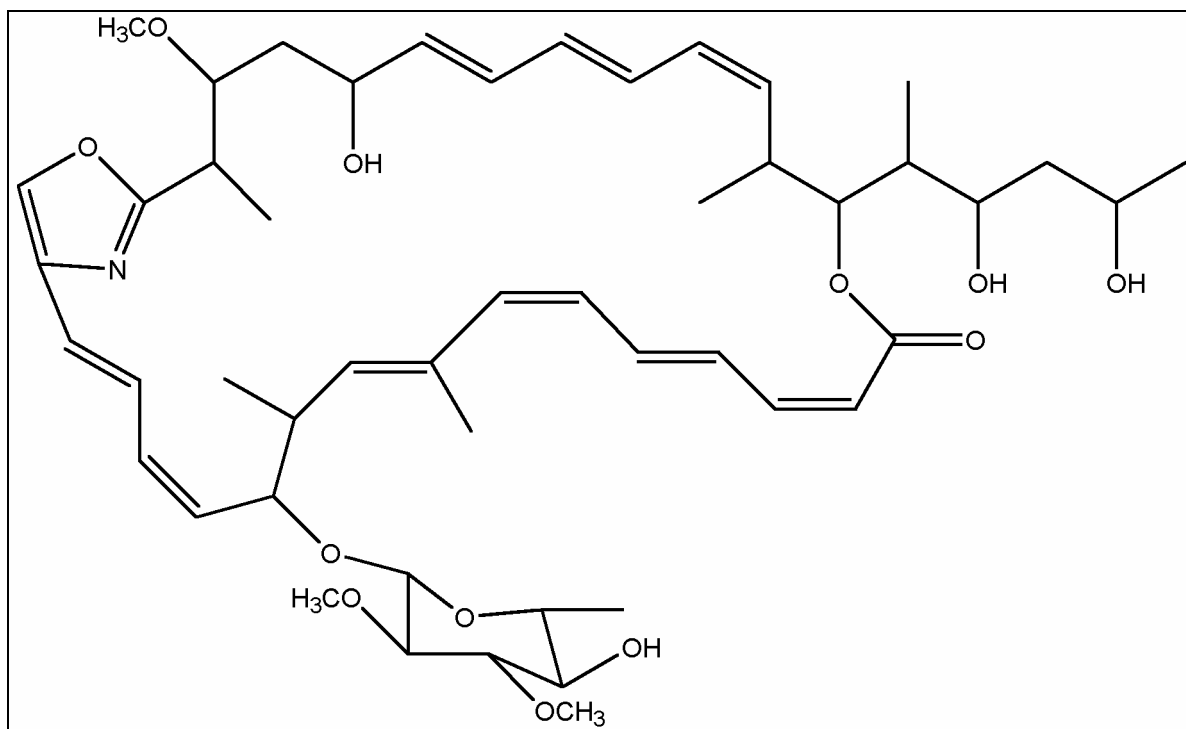


Abbildung 7-2: Strukturformel von Chivosazol A

Chivosazol A ist ein hochpotenter Wirkstoff, der von auf verrottendem Holz lebenden Myxobakterien *Sorangium cellulosum strain So Ce 12* gebildet wird, um die Pilzellteilung zu hemmen [Irschk, 1995]. Eine toxische Wirkung zeigt sich besonders gegen Pilzsprossen, faserigen Pilzen und Säugetierzellen (9ng/ml).

Darüber hinaus steht Chivosazol A-Acetonid zur Verfügung, das eine nicht ganz so gute Wasserlöslichkeit wie das Chivosazol A zeigt. Diese Verbindung kann dazu beitragen, die pharmakophoren Gruppe zu ermitteln. Ist der Ring für die Wirkung verantwortlich, so kann mit Hilfe der Seitenketten die Hydrophilie und die Lipophilie gesteuert werden. Lipophile Stoffe passieren beispielsweise die Blut-Hirnschranke und sind daher in ihrer Wirkung nicht nur auf die Physis beschränkt.

7.1.3. Ratjadon

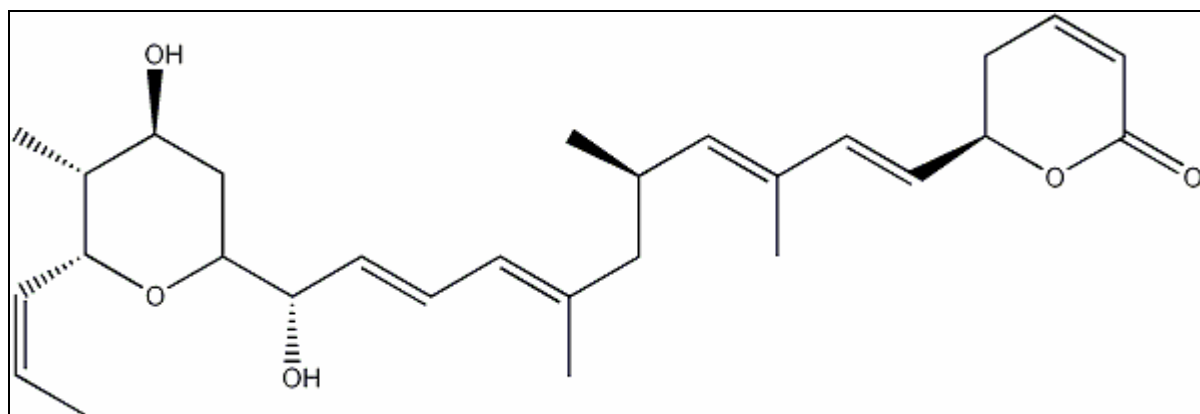


Abbildung 7-3: Strukturformel von Ratjadon

Ratjadon wurde erstmals 1994 aus dem Mykobakterium *Sorangium cellulosum* gewonnen. In ersten Screening konnte eine sehr hohe Wirksamkeit gegenüber der humanen Krebszelllinie HeLa und anderen Krebszelllinien [Burzlaff, 2002] festgestellt werden. Der detaillierte Wirkmechanismus ist noch nicht geklärt.

7.2. Vitalität

In den folgenden Darstellungen entspricht der rote Balken der relativen Intensität der unbehandelten Zellen mit 100 %. Radjadon wurde als Referenzsubstanz verwendet, da in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass durch Einfluss von Radjadon in hohem Maße selbst bei geringen Konzentrationen Apoptose ausgelöst wird. In dieser Arbeit wurde die Schwellenkonzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ verwendet. Um Lösemittelleffekte des verwendeten Methanols auszuschließen, wurden Zellen mit reinem Lösemittel der höchsten im Versuch angewandten Konzentration behandelt.

7.2.1. Tonantzitolon und Hydroxylamin-Tonantzitolon

Der Schwellenwert für die Wirkung liegt zwischen 75 $\mu\text{mol/L}$ und 200 $\mu\text{mol/L}$. Im höheren Konzentrationsbereich ist die Zytotoxizität noch stärker als die der hier verwendeten Schwellenkonzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ der Referenzsubstanz Radjadon. Das verwendete Lösemittel Methanol zeigt selbst in der am höchsten verwendeten Konzentration nur einen minimalen Einfluss.

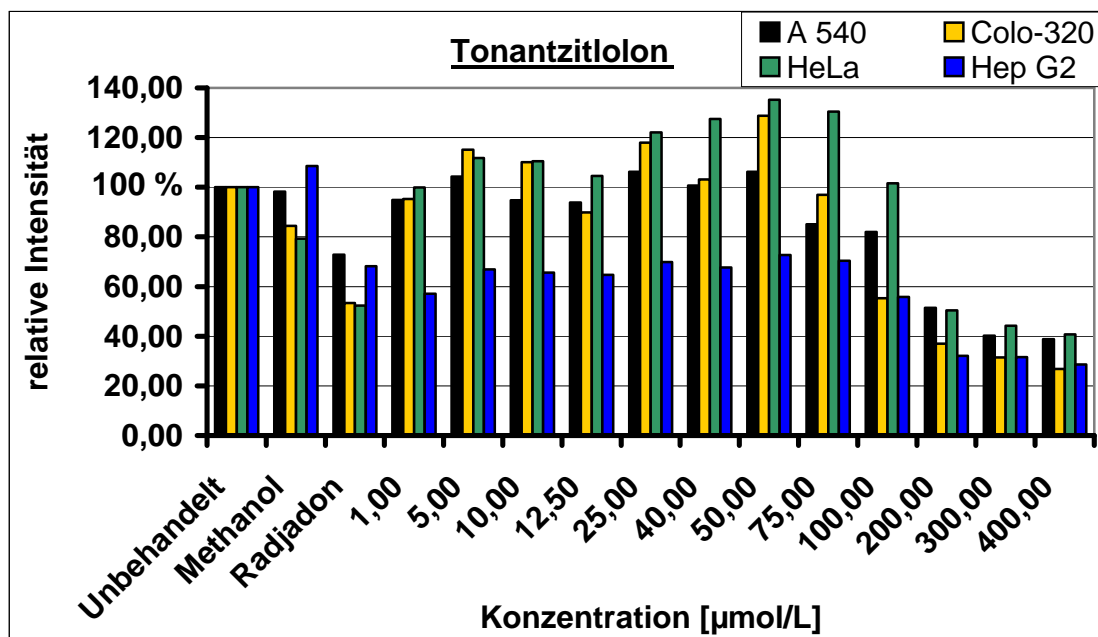


Abbildung 7-4: Wirkung von Tonantzitlolon auf die Vitalität von Krebszelllinien

7.2.2. 4.3.2 Chivosazol A und dessen Acetonid

Der Einsatz von Chivosazol A zeigt, dass die Wirkung bereits bei sehr geringen Konzentrationen einsetzt. Der Konzentrationsbereich 0,1 µmol/L bis 1 µmol/L zeigt eine vergleichbare Aktivität mit der Referenzsubstanz Radjadon. Die Schwellenkonzentration wäre etwa im Bereich von 1 µmol/L bis 5 µmol/L anzugeben. Ab der Konzentration von 100 µmol/L ist keine vermehrte biologische Aktivität des Chivosazol As mit vermehrter Substanzzugabe mehr zu beobachten.

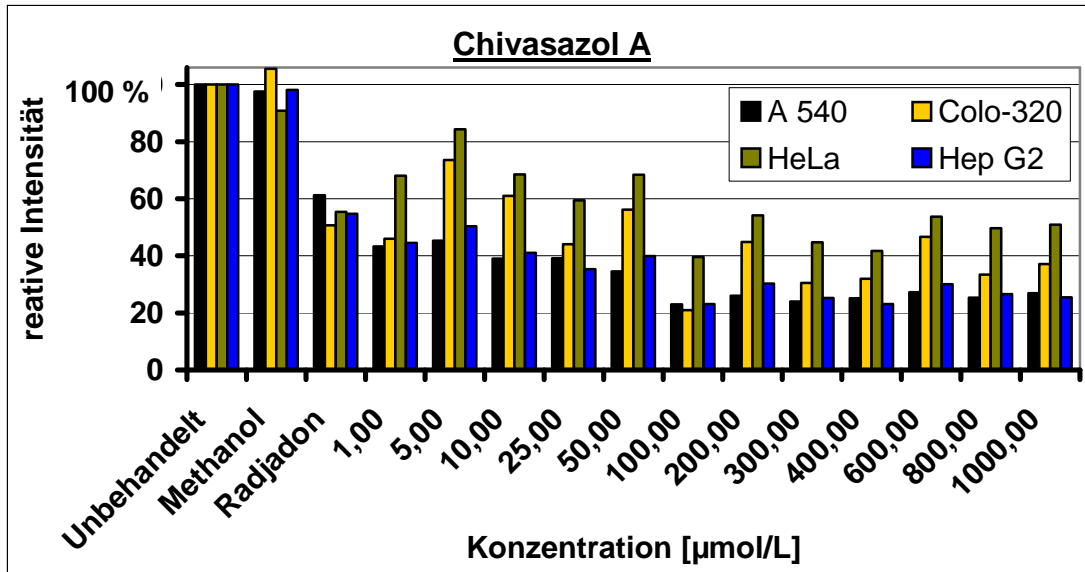


Abbildung 7-5: Wirkung von Chivasazol A auf die Vitalität von Krebszelllinien

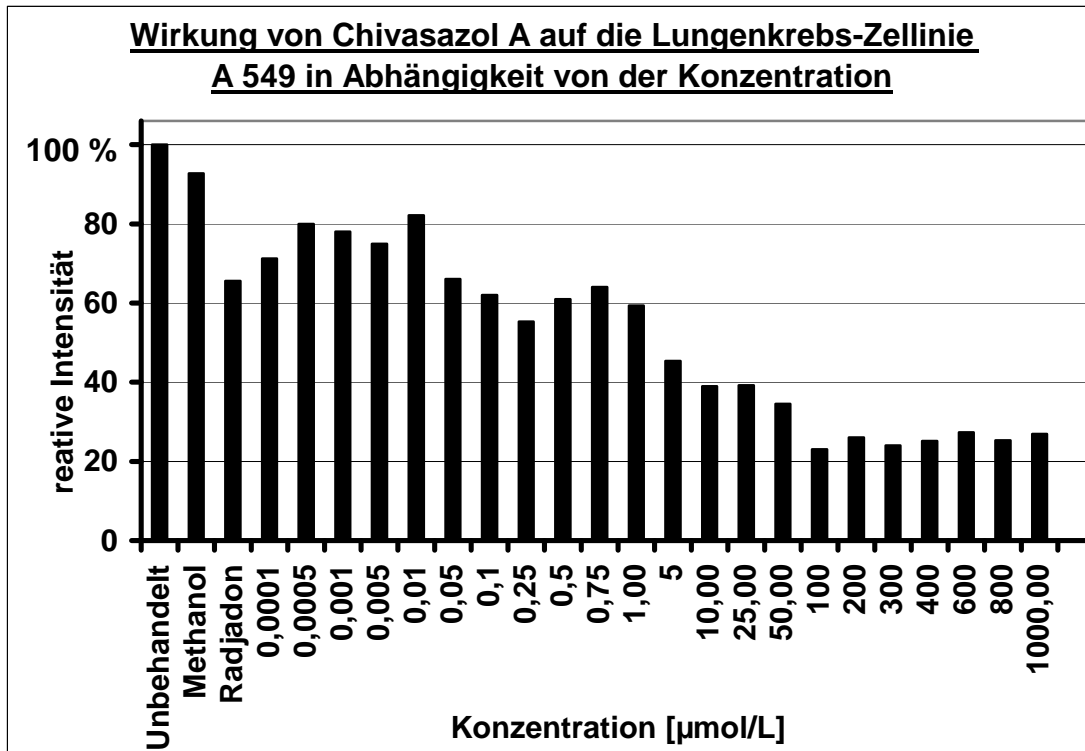


Abbildung 7-6: Wirkung von Chivasazol A auf die Vitalität von A 549-Krebszellen

7.3. Zellzyklusanalyse

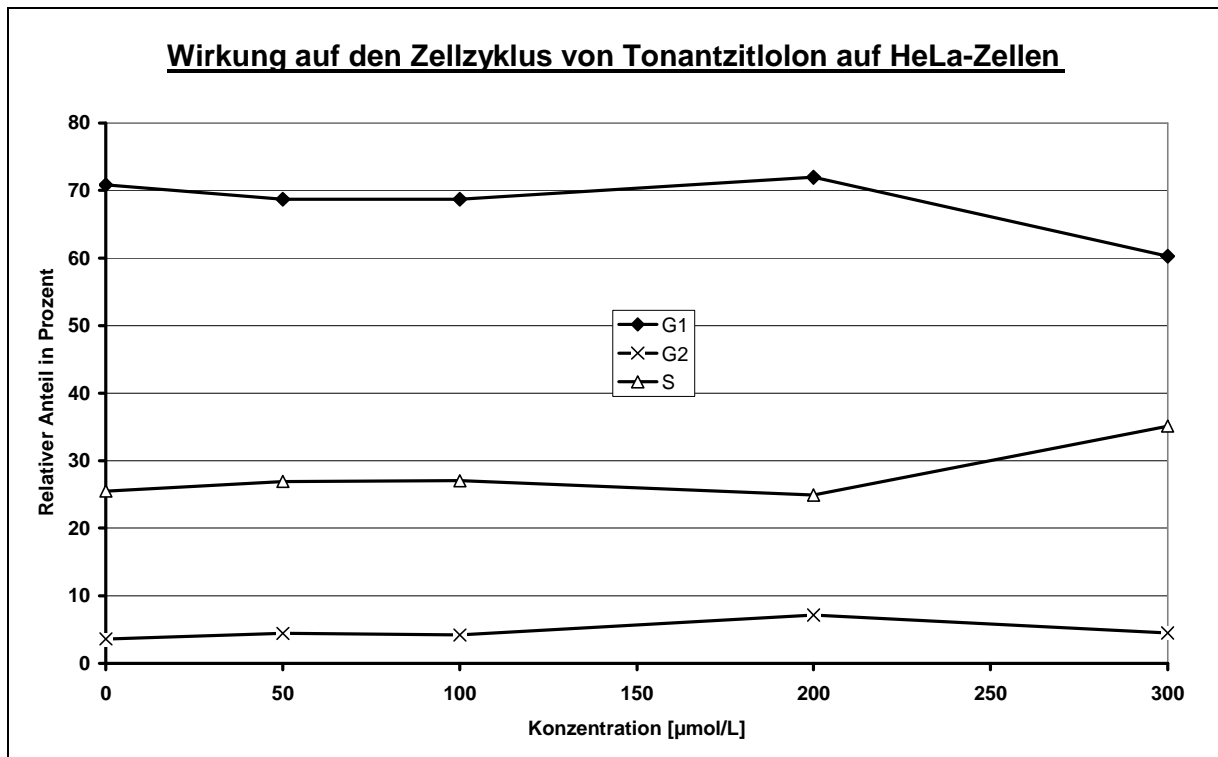


Abbildung 7-7: Wirkung von Tonantzitlolon auf den Zellzyklus der HeLa-Zelllinie

Geringe Konzentrationen von Tonantzitlolon haben keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Bei hoher Konzentration kann ein leichter Anstieg der Anzahl der in der S-Phase und ein Abfall der in der G₁-Phase befindlichen Zellen registriert werden. Dies lässt auf eine Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase schließen. In dieser Phase wird die DNA für die spätere Teilung synthetisiert. Auch die Referenzsubstanz Radjadon (siehe Abbildung 46 im Anhang A 1.2) zeigt einen starken Anstieg der Anzahl in der S-Phase befindlichen Zellen (76%) und einen starken Abfall der Zellzahl in der G₁-Phase (22%). Die Anzahl der Zellen in der G₂-Phase geht nur geringfügig zurück (auf 4%).

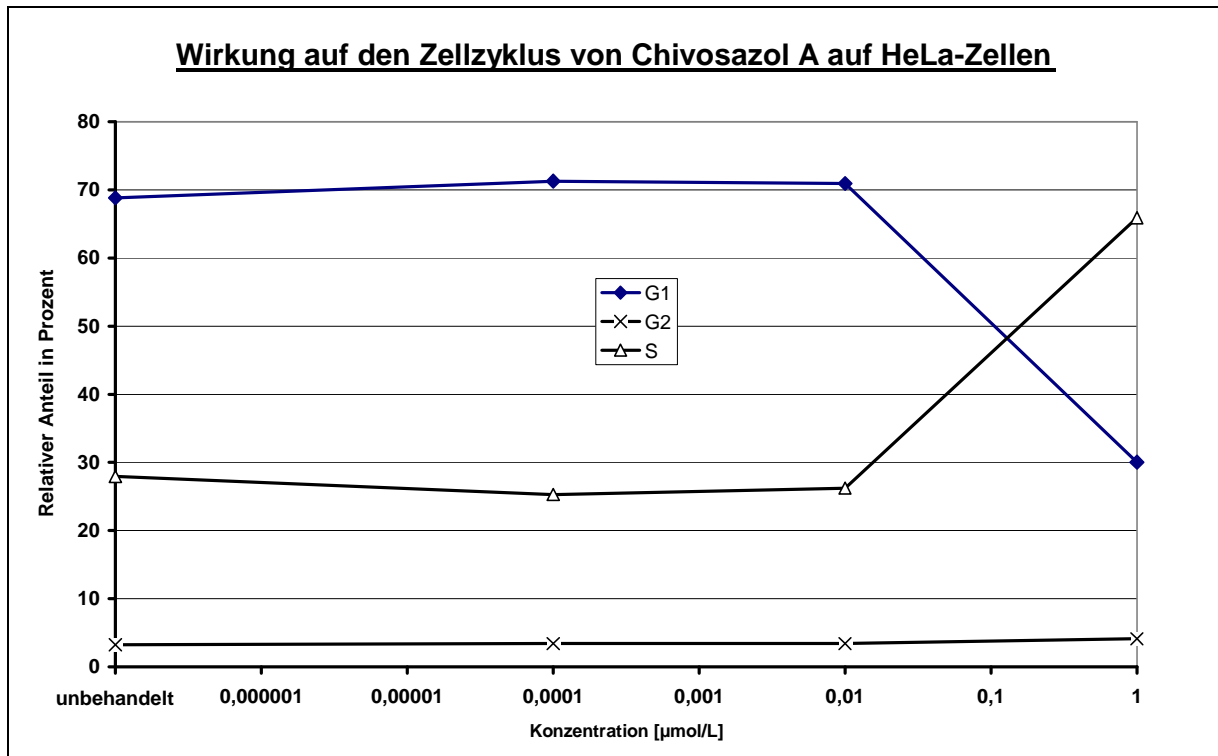


Abbildung 7-8: Wirkung von Chivosazol A auf den Zellzyklus der HeLa-Zelllinie

Chivosazol A hat ab einer Konzentration von 0,01 µmol/L einen deutlichen Einfluss auf den Zellzyklus. Es sind vermehrt Zellen in der S-Phase zu verzeichnen und die Anzahl der in der G₁-Phase befindlichen Zellen nimmt deutlich ab. Die Änderung der Zellzahl in der G₂-Phase ist geringfügig. Die Zyklusarretierung in der S-Phase lässt auf eine fehlerhafte DNA Synthese schließen. Die auf die S-Phase folgende G₂-Phase wird nicht mehr durchlaufen. Die Referenzsubstanz (siehe Grafik 47 im Anhang A 1.2) zeigt auch hier eine starke Zunahme der in der S-Phase befindlichen Zellen (64%) und eine starke Abnahme der Zellen in der G₁-Phase (30%). Die Anzahl der in der G₂-Phase befindlichen Zellen bleibt etwa konstant (6%).

7.4. Nähere Untersuchung von Zellen nach Ratjadon

Behandlung mittels DNA-Chiptechnologie

Für eine detaillierte Expressionsanalyse wurde ein spezifischer kommerziell erhältlicher humaner Apoptose Chip eingesetzt. Bei der DNA-Microarray-Technologie werden DNA-Sonden eingesetzt. Bis zu 30.000 verschiedene genspezifische Oligonukleotid-Sonden können auf der funktionalen Oberfläche eines Chips immobilisiert werden. Die zu analysierende Probe wird fluoreszenzmarkiert auf den Chip hybridisiert. Dabei binden komplementäre Basenpaare kovalent und die Probe wird über die Oligonukleotide an die Chipoberfläche gebunden. Anhand der Position auf dem Chip lassen sich die entsprechenden Gene zuordnen [Skena, 1998].

Für diese Untersuchung wurden HepG2 Zellen für 24 Stunden und 48 Stunden mit Ratjadon behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Durchflusszytometrisch wurde Apoptose nach Behandlung der Zellen durch Ratjadon nachgewiesen. Es konnten 48 % apoptotische Zellen nach 48 Stunden in der Probe nachgewiesen werden. Dabei wurde auch eine Akkumulation der Zellen in der G1 Phase des Zellzyklusses festgestellt. Jeweils eine Probe behandelter Zellen wurde mit einer Probe unbehandelter Zellen auf einen Chip aufgetragen, mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und hybridisiert. Ausgelesen wurde der Chip im entsprechenden Fluoreszenzkanal mit dem Agilent Scanner. Bei der Signalauswertung wurden nur Gene berücksichtigt, die eine geringe Signifikanz aufweisen. Insgesamt wurden vier Apoptosechips hybridisiert, die in der folgenden Tabelle dargestellt sind.

Tabelle 7-1: Übersicht über die durchgeführten Chipexperimente

Chipexperiment	Cy3 markiert	Cy5 markiert
1	Ratjadon 24 Stunden	Kontrolle
2	Kontrolle	Ratjadon 24 Stunden
3	Ratjadon 48 Stunden	Kontrolle
4	Kontrolle	Ratjadon 48 Stunden

Ein paarweiser Vergleich der unbehandelten Proben mit den behandelten Proben zeigt das Expressionsprofil der Zellen unter Einfluss von Ratjadon. Es wurden mehr als 100 unterschiedliche Gene gefunden, die nach 24 und 48 Stunden hoch- bzw. runtergeregelt wurden. Dabei zeigten sich in der 48 Stunden Probe eine klare Regulation in Richtung

Apoptose. Einige Gene konnten auch Entzündungsreaktionen und der Zellzyklusregulation zugeordnet werden. Die gesamte Genliste befindet sich im Anhang.

In der 48 Stunden Probe ist das BCL2-Gen stärker expremiert. Dieses Gen induziert Apoptose [Leblanc, 2002], wobei die APAF1 Konzentration stark gesunken ist und dementsprechend auch die Konzentration der Caspasen herunterreguliert ist. Einzig Caspase 7 sticht aus diesem Schema mit einer Überregulation heraus.

Das zellzyklusregulierende Gen CDKN1A steigt von einer Verdoppelung der 24 Stunden Probe auf den 20-fachen Wert in der 48 Stunden Probe im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dieses Gen bewirkt einen Zellzyklusarrest in der G1/S Phase [Cazzalini, 2003].

Die Ergebnisse der DNA Analyse von mit Ratjadon behandelten Zellen bestätigen die Aussagen, die mit den Durchflusszytometer gewonnen wurden. Sowohl Apoptose auslösende Gene wurden hochreguliert als auch Gene die für den Zellzyklusarrest in der G1-Phase verantwortlich sind. Zusätzlich wurden Gene reguliert die für Entzündungsreaktionen verantwortlich sind. Zu beobachten ist auch, dass die Regulation nach 24 und 48 Stunden stark unterschiedlich aussieht. In Abbildung 7-9 ist dieses Verhalten schematisch dargestellt. Dabei zeigt sich, dass ein Großteil der Gene nach 24 und 48 Stunden entgegengesetzt regulieren.

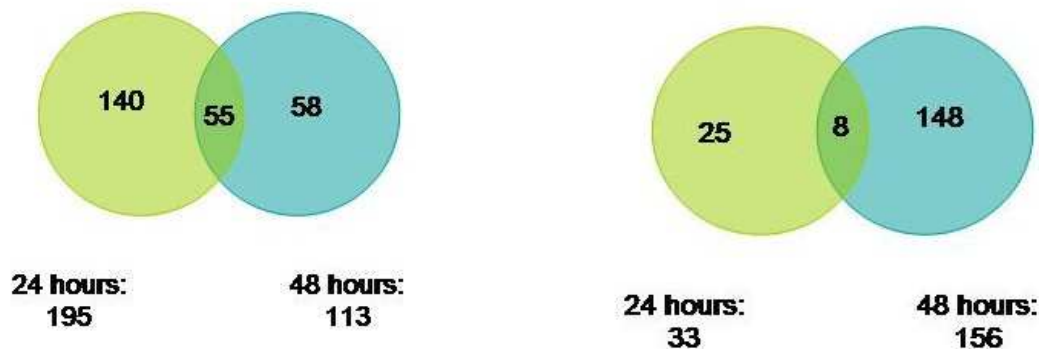


Abbildung 7-9: Hochregulierte (links) und runterregulierte (rechts) Gene der HepG2 Zellen im Vergleich nach 24 Stunden und 48 Stunden Behandlung mit Ratjadon.

8. IgG2b – Produktionssteigerung der Hybridomzelllinie BA-D5

Die Produktion monoklonaler Antikörper durch Hybridomzellen hat in der Forschung an Bedeutung gewonnen [Kronemaker *et al.*, 1994]. Aus diesem Grund wurden die Mechanismen, die zur Synthese und Sekretion von Antikörpern führen, genau untersucht [Suzuki *et al.*, 1989].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Produktivität einer Hybridomzelllinie zu steigern. In der Literatur ist beschrieben, dass die Lipidorganisation und Fluidität der Plasmamembran Auswirkungen auf Zellfunktionen haben können. Dem Medium wurde ein spezieller Lipidmix (Ex-Cyte®) hinzugefügt, der Cholesterol, Phospholipide und Fettsäuren enthält. In beiden untersuchten Hybridomzelllinien konnte die Antikörperproduktivität gesteigert werden [Savonniere *et al.*, 1996]. Eine weitere Möglichkeit beschreibt Lang. Hybridomzelllinien zeigen eine höhere Produktivität in kommerziell erhältlichem serumfreiem Medium als in normalem serumhaltigen Medium [Lang *et al.*, 1991].

Ein Nachteil von Hybridomzellen ist ihre Instabilität. Es wurde nachgewiesen, dass Hybridomzelllinien oft als gemischte Populationen von nicht produzierenden und produzierenden Zellen vorliegen [Heath *et al.*, 1990]. Hybridomzellen, die keine Antikörper mehr produzieren, können Gene verloren haben. Da die L- und H-Ketten auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert sind [Hengartner *et al.*, 1978], ist es möglich, dass entweder das eine oder das andere Gen fehlt. Es hat sich gezeigt, dass der Genabschnitt, auf dem die schwere Kette kodiert ist, häufiger verloren geht, als der Genabschnitt, der die leichte Kette kodiert [Coffino *et al.*, 1971]. Zellen, die keine Antikörper produzieren, weisen eine höhere Proliferationsrate auf [Kronemaker *et al.*, 1994].

Eine schnelle und einfache Methode, die produzierenden Zellen zu selektieren, ist mit Hilfe von FACS auf Basis der oberflächen-assoziierten Antikörpermenge möglich [McKinney *et al.*, 1991]. Dazu werden sekundäre Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, eingesetzt und so markierte Zellen aufgrund ihrer Oberflächenfluoreszenz sortiert. Die Intensität der Fluoreszenz ist ein Indikator dafür, wie hoch die Antikörperproduktivität der Zelle ist, da es einen Zusammenhang zwischen der Sekretionsrate von Antikörpern und der Oberflächenfluoreszenz gibt [Sen *et al.*, 1990].

Die Ba-D5 Zellen wurden gefärbt und anschließend mit dem FACS Vantage SE von Becton Dickinson GmbH auf der Basis ihrer Oberflächenfluoreszenz sortiert. Die gesamte Anzahl an

sortieren Zellen betrug $1,5 \cdot 10^7$. Hybridomzellen sind instabil und können im Laufe der Zeit ihre Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, durch Mutationen verlieren. Wenn die BA-D5 eine Population aus nicht produzierenden und produzierenden Zellen enthalten würde, müssten diese getrennt auf dem Histogramm, das sich während des Sortierens ergab, zu erkennen sein. Abbildung 8-1 zeigt dieses Histogramm.

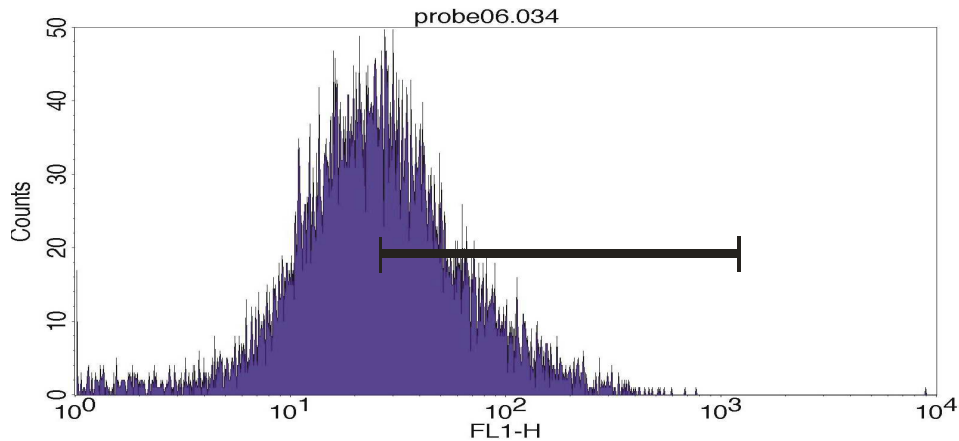


Abbildung 8-1: Histogramm bei einmaligen Sortieren der Zellen durch FACS

Die Intensität der Oberflächenfluoreszenz und die Häufigkeit, mit der sie auftraten, ähnelten einer Gauß-Funktion (Abbildung 8-1). Es war nur eine Population sichtbar. Die Kultur der BA-D5-Zellen enthält demnach offenbar keine Zellen, die die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, verloren haben.

Im Histogramm ist der Bereich markiert, ab welcher Fluoreszenzintensität die Zellen selektiert worden waren. Die selektierten Zellen wurden direkt nach dem Sortieren erneut vermessen (Abbildung 8-2). Der Anteil der Zellen mit geringerer Oberflächenfluoreszenz wurde geringfügig minimiert. Davon abgesehen war die Verteilung der Oberflächenfluoreszenz und die Häufigkeit, mit der sie auftrat, bei beiden Histogrammen sehr ähnlich. Die selektierten Zellen wurden kultiviert und erneut sortiert. Es gab keinen Unterschied zu den Histogrammen nach einmaligem Sortieren (Daten nicht gezeigt).

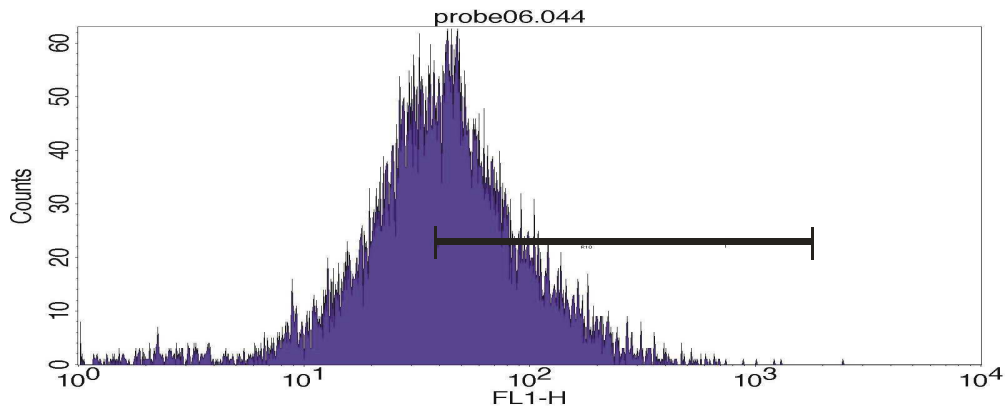


Abbildung 8-2: Histogram nach dem Sortieren der Zellen durch FACS

Der gemittelte Wachstumsverlauf der drei Kulturen war gleich. In allen Kulturen erreichten die Zellen am zweiten Kultivierungstag die stationäre Phase, in der sie ca. 24 h blieben, um dann in die Absterbephase überzugehen. Die maximale Zelldichte und die gemittelte spezifische Wachstumsrate unterschieden sich nur geringfügig (siehe Tabelle 8-1).

Tabelle 8-1: Darstellung der spezifischen gemittelten Wachstumsraten der Zellen nach dem Sortieren durch FACS

	max. Lebendzellzahl [10⁶ Zellen/ml]	Zeitpunkt der maximalen Lebendzellzahl [h]	gemittelte Wachstumsrate μ [h⁻¹]
Kontrolle	1,1	69	0,043
einmal sortiert	0,95	70	0,039
zweimal sortiert	1,05	45	0,042

Auch der Verlauf der Vitalität der Zellen war in etwa gleich. Die Vitalität der Zellen blieb bis zu 48 h über 90 % und fiel dann rapide ab, obwohl sich die Zellen in der stationären Phase befanden.

Die Glucose- und Lactatkonzentrationsverläufe waren sehr ähnlich und konnten mit dem Wachstumsverlauf der Zellen in Einklang gebracht werden. Die Glucosekonzentration sank im Laufe der Kultivierung von ca. 5 g/l auf ca. 1,5 g/l ab. Im gleichen Maße, wie die Glucosekonzentration abnahm, stieg die Lactatkonzentration an. Es wurden durchschnittlich 1,1 g/l Lactat von den Zellen produziert.

Die in Tabelle 8-2 dargestellten Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten unterschieden sich leicht. Die Zellen der Kontrolle wiesen die kleinste Verbrauchs- und Bildungsrate auf. Die Raten nach einmaligem und zweimaligem Sortieren waren ähnlich und lagen um einen Faktor von 1,6 über dem gemittelten Kontrollwert.

Tabelle 8-2: Darstellung der mittleren spezifischen Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsrate der Zellen nach dem Sortieren durch FACS

	Mittlere spezifische Glucoseverbrauchsrate [mg/(10⁶ Zellen·d)]	Mittlere spezifische Lactatbildungsrate [mg/(10⁶ Zellen·d)]
Kontrolle	1,41	0,58
einmal sortiert	1,93	0,98
zweimal sortiert	2,12	0,72

Die absoluten Antikörperkonzentrationen, die im Zellkultur-Überstand gemessen wurden, unterschieden sich leicht (Abbildung 8-3). Nach dem Sortieren durch FACS lag die IgG-Konzentration (ca. 30 µg/ml) niedriger als in dem Kontroll-Überstand, in dem ein Wert von 37 µg/ml gemessen wurde. Es ist also nicht gelungen, den Antikörpergehalt im Medium durch das Sortieren der Zellen zu erhöhen.

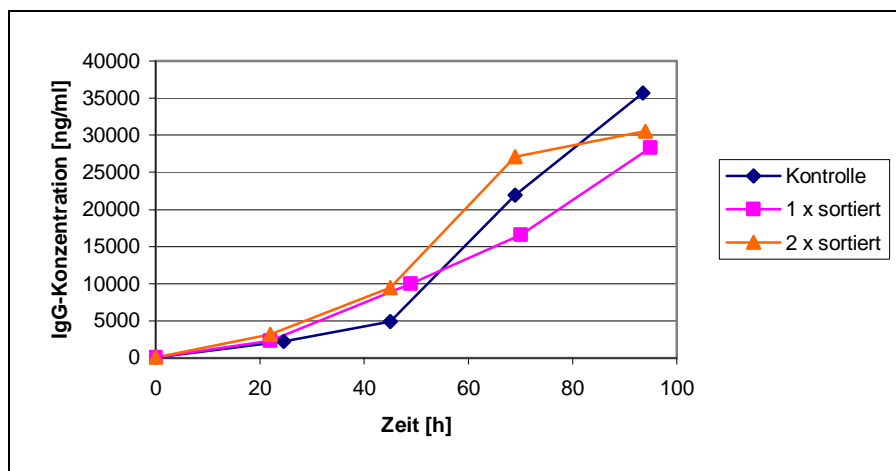


Abbildung 8-3: Darstellung der IgG-Konzentrationen im Überstand

Die gemittelten IgG-Produktionsraten der Zellen unterschieden sich nicht signifikant. Die Raten lagen zwischen 10,8 und 12,6 µg/(10⁶ Zellen·d).

Tabelle 8-3: Darstellung der IgG-Produktionsraten der Zellen nach dem Sortieren durch FACS

	Endpunkt IgG-Konzentration [µg/ml]	gemittelte IgG-Produktionsrate [µg/(10⁶ Zellen·d)]
Kontrolle	37,2	11,3
einmal sortiert	28,3	10,8
zweimal sortiert	30,6	12,6

Von den Kulturen, die zweimal sortiert worden waren, wurde neben dem gesamten IgG-Gehalt auch der IgG_{2b}-Gehalt ermittelt, um zu prüfen, ob Zellen, die IgG_{2b} produzieren, bevorzugt selektiert wurden.

Es wurden 45 ng/ml IgG_{2b} von den Zellen produziert. Der IgG_{2b}-Gehalt betrug im Vergleich zum IgG-Gehalt 0,15 % und lag damit unter dem durchschnittlichen Wert von 0,25 %. Die IgG_{2b} produzierenden Zellen wurden nicht selektiert. Die IgG_{2b}-Produktionsrate lag bei 0,021 µg/(10⁶ Zellen·d).

Das Histogramm, das sich während des Sortierens ergab, zeigte nur eine Population auf. Dies lässt darauf schließen, dass die kultivierten BA-D5-Zellen keine Subpopulation an Zellen enthielten, die die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, verloren hatten. Das Wachstumsverhalten und die Stoffwechselaktivität der BA-D5-Zellen vor und nach dem Sortieren waren gleich. Auch die Antikörperproduktionsraten zeigten keinen Unterschied auf. Trifft der in der Literatur beschriebene Zusammenhang zwischen dem Antikörperoberflächengehalt und der Produktionsrate bei den BA-D5-Hybridomzellen zu, hieße das, dass alle BA-D5-Hybridomzellen die gleiche IgG-Produktionsrate besitzen.

9. Zusammenfassung

Optische Analysensysteme haben in der Bioanalytik in den letzten Jahren stark an Einfluss gewonnen. Die Durchflusszytometrie ist seit den 80iger Jahren etabliert und die 2D-Fluoreszenzspektroskopie wird immer häufiger eingesetzt. In dieser Arbeit werden neue Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie gezeigt und mit anderen optischen Analysemethoden verglichen. Mit der Durchflusszytometrie werden routinemäßige Analysen an Säugertierzellen durchgeführt und dadurch Informationen über die Wirkungsweise von Wirkstoffen gewonnen. Das FACS wurde zur Anreicherung von hochproduzierenden Hybridomzellen verwendet. Die Chiptechnologie wurde angewandt, um weitere Informationen über die Genregulation in Hefen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen zu erhalten und die Genregulation bei Säugertierzellen zu bestimmen, die potentiellen Wirkstoffen ausgesetzt wurden. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Kapitel dargestellt.

2-Reaktorsystem

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde ein neu aufgebautes Reaktorsystem, bestehend aus einem großen Kultivierungsreaktor und einem kleinen Testreaktor, vorgestellt. Bedarf es einer großen Flexibilität in der Betriebsart oder Untersuchungen an Zellkulturen in großem Umfang bietet dieses System gegenüber einer Standard-Kultivierung folgende Vorteile:

- vielseitige Nutzungs- und Betriebsarten
- Zeit- und Materialersparnis während der Kultivierung
- bessere Vergleichbarkeit der Experimente

Anhand von Pulsversuchen mit einer Riboflavinlösung wurden durch die Messung der Fluoreszenz bei $\lambda_{ex}450/\lambda_{em}510$ nm Mischungsprofile vom Testreaktor bei verschiedenen Pumpgeschwindigkeiten aufgenommen und das Verweilzeitverhalten charakterisiert. Es wurde ein mathematisches Modell entwickelt mit dessen Hilfe die Mischungsvorgänge im Testreaktor in Abhängigkeit des Arbeitsvolumens und der Pumpgeschwindigkeit in der Anfangsphase gut beschrieben werden können. Bedingt durch den Zerfall der Markierungssubstanz wurde das Modell um einen kinetischen Term erweitert und war danach in der Lage, auch die Verhältnisse bei längeren Laufzeiten richtig wiederzugeben.

Das Reaktorsystem wurde anhand einer Hefekultivierung getestet und das Wachstumsverhalten in beiden Reaktoren miteinander verglichen. Während der Batch-Kultur wurden übereinstimmende Verläufe des CO₂-Gehalts im Abgas und in der Flavinfluoreszenz beobachtet.

Kontinuierliche Hefekultivierungen und DNA Chipexperiment

Die Untersuchungen zum Oszillationsverhalten der Kultur ergaben eine nahezu vollständige Unabhängigkeit vom pH-Wert im Bereich von 5 bis 6. Bei einem pH-Wert von 4,5 stellten sich keine Oszillationen ein. Im 2-L-Reaktor der Biostat-B-Anlage ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen bei einer Begasungsrate von 2,85 L/min in einem Bereich der Rührgeschwindigkeit zwischen 800 und 1200 min⁻¹ gewährleistet. Negativ auf das Oszillationsverhalten wirkt sich ein Mangel von Fe³⁺-Ionen im Kulturmedium aus. Bei Abwesenheit dieses Elements lässt sich das synchrone Wachstum zwar initiieren, kann aber von der Kultur selber nicht aufrechterhalten werden.

Verschiedene Proben von synchronen Hefekulturen wurden mittels Durchflusszytometriemessungen näher untersucht. Die Analysen dienten der Identifikation von Subpopulationen in Histogrammen von unterschiedlichen zytometrischen Eigenschaften: Größe und Morphologie, Lipid-, Protein- und DNA-Gehalt. Am FACS wurden die bestimmten Subpopulationen aussortiert und auf ihre Zusammensetzung aus Zellen in den verschiedenen Teilungsstadien untersucht. Angestrebt wurde dabei die Anreicherung von Zellen im selben Stadium der Zellteilung. Die durchflusszytometrischen Eigenschaften wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Trennkriterium bewertet. Die Untersuchungen dienten als Vorbereitung für eine quantitative Trennung von Zellproben, die als Material für die Anfertigung von DNA-Chips verwendet werden sollen. Eine Bedingung bei allen Sortiermethoden war deshalb die Erhaltung der zellinternen RNA.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Zellgröße und -morphologie und der Lipidgehalt als Sortierkriterium nicht in Frage kommen. In beiden Fällen ist die Auflösung der aufgenommenen Histogramme zu schwach, um eine Trennung zu ermöglichen.

Bei der Sortierung nach Proteingehalt gelang eine Anreicherung der Population der Zellen in der G₁-Phase von 33 auf 61 %. Synchrone Hefekulturen weisen zu entsprechenden Zeitpunkten höhere Anteile an Zellen in der G₁-Phase auf. Aussichtsreicher ist die

Anreicherung von G₂/M-Zellen mit dieser Methode von 48 auf 60 %, da dieser Wert bei den synchronen Hefekultivierungen zu keiner Zeit erreicht wurde.

In den Histogrammen des DNA-Gehalts konnten die Zellen in den verschiedenen Stadien der Zellteilung direkt identifiziert werden. Für die Erhaltung der RNA ist jedoch die Verwendung von speziellen, DNA-spezifischen Farbstoffen nötig, mit denen in dieser Arbeit keine brauchbare Färbung der Zellen erzielt werden konnten. Auch wenn keine Sortierungen auf Grund des DNA-Gehalts durchgeführt werden konnten, ist und bleibt diese Methode vom Prinzip her sehr vielversprechend, besonders in Bezug auf die Anreicherung von S-Zellen, da eine Subpopulation aus diesen Zellen nur in den DNA-Histogrammen identifiziert werden konnte.

In vitro Testung

Bei der *in vitro* Testung konnten die Schwellkonzentrationen von verschiedenen synthetischen potenziellen Anti-Tumor-Wirkstoffen festgestellt werden. Als Test wurde hier der etablierte MTT-Test verwendet, bei dem in den Mitochondrien der Zellen das MTT zu einem blauen Formazansalz umgesetzt wird. Bei den anschliessenden durchflusszytometrischen Untersuchungen sollte die Wirkungsweise der Substanzen näher bestimmt werden. Bei der Zellzyklusphasenbestimmung konnte ein G₂-Arrest der Zellen unter Einfluß von Chivosazol A festgestellt werden. Ratjadon zeigt einen Arrest in der G₁-Phase. Dieses lässt sich auf die Fähigkeit der Zellen zurückführen, nach Schädigung ihres Metabolismus den Zellzyklus an entsprechenden Restriktionspunkten anzuhalten. Bei der Substanz Ratjadon wurde mit einem DNA-Chip Experiment die Wirkungsweise auf die Zellen auf die relative Änderung der Genexpression hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die regulierten Gene nach 48 Stunden Behandlung mit Ratjadon einen aktiven Apoptosepfad aufweisen. Weitere hochregulierte Gene sind Entzündungsreaktionen zuzuordnen. Es wurden insgesamt fast 200 Gene gefunden, die unter dem Einfluß von Ratjadon hoch- bzw. runterreguliert wurden. Die Aktivität des Genes BCL2 ist stark hochreguliert. Dieses Gen wird mit der Beschleunigung apoptotischer Vorgänge in Zusammenhang gebracht [Leblanc, 2002]. Auch das Gen TNF, ein Entzündungszytokin, ist stark hochreguliert. Dies führt zur Hochregulation der Gene TNFRSF1, TRADD und FADD, die schließlich die Apoptose einleiten [Schulze-Osthoff, 1998]. Der Zellzyklusarrest in der G₁ Phase kann auch in der Genexpression beobachtet werden. Das Gen CDKN1A ist hochreguliert und induziert einen G₁ Phasen Arrest [Cazzalini, 2003].

Produktionssteigerung

Zur Erhöhung des IgG-Gehaltes im Zellkultur-Überstand wurden in dieser Doktorarbeit die Zellen aufgrund ihres IgG-Oberflächengehaltes mittels FACS selektiert. Die Antikörperproduktionsraten der Kontrolle und die der Zellen nach dem Sortieren durch FACS wiesen keine Unterschiede auf. Ein alternativer Ansatz zur Produktionssteigerung sieht die spezifische Anpassung des Mediums an die Zellen vor. In der Literatur ist zum Beispiel beschrieben, dass der Zusatz von Glucose [Seamans and Hu, 1990] oder Glutamin [Ramirez and Mutharason, 1990] Auswirkungen auf die Antikörperproduktion haben soll. Auch die Kultivierungsform kann einen Einfluß auf die Zellen haben, weshalb auch der Einsatz unterschiedlicher Reaktortypen eine Produktionsänderung hervorrufen kann.

10. Anhang

10.1. Methoden

10.1.1. Hefekultivierung

In allen Reaktoren wurden Hefezellen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* Wildstamm H620 kultiviert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgt in einem 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen und Animpfnadel. Zu 50 mL Schatzmann-Medium werden 5,8 g/L Na-Citrat gegeben und anschließend im Kolben autoklaviert. Glukose und Vitamine werden in 10 mL dest. Wasser gelöst und anschließend über einem Sterilfilter zugegeben. Angeimpft wird unter sterilen Bedingungen mit einer auf Schrägagar gehaltenen Kultur. Die Vorkultur wird anschließend 20 Stunden in einem Schüttelschrank bei 120 rpm und 30°C inkubiert.

10.1.2. Online-Analytik

pH-Wert

Zur Messung des pH-Wertes wird eine sterilisierbare Gelelektrode verwendet, die mit der Steuereinheit des Fermenters verbunden ist. Die Kalibration der Elektrode erfolgt vor dem Autoklavieren der Bioreaktoren mit zwei Pufferlösungen (pH 4,01 und pH 7,0). Nach Gebrauch wird die Elektrode in 3M Kaliumchloridlösung getaucht.

Gelöstsauerstoff

Der Gelöstsauerstoff wird mit Hilfe einer autoklavierbaren Elektrode als Sauerstoffpartialdruck amperometrisch gemessen. Dabei diffundiert der Sauerstoff aus der Lösung durch eine gasdurchlässige Teflonmembran, die die Messlösung von der Silberanode und der Platinkathode trennt, und wird an der Kathode reduziert. An der Anode wird Silber oxidiert.

Die Elektrode wird nach dem Autoklavieren im Fermenter kalibriert. Vor der Kalibration muss die Elektrode 6 Stunden polarisieren. Zur Kalibration wird zunächst durch Begasung mit Stickstoff der 0 % Wert eingestellt. Der 100 % Wert wird durch Begasung mit Druckluft unter

Fermentationsbedingungen (Temperatur und Rührerdrehzahl) eingestellt. Die während der Kultivierung gemessenen Werte geben den relativen Sauerstoffgehalt an.

Sauerstoff und Kohlenstoff in der Abgasanalytik

Gemessen wird der prozentuale Anteil an Sauerstoff und Kohlendioxid im Reaktorabgas. Jede Anlage hat dabei ihre eigene Abgasanalytik. Zugehörig zum Biostat B ist das Gerät S 710 Modular System (Sick Maihak, Waldkirch). An den Anlagen Biostat C und Q wurde mit einer Abgasanalytik der Typs EGAS 2 bzw. EGAS 1 (Hartmann & Braun, Frankfurt) gemessen. Die Geräte wurden jeweils an einen im Reaktordeckel installierten Abluftkühler angeschlossen.

Zur Messung des Sauerstoffs verwenden die Geräte eine elektrochemische Zelle. Zwischen den zwei Elektroden aus einer Platin-Legierung befindet sich ein Festelektrolyt aus einer Yttriumoxid-dotierten, sauerstoffionenleitenden Zirkondioxid-Keramik. Der Stromfluss der Zelle ist der Sauerstoffkonzentration direkt proportional.

Das Kohlendioxid wird spektrochemisch durch IR-Absorption charakteristischer Wellenlängen detektiert. Das eingebaute Spektrometer ist exakt auf die Molekülschwingungen von CO₂ eingestellt.

Die Kalibration der Abgasanalytik erfolgt manuell mit Eichgas (Linde) mit der Zusammensetzung 79% N₂, 19% CO₂ und 2% O₂.

Datenerfassung

Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mittels einer hauseigenen Software (RISP - Realtime Integrating Software Platform, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover). Aufgenommen wurden

- die Reaktortemperatur
- der pH-Wert
- der pO₂-Wert
- die Rührerdrehzahl
- der CO₂- und O₂-Gehalt im Abgas.

Aus den Abgaswerten wurden unter Einbeziehung der Begasungsrate und des Arbeitsvolumens folgende Parameter automatisch berechnet:

- Sauerstoffverbrauchsrate (OUR - Oxygen Uptake Rate)

$$OUR = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{O_2}^E - \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} \cdot x_{O_2}^A \right\}$$

- Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (CPR – Carbon dioxide Production Rate)

$$CPR = \frac{f_E}{V_M \cdot V_R} \left\{ x_{CO_2}^A - \frac{1 - x_{O_2}^E - x_{CO_2}^E}{1 - x_{O_2}^A - x_{CO_2}^A} \cdot x_{CO_2}^E \right\}$$

- Respiratorischer Qotient (RQ)

Der respiratorische Quotient beschreibt das Verhältnis von Kohlendioxidproduktionsrate und Sauerstoffaufnahme.

$$RQ = \frac{CPR}{OUR}$$

- f_E : Volumenstrom des eintretenden Gases [L/h]
 V_M : Molvolumen des idealen Gases (22,41 L/mol)
 V_R : Arbeitsvolumen [L]
 $x_{O_2}^E$: Molenbruch von O_2 im Gaseintritt
 $x_{O_2}^A$: Molenbruch von O_2 im Gasaustritt
 $x_{CO_2}^E$: Molenbruch von CO_2 im Gaseintritt
 $x_{CO_2}^A$: Molenbruch von CO_2 im Gasaustritt

10.1.3. Reaktorkessel

Biostat B

Bei dem Reaktionsgefäß des Biostat-B-Systems handelt es sich um einen 2-L-Edelstahlreaktor (Spezialanfertigung). Zur Sterilisation lässt sich der Reaktor vollständig autoklavieren. Für die Messelektroden sind im Reaktordeckel zwei 13,5-mm-Standardanschlussports eingelassen. Am Reaktordeckel angebracht sind neben den oben erwähnten Komponenten ein Rührer sowie Schlauchanschlüsse für Säure, Base und Mediumzulauf. Seitlich am Reaktor befinden sich drei 25-mm-Standardports zur Montage weiterer Messgeräte. Durchmischt wird das Medium durch drei übereinander angebrachte

sechsblättrige Blattrührer. Begast wird der Reaktor über einen externen Kompressor (Model 5876, Brose, Berlin), der Luft durch einen Sterilfilter (Midisart 2000, 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) über ein Begasungsrohr direkt in das Reaktormedium pumpt. Das Arbeitsvolumen lässt sich durch kontinuierliches Abpumpen des Mediums durch ein in einer festen Höhe installiertes Rohr im Deckel konstant halten.

Biostat C

Der Edelstahlreaktor des Biostat-C-Systems (B. BRAUN Biotech International, Melsungen) hat ein Fassungsvermögen von 20 L. Über die Steuereinheit sind der fest installierte Kessel sowie die Ablasshähne dampfsterilisierbar. In Reaktordeckel und Außenwand befinden sich insgesamt sieben 25-mm-Ports und drei 19-mm-Ports für die Montage von Messelektroden, optischen Analysegeräten und Anstechgarnituren. Integriert in den Deckel ist ein Blattrührer mit vier sechsblättrigen Rührköpfen.

Biostat Q

Der verwendete 300-mL-Edelstahlreaktor (Werkstatt des Technisch Chemischen Instituts, Universität Hannover) ist mit all seinen Komponenten vollständig autoklavierbar. Im Deckel integriert sind Schlauchanschlüsse für Säure, Base und Mediumzulauf und zwei 13,5-mm-Ports für Messelektroden. In der Reaktorwand befinden sich zwei 25-mm-Ports. Durchmischt wird der Reaktorinhalt mittels eines Magnetrührers mit einem prismenförmigen Rührfisch.

10.1.4. Kontinuierliche Kultivierung im Biostat B

Für die kontinuierliche Kultivierung wird der 2-L-Edelstahlreaktor der Biostat-B-Anlage mit 1,6 L Schatzmann-Medium (ohne Glucose, Vitamin- und Antibiotikallösung) befüllt und vollständig montiert. Die pH-Elektrode wird kalibriert und der Kessel mit den installierten Komponenten für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Nach der Sterilisation wird der Reaktor mit der Abgasanalytik, der Steuereinheit und dem Kompressor verbunden und die Begasung sowie das Thermostat eingeschaltet. Kurz vor der Animpfung des Reaktors wird durch Zugabe der Glucose-Lösung das Arbeitsvolumen auf 1,8 L eingestellt. Nach einer Polarisationszeit von mindestens 12 h wird die pO₂-Elektrode unter Fermentationsbedingungen kalibriert. Die 1:5-verdünnten Vitamin- und Antibiotikallösungen werden sterilfiltriert (Minisart High-Flow, 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) dem Medium durch ein Septum zugesetzt. Unmittelbar nach der Überimpfung der Vorkultur mit Beginn der

Batch-Kultivierung wird die Datenaufzeichnung (RISP, BioView) gestartet. Zur Vorbereitung auf die kontinuierliche Kultivierung wird der Reaktor mit dem leer autoklavierten Feed-Gefäß mittels einer Schraubkupplung verbunden. Das Schatzmann-Medium wird über zwei hintereinander geschaltete Sterilfilterkapseln (Sartopure PP2, 1,2 µm und Sartobran P, 0,45 + 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) in das Vorratsgefäß gepumpt. Nach Beendigung der Batch-Phase (ca. 24 h) kann die kontinuierliche Kultivierung gestartet werden. Die Zugabe der Feed-Lösung erfolgt mittels einer Peristaltikpumpe.

10.1.5. Kultivierung in der Reaktorkombination

Der 20-L-Kultivierungsreaktor der Biostat-C-Anlage wird komplett montiert und mit 5 L Schatzmann-Medium (ohne Glucose, Vitamin- und Antibiotikalösung) befüllt. Im Anschluss an die Kalibration der pH-Elektrode erfolgt die automatisierte Dampfsterilisation (30 min bei 121 °C) des Mediums und der Auslasshähne. Über eine Anstechgarnitur wird der Reaktor mit dem autoklavierten Feed-Gefäß und den pH-Korrekturflüssigkeitsflaschen verbunden. Der Behälter mit der Glucoselösung wird separat durch eine eigene Anstechgarnitur angeschlossen. Der 300-mL-Reaktor der Biostat-Q-Anlage wird zusammengebaut und bei 121 °C 30 min autoklaviert. Der Zusammenschluss der Kessel erfolgt ebenfalls über Anstechgarnituren. Die Begasung und das Thermostat der beiden Reaktoren sowie die Pumpen für den Kreislauf werden eingeschaltet. Nach einer Polarisationszeit von mindestens 12 h wird, nach Zugabe der Glucoselösung, die pO₂-Elektroden kalibriert. Nach Zugabe der sterilfiltrierten, 1:3-verdünnten Vitamin- und Antibiotikalösungen, wird die Vorkultur in den 20-L-Reaktor übergeimpft und die Datenaufzeichnung gestartet. In jedem Reaktor können die respiratorischen Parameter und die Kulturfluoreszenz gesondert gemessen werden. Während die Reaktoren verbunden sind erfolgt die pH-Korrektur durch den Biostat C. Erst nach der Trennung der Kessel wird jedes System durch die eigene Steuereinheit geregelt.

10.1.6. Säugerzellkultivierung

Bei der Kultivierung von Zellen ist darauf zu achten, dass zum Schutz vor Infektionen steril gearbeitet wird. Alle Arbeiten werden hierzu unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Geräte werden entweder bei 121 °C und 1,1 bar autoklaviert oder es werden sterile Einwegartikel verwendet. Proteinhaltige Lösungen und Medien werden durch Filtrieren sterilisiert, Puffer können autoklaviert werden. Alle eingesetzten Zelllinien werden bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre mit 100%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verschiedenen

Kultivierungsparameter der Zellen sind in Tabelle 10-1 aufgeführt. Zu den Medien wird 10% Kälberserum und als Antibiotika noch Amphotericin (2,5 µg/ml) und Genatmycin (50 γg/ml) zugesetzt.

Tabelle 10-1: Verwendete Zelllinien mit den wichtigsten Kultivierungsparametern

Name	Zelltyp	Kulturmedium	Verdopplungszeit
HeLa	Humanes Zervix-Karzinom	DMEM	48 Stunden
Jurkat	Humane maligne T-Zellen	RPMI 1640	30 Stunden
A549		DMEM	32 Stunden
Colo-320		RPMI 1640	55 Stunden

Stammkultur:

Aus der Stammkultur werden die Zellen zum Animpfen der Versuchskulturen entnommen. Ist eine Zelldichte über $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht oder die Glucosekonzentration unter 1,5 g/l gesunken, werden die Zellen, wenn sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, für 3 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf eine Zellzahl von ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt und danach in Spinnerflaschen kultiviert. Zusätzlich wird ein Teil der Kultur in flüssigem Stickstoff eingefroren, um bei Bedarf eine neue Stammkultur anzuimpfen.

Versuchskultur:

Versuchskulturen werden mit $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml angeimpft. Die Zellen werden als *batch*-Kultivierung bis zur Absterbephase kultiviert. Von jeder Versuchskultur wird täglich eine Probe (1 ml) entnommen und jeweils die Zellzahl und die Glucose-/ Lactatkonzentration bestimmt.

Einfrieren von Zellen:

Von einer Stammkultur werden Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, eingefroren. Hierfür werden die Suspensionszellen 3 min bei 400 g zentrifugiert, das überstehende Medium vollständig entfernt und die Zellen im Kulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wird in 1,8-ml-Kryoröhrchen überführt und 2 h über flüssigem Stickstoff eingefroren, um anschließend bei -196 °C gelagert werden zu können. Die Zelldichte in den Röhrchen ist so gewählt, dass beim Animpfen von Kulturen eine Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml entsteht.

Auftauen von Zellen:

Die bei -196 °C eingefrorenen Zellen werden bei Raumtemperatur aufgetaut. Dieser Vorgang sollte schnell sein, da das DMSO auf die Zellen zytotoxisch wirkt. Die Zellen werden anschließend 3 min bei 400 g zentrifugiert, das Medium mit DMSO abgenommen und in neuem DMEM resuspendiert. Die Zellen werden in eine Spinnerflasche überführt und mit vorgewärmtem Medium versetzt.

MTT-Test

MTT ist ein gelbes Salz, welches von den Dehydrogenasen in Mitochondrien lebender Eukaryoten zu einem blauen Formazansalz reduziert werden kann. Das Formazansalz wird aufgelöst und die optische Dichte bestimmt. Daraus lässt sich die Viabilität/Proliferation der eingesetzten Zellen bestimmen.

Die Zellen werden in 96-Lochplatten mit 100 μl Medium überführt, wobei nur die inneren 60 Löcher mit Zellen versetzt werden und die äußeren nur mit Medium, um Verdunstungseffekte auszuschließen. Die Zellen werden mit der zu untersuchenden Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Als Kontrolle bleiben Zellen unbehandelt, eine Testreihe wird nur mit dem eventuellen Lösungsmittel der Substanz versetzt und als Negativkontrolle wird nur reines Medium in eine Testreihe gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 bis 72 Stunden bei $37\text{°C}/5\% \text{ CO}_2$ wird das Medium gewechselt und 10 μl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS, steril filtriert) für 4 Stunden weiter inkubiert. Um die gebildeten Formazankristalle aufzulösen, wird 100 μl einer Solubilisierungslösung (10 % SDS in 0,01 M HCl, steril filtriert) zugesetzt und über Nacht inkubiert (mindestens weiter 4 Stunden). Die Messung erfolgt im Immunoreader mit einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzmessung bei 630 nm.

Färbung für Zellzyklusbestimmung

Nach der Inkubation der Zellen mit der zu untersuchenden Substanz wird das Medium abgetrennt und die Zellen mit Trypsin überschichtet. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C wird die Zellsuspension mit den vorher abgetrennten Medium vereinigt. Nach der Zentrifugation (400g, 3 Minuten) wird das Pellet vom Medium befreit und mit 100 μl RNase-Lösung versetzt. Um die RNA komplett zu verdauen wird die Suspension für mindestens 3

Stunden im Thermomixer bei 37°C und 800 1/Minute inkubiert. Die Messung erfolgt im Coulter Epics XL.

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem SV Total RNA-Isolation System der Firma Promega durchgeführt. Dabei wurden die trypsinisierten und abzentrifugierten Zellen mit Lysispuffer aufgenommen und in Matrixröhrchen (1,4 mm Keramik-Kugeln) im Fast Prep (2 x 20 s bei Stärke 6) aufgeschlossen. Die Proben werden zwischen den einzelnen Schritten auf Eis gekühlt. Anschließend wird die Probe bei 16200 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in einem ERG mit 300 µl Dilution Buffer und 400 µl EtOH (100 %) vermischt. Die Lösung wird in 2 Portionen über eine Säule gegeben und jeweils 1 Minute zentrifugiert (16200 g, 4°C). Anschließend wird die Probe mit 600 µl Wash Solution gewaschen und die DNA für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit DNase I (55 µl DNase I Verdau Mix) abgebaut. Anschließend wird die Reaktion mit 200 µl SV DNase Stop Solution gestoppt. Die Probe wird noch mit 600 µl und 200 µl jeweils gewaschen und zwischendurch abzentrifugiert (16200 g, 4°C). Abschließend wird die RNA mit 50 µl DEPC-Wasser (0,1%, pH7) eluiert.

Qualitätskontrolle der RNA

Die RNA-Proben wurden mit dem Agilent 2100 Bioanalyser mit dem RNA Nano Chip durchgeführt. Dabei wird die RNA-Konzentration und die Qualität, also das Verhältnis der RNA-Untereinheiten, bestimmt.

Der Labchip wird mit 9 µl Gel-Dye-Mix und jedes Probenloch mit jeweils 5 µl RNA 600 Nano Marker und 1 µl RNA bzw. dem RNA 6000 Ladder gefüllt. Die Proben und der Marker werden zuvor bei 70°C für 2 Minuten denaturiert. Der befüllte Labchip wird für 1 Minute und 2400 1/min geschüttelt. Anschließend wird der Labchip in den Agilent 2100 Bioanalyser fixiert und gemessen.

cDNA-Synthese für Chipexperimente

Für ein Chipexperiment wird 50 µg RNA eingesetzt. Die Probe wird mit RNase-freiem Wasser auf 18 µl aufgefüllt. Das Umschreiben in cDNA erfolgt mit dem cDNA labeling Kit der Firma Qiagen. Zu jeder Probe werden 2 µl Denaturierungslösung zugegeben, vermischt und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die Probe auf Eis gegeben und zu der Probe werden folgende Reagenzien addiert:

- 5 µl 10fach RT-Puffer

- 5 µl dNTP Mix U
- 1 µl Cy3/Cy5-dCTP
- 5 µl Oligo-dT-Primer
- 0,5 µl RNase Inhibitor
- 11 µl RNase freies Wasser
- 2,5 µl Label Star Reverse Transkriptase

Das 50 µl Gemisch wird für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit 2 µl Stopsolution LS versetzt. Anschließend wird zu der Lösung noch 10 µl 1 M NaOH gegeben und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Nachdem Abkühlen des Gemisches auf Eis wird mit 10 µl 1 M HCl neutralisiert.

Die Aufreinigung der cDNA erfolgt mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen. Das Gemisch wird mit 300 µl PB-Puffer vermischt, und auf eine Säule gegeben und 1 Minute zentrifugiert (16200g, 4°C). Der Durchlauf wird verworfen und 700 µl 35%ige Guanidinhypochlorid wird auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (16200g, 4°C). Anschließend wird die Säule 1 Minute trocken zentrifugiert und die cDNA mit 2 x je 25 µl EB-Puffer für 1 Minute bei 16200g und 4°C eluiert.

Vorbereitung zum Sortieren der Zellen

Hierzu wird ein Vorversuch durchgeführt, um zu prüfen, unter welchen Bedingungen und Verdünnungen der Anti-Maus-IgG-Antikörper an die Hybridomzellen bindet. Das Ergebnis wird mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes beurteilt. Die Hybridomzellen werden für die FACS-Sortierung wie folgt gefärbt:

$1 \cdot 10^6$ Zellen werden mit dem gleichen Volumen an kaltem DMEM versetzt und für 3 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 3 ml Bindungspuffer (DMEM, 2 mM Glutamin, PSA und 1 % (w/v) BSA), in dem der sekundäre Antikörper in verschiedenen Verdünnungen (1:20 bis 1:200) vorliegt, aufgenommen und 1 Stunde im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut zentrifugiert (10 Minuten bei 200 g), mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen und in 2 ml PBS aufgenommen. Die Zellen werden im FACS Vantage SE analysiert [Kronemaker *et al*, 1994].

Sortieren der Zellen

Die Sortierung der Zellen erfolgt mit Hilfe des FACS VantageSE der Firma BD Biosciences. Als Lichtquelle dient ein Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Für die

Messung wird der Bandpassfilter 530/30 verwendet. Die Nozzle-Größe beträgt 70 μm und der Hüllstromdruck $7,58 \cdot 10^4$ Pa. Der Probenstrom wird so gewählt, dass 1000 bis 2000 Zellen pro Sekunde sortiert werden (bis $7,93 \cdot 10^4$ Pa). Zum Sortieren wird der Normal-R-Modus verwendet.

Nach der Sortierung werden die Zellen 3 Minuten bei 400 g zentrifugiert, in DMEM (+ 10 % NKS) resuspendiert und in 125 ml Spinnerflaschen kultiviert.

10.2. Genchipergebnisse

Tabelle 10-2: Liste der verwendeten 140 ausgewählte Gene für den Hefe-Chip

Tabelle 8-1:

Liste der ausgewählten Gene 140 Gene

Gene Accession	Gene name and Function
PRX1/YBL064C	Mitochondrial peroxiredoxin (1-Cys Prx) with thioredoxin peroxidase activity
BNA4/YBL098W	Kynurenine 3-mono oxygenase
TIP1/YBR067C	Major cell wall mannoprotein with possible lipase activity
AMN1/YBR158W	Protein required for daughter cell separation, multiple mitotic checkpoints, and chromosome stability
RIB5/YBR256C	Riboflavin synthase
VAC17/YCL063W	Protein involved in vacuole inheritance; acts as a vacuole-specific receptor for myosin Myo2p
MATALPHA1 /YCR040W	Transcriptional co-activator involved in regulation of mating-type-specific gene expression
MCD1/YDL003W	Essential protein required for sister chromatid cohesion in mitosis and Meiosis
PMT5/YDL093W	Protein O-mannosyltransferase
PST1/YDR055W	Cell wall protein that contains a putative GPI-attachment site
VHS1/YDR247W	Cytoplasmic serine/threonine protein kinase & suggesting a role in G1/ S phase progression
URH1/YDR400W	Uridine nucleosidase
YHP1/YDR451C	One of two homeobox transcriptional repressors that bind to Mcm1p and to early cell cycle box (ECB) elements of cell cycle regulated
GIN4/YDR507C	Protein kinase involved in bud growth and assembly of the septin ring
YRF1-1/YDR545W	Helicase encoded by the Y' element of subtelomeric regions
YEL068C	Hypothetical protein
BLM10/ YFL006W/ 7	Protein involved in nuclear assembly and or regulation of proteasomal core particles
MSB2/YGR014W	Mucin family member at the head of the Cdc42p- and MAP kinase- dependent filamentous growth signaling pathway
YGR035C	Protein of unknown function, potential Cdc28p substrate
MUP1/YGR055W	High affinity methionine permease
CLB1/YGR108W	B-type cyclin involved in cell cycle progression; activates Cdc28p to promote the transition from G2 to M phase
CLB6/YGR109C	B-type cyclin involved in DNA replication during S phase; activates Cdc28p to promote initiation of DNA synthesis
YHB1/YGR234W	Nitric oxide oxidoreductase
YHI9/YHR029C	Protein of unknown function that is a member of the PhzF superfamily, possibly involved in a membrane regulation metabolic pathway
YHR127W	(H)igh copy (S)uppressor of (N)34 dominant negative allele of SEC4
SPO12/YHR152W	Nucleolar protein of unknown function, positive regulator of exit from Mitosis
RTT107/YHR154W	Protein that interacts with Mms22p and is implicated in Mms22-dependent DNA repair during S phase
YHR173C	Hypothetical protein
YIL025C	Hypothetical protein
QDR2/YIL121W	Multidrug transporter required for resistance to quinidine, barban, cisplatin, and bleomycin
MPS3/YJL018/19W	Essential integral membrane protein required for spindle pole body duplication and for nuclear fusion
PRY1/YJL079C	Protein of unknown function, has similarity to Pry2p and Pry3p and to the plant PR-1 class of pathogen related

proteins

HPR5/YJL092W	DNA helicase and DNA-dependent ATPase involved in DNA repair
YJL181W	Hypothetical protein
ECM25/YJL201W	Non-essential protein of unknown function; promoter contains a Consensus binding sequence for factor Abf1p
POL32/YJR043C	Third subunit of DNA polymerase delta, involved in chromosomal DNA Replication
CWP1/YKL096W	Cell wall mannoprotein
SLD2/YKL108W	Protein required for DNA replication, phosphorylated in S phase by S-phase cyclin-dependent kinases (Cdks)
LOT5/YKL183W	Protein of unknown function; gene expression increases in cultures shifted to a lower temperature
YKR012C	Hypothetical protein
PRY2/YKR013W	Protein of unknown function, has similarity to Pry1p and Pry3p and to the plant PR-1 class of pathogen related
proteins	
PET10/YKR046C	Protein of unknown function that co-purifies with lipid particles expression pattern suggests a role in respiratory growth ATP/ADP exchange
MET1/YKR069W	S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylase
YLR040C	Hypothetical protein
YLR169W	Hypothetical protein
SAM1/YLR180W	S-adenosylmethionine synthetase
FRE1/YLR214W	Ferric reductase and cupric reductase
NDL1/YLR254C	Homolog of nuclear distribution factor NudE, NUDEL
CTS1/YLR286C	Endochitinase, required for cell separation after mitosis
YLR326W	Hypothetical protein
GAS2/YLR343W	Putative 1,3-beta-glucanosyltransferase, has similarity to Gas1p
VID22/YLR373C	Glycosylated integral membrane protein localized to the plasma membrane
CSR1/YLR380W	Phosphatidylinositol transfer protein with a potential role in lipid turnover
YLR413W	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery
BSC3/YLR465C	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related Saccharomyces species
UNG1/YML021C	Uracil-DNA glycosylase, required for repair of uracil in DNA, expressed in late G1
YML034C-A	Hypothetical protein
YML119W	Protein of unknown function, potential Cdc28p substrate
YML125C	Protein required for cell viability
YMR031C	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
CTF18/YMR078C	Subunit of a complex with Ctf8p that shares some subunits with Replication Factor C and is required for sister chromatid cohesion
YMR144W	Hypothetical protein
SPC98/YNL126W	Component of the microtubule-nucleating Tub4p (gamma-tubulin) complex
YGP1/YNL160W	Cell wall-related secretory glycoprotein
TOF1/YNL273W	Subunit of a replication-pausing checkpoint complex (Tof1p-Mrc1p-Csm3p)
NRM1/YNR009W	The name is reserved with SGD according to the Gene Naming Guidelines
ESC8/YOL017W	Protein involved in telomeric and mating-type locus silencing
MPD2/YOL088C	Member of the protein disulfide isomerase (PDI) family, exhibits chaperone Activity
IZH4/YOL101C	Membrane protein involved in zinc metabolism
YOL114C	Hypothetical protein
HST3/YOR025W	Member of the Sir2 family of NAD(+)-dependent protein deacetylases
RSB1/YOR049C	Suppressor of sphingoid long chain base (LCB) sensitivity of an LCB- lyase Mutation
YOR052C	Hypothetical protein
CDC21/YOR074C	Thymidylate synthase
YOR129C	Putative component of the outer plaque of the spindle pole body
MSB1/ YOR188W	Protein involved in positive regulation of both 1,3-beta-glucan synthesis and the Pkc1p-MAPK pathway, potential Cdc28p substrate
PMT3/ YOR321W	Protein O-mannosyltransferase

HSP33/ YOR391C	Possible chaperone and cysteine protease
EEB1/YPL095C	The name is reserved with SGD according to the Gene Naming Guidelines
HOS3/YPL116W	Trichostatin A-insensitive homodimeric histone deacetylase (HDAC) with specificity in vitro for histones H3, H4, H2A, and H2B
SPC29/YPL124W	Inner plaque spindle pole body (SPB) component
IPL1/YPL209C	Aurora kinase involved in regulating kinetochore-microtubule attachments
BBP1/YPL255W	Protein required for the spindle pole body (SPB) duplication
YPR013C	Hypothetical protein
RLF2/YPR018W	Largest subunit (p90) of the Chromatin Assembly Complex
CLB2/YPR119W	B-type cyclin involved in cell cycle progression; activates Cdc28p to promote the transition from G2 to M phase; accumulates during G2 and M
CLB5/YPR120C	B-type cyclin involved in DNA replication during S phase ; activates Cdc28p to promote initiation of DNA synthesis
ASH1/YKL185W	Zinc-finger inhibitor of HO transcription

The gene list of some metabolic genes of metabolic effect

TPS1/YBR126C	Trehalose-6-Phosphat-Synthase
TPS2/YDR074W	Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase
FBP1/YLR377C	Fructose-1,6-Bisphosphatase
FBP26/YJL155C	Fructose-2,6-Bisphosphatase;
NTH1/YDR001C	Fructose-2,6-Bisphosphatase
GPH1/YPR160W	Glycogen-Phosphorylase
GDB1/YPR184W	Glycogen debranching enzyme;
PFK2/YMR205C	β - subunit of 6-Phosphofruktokinase
PFK26/YIL107C	6-Phosphofruktose-2-kinase
GSY2/YLR258W	Glycogen-Synthase
CYR1/YJL005W	Adenylate Cyclase;
PFK1/YGR240C	Alpha-subunit of 6-Phosphofruktokinase
TPK1/YJL164C	Putative cAMP dependent protein kinase catalytic subunit
TPK2/YPL203W	cAMP dependent protein kinase catalytic subunit
TPK3/YKL166C	cAMP dependent protein kinase catalytic subunit
PGM2/YMR105C	Phosphoglucomutase
ATH1/YPR026W	Trehalase acid
PDA1/YER178W	Alpha-subunit of Pyruvate-Dehydrogenase
PDB1/YBR221C	Beta-subunit of Pyruvate-Dehydrogenase
ADH1/YOL086C	Alkohol-Dehydrogenase I
ADH2/YMR303C	Alkohol-Dehydrogenase II
ACO1/YLR304C	Aconitase
MDH1/YKL085W	Malat-Dehydrogenase
HXT1/YHR094C	low-affinity Glucose-Transporter
HXT2/YMR011W	high-affinity Glucose-Transporter
HXT3/YDR345C	low-affinity Glucose-Transporter
HXT4/YHR092C	high-affinity Glucose-Transporter
HXT5/YHR096C	Hexosetransporter with moderate affinity to glucose
HXT6/YDR343C	high-affinity Glucose-Transporter
HXT7/YDR342C	high-affinity Glucose-Transporter
HXT8/YJL214W	Hexose-Permease
HXT9/YJL219W	Hexose-Permease
HXT10/YFL011W	high-affinity Hexose-Transporter
HXT11/YOL156W	Glucose-Permease
HXT12/YIL170W	Putative hexose permease
HXT13/YEL069C	high-affinity Hexose-Transporter

HXT14/YNL318C	Genprodukt: Hexosetransporter
HXT15/YDL245C	Genprodukt: Hexosetransporter
HXT16/YJR158W	Genprodukt: Hexosepermease
HXT17/YNR072W	Genprodukt: Hexosetransporter
HXK1/YFR053C	Hexokinase 1; = Hexokinase A;
HXK2/YGL253W	Hexokinase 2; = Hexokinase B;
GLK1/YCL040W	Glucokinase
RGT2/YDL138W	low-affinity Glucose-receptor
SNF3/YDL194W	high-affinity Glucose-Sensor
GAL2/YLR081W	Galactose-Permease
PDE2/YOR360C	high-affinity cAMP Phosphodiesterase;
PDE1/YGL248W	3'5'-Cyclic-nucleotid Phosphodiesterase, low affinity
SCH9/YHR205W	Homolog of cAMP-dependent Proteinkinase
Housekeeping genes	
	Cytochrome c oxidase
	Actin
	RNA Polymerase

Tabelle 10-3: Genliste und Ergebnisse des Apoptose Chip der Ratjadon behandelten Zellen nach 24 und 48 Stunden

geneID	Ratio 24 h	Ratio 48 h
CR_2A	-1,6	2,3
SALT	1,8	-2,0
Herring_Sperm_DNA	1,8	1,5
CYPA	1,2	-1,6
GAPD	1,7	1,1
HPRT	1,6	-2,6
BCL2	-1,5	-13,2
STAT6	-1,5	-1,3
HSPC263	3,2	-2,1
IL1B	5,0	1,2
NFKB2	1,7	1,8
SNX6	-1,1	1,5
TNFR1	4,5	1,4
BRCA1	-1092,0	-245,0
WSB-1	-1,0	1,7
MLT	-2,2	-1,7
IL2	-11,1	626,0
NFKB3	-3,3	-2,6
TIRAP	-2,3	-3320,0
BAX	-1,1	-1,1
BAFF	-829,0	-1,3
WSB-2	-1,8	1,1
NALP14	-3,9	-2,0
TNF	-1050,0	18,3

SSB22	1,1	10,4
TRAM	7,1	-5,6
IAP2_1	1,4	-1,3
P73_1	1,4	3,9
MYCL1	1,9	2,1
NALP6	-1,7	-30,1
APRIL	-10,7	-4285,0
SOCS3	-2,7	-4798,0
1110065D03RIK	-3,7	-3600,0
MAPK14	-2,5	1,0
EDA	-1,2	-1,1
HSF1	-6,7	1,2
RASSF1	-1,1	1,6
BCL2L1	1,1	6,1
STAT3	-1,7	3,3
GEM	-1,6	-7,7
MAPK11	-1,1	-1,6
TRAIL	-2,0	1,8
IL18R1	1,9	7,2
RASSF3	-2,4	1,6
TRAIN	-494,0	1,9
STAT4	-4,0	5,9
KB-RAS1	-116,0	-188,0
TNFB	1,0	-2,2
DDR3	-13,5	-1,7
ILR18RAP	-1,4	-2,2
TNFAIP3	-1500,0	-396,0
BRCA2	-562,0	4,4
HSF2	-595,0	2,9
KRAS2A-KRAS2B	-1,8	-2,5
BAG-1	-1,1	-1,3
TNFSF12	-1,1	-1,4
UNC5H1	-785,0	3,1
IAP1	-2,4	-1,4
SERPINH1-SERPINH2	-2,2	-1,0
PGLYRP	-2,5	-2,7
BAG-3	-3,0	-1,2
ASM	-1,0	1,6
TLR4.	-1,5	4,7
ABCF1	-3,8	1,7
BCL10	-11,5	-1,3
OP4	-538,0	-1285,0
PGRP-L	-935,0	-1,2
SODD	-1,2	-1,3
CCNE1	-2,5	-1,7
TLR7	-2,2	-3,8
PNAS-5	-3,0	-5,2
DUMMY	1,2	1,1
TLR1	-2,4	-1630,0

RAD	-1241,0	-1,3
CREL	-2,2	3,1
MAPK4	-4,6	-1,2
TRAF2	-2,2	29,4
SH3GLB1	-1,6	-1,2
TNFSF6	-2,9	24,7
TLR5	-2535,0	-192,0
RAS-Q9BPW5	-14,7	-233,0
KIAA0827	-1,1	-1,2
MAPK12	-2,7	1,9
TRAF3	-1,2	-840,0
KDR_EX4	-1197,0	1,2
CLARP	-13,4	4,0
TLR6	-1,3	2,5
RERG	-348,0	-2024,0
CMYC	-1,0	-1,8
GADD34	-1,2	1,3
TRAF4	-1,0	-1,3
PIGPC1	1,4	5,2
CDKN1A	1,8	19,7
TLR8	-5,9	1,8
RHEB	1,1	1,5
NMYC	1,1	1,8
SMPD2	-5,7	-163,0
TRAF6	-1,4	-1,4
TNFRSF19L	1,0	1,2
CDKN1B	-2,7	1,7
TRAF1	-2,9	3,2
RIT	-8,6	-3,7
TFE3	-2,7	350,0
RAP1A	-1,5	-1,3
RB	-1,1	-2,0
TWEAKR	-1,2	1,3
P53	1,0	-2,2
TRAF5	-2,1	-5,6
TXBP151_3PRIME	1,9	1,5
IL18	1,2	1,2
NRAS	-1,4	1,2
ANT1	1,4	2,6
XEDAR.	-3,3	7,8
IAP4_1	-2,7	-2,2
XIRAPL2	-646,0	-2,0
TXBP151_5PRIME	1,0	4,2
MAPK3	1,2	1,4
RRAS	-1,7	-3,6
YWHAZ	-1,3	-1,1
AAC11	-2,0	1,1
TNFSF11	14,1	-1,9
ATM	1,1	1,7

VTS58635	1,2	-10,2
TNFSF4	1,5	1,3
MAPK8	-3,9	8,5
ALG2	1,2	2,0
BSAC2	-3,6	-2,0
CCND1	-2,4	2,2
MDM2	-2,3	5,7
RAS-AX236079	-9,1	2,8
IL1R2	1,1	3,4
TNFRSF9	-1,2	-1,3
SMAC	-1,4	2,5
KIAA0680	1,8	-2,7
CCND3	-1,7	4,2
MDM4	-2,2	-11,0
4933428L19RIK	-870,0	-535,0
SARP2	1,8	-1,0
TNFSF9	-3,1	-2370,0
RBBP4	1,3	-2,3
PRO2963	-2361,0	4,4
CCNG2	-5,8	241,5
ANT2	1,3	-1,4
ANK1	-5,9	2,0
HSC73	1,1	-1,4
CASP2	-3,9	3,1
RBBP5	-1,6	-2,7
TAIP-2.	-4,0	-135,0
MAPK1	-5,9	3,5
LBP	-2,3	-1,5
BCL2L12	-1,2	-8,8
CISH	-1,1	1,3
CASP6	-1,6	-2,0
RBL2	-1,7	-2,0
AXUD1	-6,3	-1,8
MAPK6	-1,6	2,7
DFFB	1,1	3,6
BCLG	-285,0	81,5
RAR	-1,0	2,2
CASP7	-7,5	245,0
RBQ-1	-1,0	-1,1
ZAP-1	-5,8	-2,1
MAPK7	-1,6	1,4
PAR-4	-2,2	9,9
BOK_HUMAN	-1,6	2,8
SOCS1	1,0	-1,1
CASP8	-4,9	-10,0
TP53BP2	-1,7	-2,3
YWHAH	-1,0	-1,8
PCNA	2,0	1,2
PSMD2	-1,1	2,5

CARD10	-1203,0	-659,0
MNT	-1,5	12,3
CASP9	-371,0	1,8
PIG10	2,0	2048,0
APG5L	1,8	3,5
RRAS2	1,7	7,7
HSP75	1,1	-1,3
CASP14	3,1	-6,6
IL1RAP	1,4	-1,2
TNFRSF8	-1,2	-1,4
TNFIP1	-2,3	-3,6
DAP	1,7	1,7
MAPK9	2,8	-4,3
BNIP3L	4,4	-1,5
CGI-77	-179,0	-8,8
BCL-XL	1,6	1,2
CR1	1,1	1,0
FADD	1,2	1,1
YWHAS	1,4	3,3
GRIM19	1,6	1,3
MAPK10	-7,3	-1,2
GG2-1	-4,0	1,3
CLAN1_2	2,5	-7,1
TDAG	-1,0	-1,1
CASP1	2,2	1,1
DAD1	1,3	1,8
LITAF	1,1	3,7
CASP3	2,5	-1,4
PIG8	2,0	4,3
DEDPRO1	-1,3	-1,4
AGS1	1,1	-1,0
NGFR	1,6	1,3
PTGES	1,9	1,1
MAPK8IP1	-1,7	2,5
TNFSF8	-512,0	-1,4
TIF1B	-1,8	2,1
DIVA	1,1	1,5
CSE1L	-1,2	-2,0
TNFRSF11A	1,2	-1,7
P53R2	-5,7	-1,5
MAPK8IP2	-1,3	-3,1
TNFRSF5	-466,0	-2,9
YWHAB	1,5	-1,6
FLJ22607	2,0	-2,0
MD2	5,8	1,1
RIPK1	3,2	-1,4
GM2A	2,6	1,9
NADE	5,2	7,6
TNFSF5	1212,0	-1,6

RBL1	-5,5	1,1
KIAA1850	-421,0	-1,4
BNIP3	1,4	1,5
BAD	-2,9	-2,6
PIASG	1,0	-2,7
NINJ2	-483,0	5,8
TNFRSF11B	-1,5	3,7
TTRAP	-1,1	-1,6
NALP10	1,3	-11,5
RBBP2	-1,2	1,1
BCL2NEW_1	1,3	-2,7
UNC5C	-1,4	-4,6
NME6	-2,5	-8,0
TNFC	-1,4	-2,9
NPC2	1,3	-1,7
NOP	-1,0	491,5
ALS2CR2	1,6	1,1
BCL2NEW_2	-1,1	2,7
UNC5H2	-2,2	2,8
PDCD2	-1,6	1,4
TNFRSF1B	-1,5	-10,2
P63_FL	3,0	-13,5
NORE1	-1,2	-5,6
TLR2	-2,0	-2,9
BCL2L2	-1,0	1,7
PEA15	-2,8	3,6
PDCD5	1,6	-1,2
LTBR	-1,1	1,9
P63_1	1,1	10,4
NOXA	-2,2	2,7
CCNA2	-2,0	-5,6
BIRC1_HUMAN	-957,0	16,0
ASPP1	-1,3	-8,8
TRADD	-1,3	12,3
P73_NT	-1,8	1,9
PUMA	1,2	-4,4
TNFSF7	1,2	-2,5
GFRA1	1,5	2,1
PDCD4	1,3	3,3
CASP4_HUMAN	1,2	-1,7
P73_2	1,1	4,7
RIG-I.	-1,4	1,2
CD14	-4,7	-1,4
GMFB	-2,6	-1,3
SCOT3	192,0	-787,0
BAK1-BAK2	-2,6	1,7
IAP2_5PRIME.	-1485,0	1,6
TRABID:_(TRABID)_TRABID_PROTEIN.	-902,0	3,3
CCNF_2	1,0	-1,1

GMFG	-1,7	-1,5
SCOT4	-1,6	-15,9
BCL2A1	-1,3	2,0
MDA5	1,1	6,6
PDCD8	-1,1	4,2
KI67	-1,0	-1,6
BAXBETA_HUMAN	-8,7	2,9
GADD45B	2,0	1,4
BID.	1,4	1,0
ST16	1,7	4,3
TIAF1	1,1	2,6
MSP58	-1,0	-1,3
ANKRD3	1,4	1,2
BIK	-2,3	-223,0
BBP	1,4	-1,6
KIAA0185	-1,6	-13,9
TP53BP1	1,3	-2,2
DKFZP434M058	-1,0	-2,3
BCL2L11	-3,0	-1,6
BBPL1	-2,8	1,6
BAFFR	-8,3	-213,0
PESCADILLO	-1,4	2,9
PPM1D	-143,0	3,0
MCL1	-1653,0	5,4
BBPL2	-1,2	2,2
BMF	-1,1	4,3
SARP1	-2,0	-1,1
NAF1	-6,1	6,9
IL1R1	-1,7	2,6
BBPL3	-1,1	1,3
KDR_EX3	-1,0	2,1
SARP3	-1,1	-1,0
KIAA0661	2,0	-1,6
CCNH	1,1	1,4
DAPK1	1,0	-6,0
KIAA1093	1,3	-1,7
NED4	1,2	1,1
RIS	-244,0	-296,0
TNFRSF7	-161,0	1,3
DR6	-1,1	2,0
EFNA1	1,9	1880,0
UVRAG	-137,0	227,0
HRAS1	3,0	5,5
PSMB4	2,0	-1,4
GZMB	-2,4	69,5
		-2,0
YWHAE	1,3	-1,5
ISG15-RIK2900034J1	1,9	5,9
AC15	1,8	4,2

IRAK-M	-771,0	4,0
H17739	-315,0	-62,0
OPN	-1,1	2,1
CIDEA	-457,0	1,2
BARD1	1,1	2,3
IRAK1	-1,4	144,0
KIAA1733	-490,0	-273,0
BAG5	-1,7	1,1
CIDEB	2,5	-1,3
LIG3	-1,4	341,5
IRAK2	-2,0	117,5
MD1	-222,0	-61,0
CCA1	1,1	-1,1
HTRA3	-2,1	112,5
LIG4	-790,0	-83,0
MADD	-929,0	-381,0
MKL1	-1076,0	-1,7
FLASHLIKE	-1,0	-1,3
CEZANNE	-709,0	-108,0
ECT2	-4,8	2,8
MAP3K5	-2257,0	77,0
TAIP-12	-487,0	1,5
NALP1	1,2	-1,2
FLJ20739	-1,4	-2,0
NBS1	-1,4	1,2
MYD88	-557,0	-1,0
YWHAG	1,6	-1,3
FOS_1	-545,0	-2,0
TOLLIP	-257,0	-1,6
PPOL.	-1,5	1,2
NGFR-2	-21,1	1,3
YWHAQ	-1,0	1,1
BIP	1,2	-1,3
BAR	-1,7	1,8
PRF1	-5,3	1,0
P84	-2,7	-1,5
DAP3.	-1,2	-1,5
HSP105	1,7	1,9
AMSH	-758,0	262,5
GRO1_HUMAN	-2,0	-926,0
PEX11B	-3,2	-1,3
NSMAF	-3,0	-3,1
HSPA1A	-1,3	3,9
BNIP1	-9,0	-6,7
HSPCA	2,0	-1,1
PIASX	-2,2	3,6
PRKRIR	161,0	-4,8
HSP70.2	-1,1	1,8
TRIF	4,6	-256,0

MATRIN3	1,6	-1,1
PIDD	-314,0	1,8
REQ	4,9	-2,7
HSPA1L	-224,0	-302,0
TNFAIP6	1,0	-267,0
TACE	1,4	1,6
TACI	-911,0	1,5
TNFAIP2	1,0	-2,0
HSPA4	1,6	1,1
GBTS1	-157,0	-2,0
ANGIOGENIN	1,5	1,1
TLR10_HUMAN	-15,3	-312,0
RSU1	-1,0	15,5
HSPA9	1,2	1,2
KB-RAS2	-5,2	-2,0
CARD4	1,2	1,6
TLR9	-1,8	-2,0
SSECKS	-584,0	130,0
OSP94	1,6	2,0
MRAS	-641,0	-79,0
FAIM	1,4	-1,5
GPCR25	-596,0	1,1
TANK	-2,6	4,7
STCH	-1,8	14,5
RAP1B	1,2	1,4
FLASH	-1,8	-809,0
NOD2	-562,0	1,3
CDKN2A_2_HUMAN	-10,8	-1,6
CDC10	1,0	1,2
RAP2B	-1,2	820,0
CARD8	1,4	-2,0
GFRA2	-273,0	-2,0
SCOT2	1,0	-2,0
HSP84_3PRIME	1,9	-1,4
RAS-BC008065	-175,0	-77,0
ASC	1,4	2,2
ANK2	-133,0	-2,0
SCOTIN	2,4	1,7
ZNF216	1,2	8,8
REM	-2,1	-2,0
FRA1	1,4	351,0
BCL-XS-XL	-10,2	1152,0
ASH2L	-477,0	7,4
BCL3	-1,1	1,3
RIN-ROC2	-2,7	-2,0
JUNB	1,8	1,4
IAP4_2	-1,9	-792,0
CISH6	1,6	125,0
RRP22	171,0	143,0

HSR.1	-522,0	-290,0
DAPK2	-1,8	-626,0
IKBA	2,7	2,1
TEM2	-451,0	3,3
IKBE	1,0	271,0
RALB	-3,0	397,0
ORP150	-1,2	620,0
TBK1	-2,4	409,5
RPS7	1,9	-1,3
REM2	-319,0	-70,0
GRO2_HUMAN	-210,0	-2,0
TNIK	1,4	63,0
IKKA	1,2	1,6
ABIN-2	1,7	761,0
ADPRH	245,0	-2,0
AATK	1,3	-338,0
IKKB	1,3	3,0
ABIN-Q96H32	-4,5	-495,0
ANK3	-764,0	-2,0
NM23-M7	1,1	-4,3
MAP3K14	-7,4	-109,0
JAK2	-1,9	-506,0
APAF1	-1118,0	-540,0
QKI	1,3	1,4
RICK	-11,0	-3,3
NFAT3	1,6	2,3
BNIP2	-54,0	1,0
GPS1	1,6	3,0
BRP44L	4,4	1,6
NFATCB	1,8	1,0
CARD14	-1,3	-2,0
TFAR15	2,0	1,0
CARD6	-3,4	-2,0
SUI1	1,3	-1,2
SSRP1	-5,1	8,3
NFKB1	-2,1	1,2
CARMA	-1050,0	90,0
ASB-1	-3,1	342,0
TRIM29A	-4,4	2,0
RELB	-1,9	-2,2
CASP5_HUMAN	-78,0	-158,0
ASB-2	-13,1	4,4
PQBP-1	-2,3	5,3
SOCS2	1,1	3,2
DEDPRO2	-782,0	-2,0
ASB-3	1,2	2,3
STAT1	-2,0	8,5
DJ298J18.2	-2,6	63,5
ASB-4	-4072,0	115,5

CUGBP2	1,0	126,0
STAT2	-1,4	233,0
EDAR	-1395,0	-2,0
CIS4	1,7	195,0
BIRC6	-925,0	206,0
STAT5B	1,6	1,7
EDARADD	-13,8	-2,0
FIP2	-1,3	3,3
HTRIP	4,8	570,0
FLJ21916	-23,6	-2,0
IKAP	-7,9	3,9
TOPORS	-2,9	257,0
KDR	-4,0	59,5
IKBB	1,4	1,3
HIN1	-850,0	3,3
IKKG	-1,1	6,7
HIP1	1,0	-2,0
JAK3	2,2	2,5
HIP1R	-1,0	-2,0
NFAT1	1,0	127,0
HIPPI	-2,2	-2,0
ACTA2	2,0	-1,1
TUBA_HUMAN	-1,1	-2,5
TUBB1-TUBB5_HUMAN.	1,3	1,9
ST2L	1,7	2,4
TNFRSF6	-1,7	563,0
KIAA0417	-5,8	168,0
STK17B	-4,9	-2,0
MRJ	1,2	1,8
IRAK-4.	326,0	80,5
JAK1	1,4	147,5
DAXX	1,3	524,0
NFATX	-3,3	4,1
2210412K09RIK	-1,1	4,8
CR2B	-2,5	1,7
Cr2C	-692,0	-2,0

Reagentien und Kits

Alle hier aufgeführten Reagenzien und Chemikalien hatten, falls nicht anders aufgeführt, den kommerziell höchsterhältlichen Reinheitsgrad.

Reagenz	Hersteller
Antibiotic-Antimycotic (PSA) Penicillin (10000 U/ml), Streptomycin (10000 µg/ml) und Amphotericin B (25 µg/ml)	Invitrogen Corporation, USA
BioMag-Goat-Anti-Mouse IgG	Qiagen, Hilden
Lipid Concentrate 500X, Chemically Defined	JRHbioscience, England
<i>Newborn calf serum</i>	PAA Laboratories, Österreich
Polyklonaler sekundärer Antikörper gegen Mouse IgG -FITC konjugiert	Acris Antibodys, Hiddenhausen
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinmarker	Fermentas, Litauen
Rapamycin	LC Laboratories, USA
Ribonuclease A	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SynQ (10 x)	CCS, Hamburg
Trypan Blau (0,4%)	Sigma, cell culture, Steinheim

Kit	Hersteller
Mouse-IgG-ELISA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mouse-IgG2b-ELISA	Acris Antibodys, Hiddenhausen

Kulturmedien und Puffer

10 x TGS	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3 nicht nachgestellt
Bindungspuffer für FACS	DMEM, 1 % (w/v) BSA, 2 mM Glutamin, PSA
Bindungspuffer für IgG-Aufreinigung 1	0,02 M NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 8,0
Bindungspuffer für IgG-Aufreinigung 2	3 M NaCl, 1,5 M Glycin/ HCl, pH 9
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (Sigma, Steinheim), (DMEM-Pulver; NaHCO ₃ (3,7 g/l); mit HCl auf pH = 7,2). Das Medium wird vor Gebrauch mit 10 % (v/v) NKS, 2 mM L-Glutamin und PSA versetzt.
Elutionspuffer für IgG-Aufreinigung 1	0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 0,1 M Zitronensäure, pH 3,0
Elutionspuffer für IgG-Aufreinigung 2	0,2 M Glycin/HCl pH 2,5
Farmers Reducer	eine Spatelspitze Kaliumhexacyanoferrat III und eine

Lösung für Gel	Spatelspitze Natriumthiosulfat in 250 ml dest. Wasser
Fixierlösung für Gel	100 ml Essigsäure, 400 ml Ethanol, 200 ml dest. Wasser
PBS	Phosphate Buffered Saline (140 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,2 mM Na ₂ HPO ₄ ; 14,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH = 7,4)
Probenpuffer für SDS-PAGE	20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA (Na-Salz), 5 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau in 90 ml dest. Wasser, vor Verwendung Zusatz von 10 % Mercaptoethanol
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (Sigma, Steinheim), (RPMI-1640-Pulver; NaHCO ₃ (2 g/l); mit HCl auf pH = 7,2). Das Medium wird vor Gebrauch mit 10 % (v/v) SynQ , 2 mM L-Glutamin und PSA oder PSN versetzt.
YSI-Kalibration	0,539 g Li-Lactat, 1 g D-Glucose, 3,5 mg Gentamycinsulfat, 250 ml bidest. Wasser. 24 h vorher ansetzen.
YSI-Puffer	0,147 g Na ₂ H ₂ EDTA·2H ₂ O, 7 mg Gentamycinsulfat, 0,973 g Natriumbenzoat, 1,84 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 7,293 g Na ₂ HPO ₄ , 3,289 g NaCl, 27 mg KCl, 1 l dest. Wasser

Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Integra Biosciences, Tecnomara Deutschland Gmbh, Fernwald
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Cytometer	Epics XL, Beckmann Coulter, Krefeld
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Thermo Schüttler	Eppendorf AG, Hamburg
FACS	Vantage SE, Becton Dickson GmbH, Heidelberg
Gel-Scanner	hp scanjet 3500c, Hewlett Packard, USA

Gelelektrophoreseapparatur	Mighty Small II, Amersham Biosciences, USA
Kryokonservierung	Orion ET-44, MVE Crogenics, USE
Magnetrührer-Heizplatte Typ RCTb	Promega, Mannheim
Neubauerzählkammer, 0,0025 mm ² , 0,1 mm Tiefe	Schott AG, Mainz
Phasenkontrastmikroskop	LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
Plattenlesegerät	Checker® , Hanna Instruments, USA
	Olympus BX 41, Japan;
	Microplate Reader Benchmark, BIO-RAD, München
Spinnerflaschen	Techne, Jahnsdorf
Sterilbank 2F150-II GS	Technoflow, Integra Biosciences, Schweiz
Thermomixer	Thermomixer comfort, eppendorf, Hamburg
Vortex-Mixer	VM-300, Neo-Lab, Heidelberg
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
<i>YSI 2700 select</i>	Yellow Springs Instruments, USA
Zentrifuge	Multifuge 3 s, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg

11. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AP	Acetatproduktionswert
ATP	Adenosintriphosphat
BK	optischer Filter (<u>b</u> lock)
BP	Bandpassfilter
BTM	Biotrockenmasse
c_0	Anfangskonzentration [mol/L]
c_C	Konzentration Kultivierungsreaktor (Biostat C)
c_{GG}	Gleichgewichtskonzentration [mol/L]
c_{max}	maximale Konzentration [mol/L]
c_Q	Konzentration Testreaktor (Biostat Q)
CoA	Coenzym A
CPR	Kohlenstoffproduktionsrate (<u>C</u> arbon <u>P</u> roduction <u>R</u> ate) [mol/L · h]
CSTR	Kontinuierlicher Rührkesselreaktor (<u>C</u> ontinous <u>S</u> tirred <u>T</u> ank <u>R</u> eactor)
D_k	kritische Verdünnungsrate [h^{-1}]
$\Delta\lambda$	Wellenlängenabstand [nm]
ΔRFI	Intervall der relativen Fluoreszenzintensität [units]
DL	dichroitischer Langpassfilter
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EP	Ethanolproduktionswert
f_E	Volumenstrom des eintretenden Gases [L/h]
FAD	Flavinadenindinucleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavinadenindinucleotid (reduzierte Form)
FL	Fluoreszenzsensor
FMN	Flavinmononucleotid (oxidierte Form)
FMNH ₂	Flavinmononucleotid (reduzierte Form)
FS	Vorwärtsstreulicht (<u>F</u> orward <u>S</u> catter)
I	Information
I(t)	Störfunktion
ICP-OES	<u>I</u> nductive <u>c</u> oupled <u>p</u> lasma- <u>o</u> ptical <u>e</u> mission <u>s</u> pectroscopy
λ	Wellenlänge [nm]

MB	Metabolischer Wert
μ	Wachstumskonstante
μ_{\max}	maximale Wachstumskonstante
μ_{Set}	angestrebte Wachstumskonstante
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
OUR	Sauerstoffaufnahme (Oxygen Uptake Rate) [mol/l·h]
P	Wahrscheinlichkeit
PA	Penicillin-Amidase
PLS	Partial least squares
r^2	Bestimmtheitsmaß
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RISP	Realtime Integrating Software Platform
RMSEC	Root mean square error of calibration
RNA	Ribonucleinsäure
RQ	respiratorischer Quotient
[S]	Konzentration des limitierten Substrats
S_F	Glucosekonzentration im Feed
SS	Seitwärtsstreulicht (Side Scatter)
t	Zeit [s], [h]
t_Z	Totzeit des Zulaufs [s]
τ	hydrodynamische Verweilzeit [s]
τ_C	hydrodynamische Verweilzeit im Kultivierungsreaktor (Biostat C) [s]
τ_Q	hydrodynamische Verweilzeit im Testreaktor (Biostat Q) [s]
V_{ges}	Gesamtarbeitsvolumen [L]
V_M	Molvolumen des idealen Gases (22,41 L/mol)
V_R	Arbeitsvolumen [L]
$V_{R,0}$	Arbeitsvolumen bei Kultivierungsbeginn[L]
$Y_{x/s}$	Ausbeute an Biotrockenmasse bezogen auf die Glucose [$g_{\text{Zellen}} / g_{\text{Glucose}}$]

12. Literatur

- AHN C., HWANG M., RAMSAMOOJ P., LEE S., JUNG M.: *Rapamycin induced apoptosis is p53-independent in human prostate carcinoma PC-3 cells*. Int J Oncol 1997, Vol. 11, S. 1115–1118.
- ALBERGHINA L. , B. M. RANZI, D. PORRO, E. MARTEGANI: *Flow Cytometry and Cell Cycle Kinetics in Continuous and Fedbatch Fermentations of Budding Yeast* Biotechnology Progress, 1991, Vol. 7, No. 4, S. 299-304
- ALBERGHINA L. , D. PORRO: *Quantitative Flow Cytometry: Analysis of Protein Distribution in Budding Yeast. A Mini-Review*. Yeast, 1993, Vol. 9, No. 8, S. 815-823
- ALBERTS B. , D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J. D. WATSON: *Molekularbiologie der Zelle* 3. Auflage, VCH, 1997
- ALBERTS, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, WALTER: *Molekulare Biologie der Zelle*. 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- ÁLVAREZ-BARRIENTOS A. , J. ARROYO, R. CANTÓN, C. NOMBELA, M. SÁNCHEZ-PÉREZ: *Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology* Clinical Microbiology Reviews, 2000, Vol. 13, Nr. 2, S. 167-195
- AON M. A. , S. CORTASSA: *Catabolite Repression Mutants of Saccharomyces cerevisiae Show Altered Fermentative Metabolism as Well as Cell Cycle Behavior in Glucose-Limited Chemostat Cultures* Biotechnology and Bioengineering, 1998, Vol. 59, No. 3, S. 203-213
- ARNDT S. : *Schnelle Wirkungsprüfung potentieller Therapeutika auf Proliferation und Stoffwechsel mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen* Diplomarbeit, Universität Hannover, 1998
- AVNI D.J., BIBERMAN Y., MEYUHAS O.: *The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context dependent manner*. Nucl Acids Res 1997, Vol. 25, S. 995–1001.
- BEUSE M. : *Populationsverteilung und Wachstumsmodi bei Saccharomyces cerevisiae in synchronen Chemostatkulturen* Dissertation, Universität Hannover, 1997

- CARLSON C. R. , B. GRALLERT, R. BERNANDER, T. STOKKE, E. BOYE: *Measurement of Nuclear DNA Content in Fission Yeast by Flow Cytometry* Yeast, 1997, Vo. 13, No. 14, S. 1329-1335
- COULTER® EPICS® XL-MCL™ Flow Cytometer, Handbuch-Reference, Miami, Dezember 1998
- DEGELAU A. , R. FREITAG, F. LINZ, C. MIDDENDORF, T. SCHEPER, T. BLEY, S. MÜLLER, P. STOLL, K. F. REARDON: *Immuno- and flow cytometric analytical methods for biotechnological research and process monitoring* Journal of Biotechnology, 1992, Vol. 25, S. 115-144
- ERNST B.: *Fütterungskonzepte zur rekombinanten Produktion von Penicillinamidase in E. coli*, Dissertation, TU Hamburg-Harburg, 2006
- FOX M. H. : *A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions by flow-cytometry* Cytometry, 1980, Vol. 1, S. 71ff.
- HANTELMANN K.: *Nicht-invasive Analysemethoden und multivariate Datenauswertung zur automatisierten Beobachtung und Regelung von Bioprozessen*, Dissertation, Universität Hannover, 2005
- HARRISON J. S. : *The yeasts vol.1 Biology of yeasts*, 2. Aufl., Academic press, London, 1987
- HEATH C., DILWITH R., BELFORT G.: *Methods for increasing monoclonal antibody production in suspension and entrapped cell cultures: biochemical and flow cytometric analysis as a function of medium serum content.* J Biotechnol. 1990, Vol. 15, S. 71-89.
- HUTTER K.-J.: *Zellkinetische Analysen an Hefen und Bakterien mit Hilfe der Flusszytometrie* Monatsschrift für Brauwissenschaft, 1993, Bd. 46, Heft 12, S. 444-450
- JUNG A. : *DNA chip technology* 2002, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 273, S. 41-42
- KLEVECZ R. R. , J. BOLEN, G. FORREST, D. B. MURRAY: *A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle* 2004, PNAS, Vol. 101, No. 5, S. 1200-1205

- KROMENAKER S.J., SRIENC F.: *Stability of producer hybridoma cell lines after cell sorting: a case study*. Biotechnol Prog 1994, Vol. 10, S. 299-307.
- LOCHER G. , U. HAHNEMANN, B. SONNLEITNER, A. FIECHTER: *Automatic bioprocess control. 4. A prototype batch of Saccharomyces cerevisiae* 1993, Journal of Biotechnology, Vol. 29, S. 57-74
- M. JAKUBITH: *Grundoperationen und chemische Reaktionstechnik* Wiley-VCH, Weinheim 1998
- MAROSE S. : *Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie* Dissertation, Universität Hannover, 1999
- MARTEGANI E. , D. PORRO, B. M. RANZI, L. ALBERGHINA: *Involvement of a Cell Size Control Mechanism in the Induction and Maintenance of Oscillations in Continuous Cultures of Budding Yeast*, Biotechnology and Bioengineering, 1990, Vol. 36, S.453-459
- MCKINNEY K.L., DILWITH R., BELFORT G.: *Manipulation of heterogeneous hybridoma cultures for overproduction of monoclonal antibodies*. Biotechnol Prog 1991, Vol. 7, S. 445-454.
- MORGAN S.J., DARLIN D.C.: *Kultur tierischer Zellen*. 1994, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford.
- MÜLLER S. , T. BLEY: *Flow Cytometry* Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, John Wiley & Sons, Inc., 1999, S. 1226-1238
- MÜNCH T. , B. SONNLEITNER, A. FIECHTER: *New insights into the synchronization mechanism with forced synchronous cultures of Saccharomyces cerevisiae* Journal of Biotechnology, 1992, Vol. 24, S.299-314
- MÜNCH T. , B. SONNLEITNER, A. FIECHTER: *The decisive role of the Saccharomyces cerevisiae cell cycle behaviour for dynamic growth characterization* Journal of Biotechnology, 1992 ,Vol. 22, S.329-352
- PARULEKAR S. J. , G. B. SEMONES, M. J. ROLF, J. C. LIEVENSE, H. C. LIM: *Induction and elimination of oscillations in continuous cultures of Sacchararomyces cerevisiae* Biotechnology and Bioengineering, 1986, Vol. 28, S.700-710
- PASSARGE E. : *Taschenatlas der Genetik* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994

- PÉREZ-ORTÍN J. E. , J. GARCÍA-MARTÍNEZ, T. M. ALBEROLA: *DNA Chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts* Journal of Biotechnology, 2002, Vol. 98, S. 227-241
- Pham H. T. B. , G. Larson, S.-O. Enfors: *Growth and Energy Metabolism in Aerobic Fed-Batch Cultures of Saccharomyces cerevisiae: Simulation and Model Verification* Biotechnology and Bioengineering, 1998, Vol. 60, No. 4, S.474-483
- PORRO D. , L. BRAMBILLA, L. ALBERGHINA: *Glucose metabolism and cell size in continous cultures of Saccharomyces cerevisiae* FEMS Microbiological Letters, 2003, Vol. 229, S. 165-171
- PORRO D. , L. BRAMBILLA, L. ALBERGHINA: *Glucose metabolism and cell size in continous cultures of Saccharomyces cerevisiae* FEMS Microbiological Letters, 2003, Vol. 229, S. 165-171
- RAMIREZ, O.T. AND MUTHARASON, R. (): *Cell cycle and growth phase-dependent variation in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures.* Biotechnol. Bioeng. 1990, Vol. 36, S. 839-848
- SAINZ J. , F. PIZARRO, J. R. PÈREZ-CORREA, E. AGOSIN: *Modeling of Yeast Metabolism and Process Dynamics in Batch Fermentation* Biotechnology and Bioengineering, 2003, Vol. 81, No. 7, S.818-828
- SATROUTDINOV A. D. , H. KURIYAMA, H. KOBAYASHI: *Oscillatory metabolism of Saccharomyces cerevisiae in continous cultures* FEMS Micribiology Letters, 1992, Vol. 98, S. 261-268
- SCHWEDER O. : *Einsatzmöglichkeiten der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Online-Analytik von Hefezellkulturen* Diplomarbeit, Universität Hannover, 2001
- SEAMANS T.C. AND HU, W.S.: *Kinetics of growth and antibody production by a hybridoma cell line in a perfusions culture.* J Ferment Bioeng 1990, Vol. 70, S. 241-245
- SEN S., HU W.-S., SRIENC F.: *Flow Cytometric Study of Hybridoma Cell Culture: Correlation Between Cell Surface Fluorescence and IgG Production Rate.* Enzyme Microb Technol 1990, Vol. 12, S. 571-576.
- SONNLEITNER B. , O. KÄPPERLI: *Growth of Saccharomyces cerevisiae is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis* Biotechnology and Bioengineering, 1986, Vol. 28, S.927-937

- SPELLMANN P. T. , G. SHERLOCK, M. Q. ZHANG, V. R. IYER, K. ANDERS, M. B. EISEN, P. O. BROWN, D. BOTSTEIN, B. FUTCHER: Comprehensive Identification of Cell Cycle-regulated Genes of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Microarray Hybridization 1998, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 9. S. 3273-3297
- STÄRK E. : *Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und multivariater Auswerteverfahren* Dissertation, Universität Hannover, 2002
- STRYER L. : *Biochemie* 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1996
- SUZUKI E., OLLIS D.F.: *Cell Cycle Model for Antibody Production Kinetics*. *Biotechnol Bioeng* 1989, Vol. 34, S. 1398-1402.
- WANG S. : *Untersuchungen zum Stoffwechselverhalten der Hefe Saccharomyces cerevisiae DSM 2155 im Rührkesselreaktor und zum Scale-down von Gelöstsauerstoffbedingungen im Airlift-Reaktor* Dissertation, Universität Hannover, 1992
- WinCycle PHOENIX Flow Systems, Handbuch, University of Washington, 1995
- ZAMAMIRI A.-Q. M. , G. BIROL, M. A. HJORTSØ: *Multiple Stable States and Hysteresis in Continuous, Oscillating Cultures of Budding Yeast* *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, Vol. 75, No. 3, S. 305-312
- CAZZALINI O, PERUCCA P, RIVA F, STIVALA LA, BIANCHI L, VANNINI V, DUCOMMUN B, PROSPERI E. *p21CDKN1A does not interfere with loading of PCNA at DNA replication sites, but inhibits subsequent binding of DNA polymerase delta at the G1/S phase transition*. *Cell Cycle*. 2003 Vol. 2 No. 6, S. 596-603.
- LEBLANC H, LAWRENCE D, VARFOLOMEEV E, TOTPAL K, MORLAN J, SCHOW P, FONG S, SCHWALL R, SINICROPI D, ASHKENAZI A *Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax*. *Nat Med*. 2002 Vol. 8 No. 3, S. 274-81.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander Gierse
Geburtsdatum	24.04.1976
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Verheiratet
Kind	Tim Gierse *9.11.2006

Schulbildung

1982-1986	Grundschule Deutsche Schule Brüssel
1986-1996	Gymnasium Deutsche Schule Brüssel, Abschluss Abitur

Studium

1996-2003	Studium der Chemie, Universität Hannover
März 2003	Abschluß Diplom
2003-2006	Doktorand im Institut für Technische Chemie, Universität Hannover

Veröffentlichung:

Surribas A, Geissler D, Gierse A, Scheper T, Hitzmann B, Montesinos JL, Valero F. *State variables monitoring by in situ multi-wavelength fluorescence spectroscopy in heterologous protein production by Pichia pastoris*. J. Biotechnol. 2006 Jul 13;124(2):412-9

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Alexander Gierse

Hannover, den 04.06.2007