

# Prozesse zur Produktion, Aufreinigung und Testung von rekombinanten humanen Zytokinen aus *chinese hamster ovary*-Zellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Claas Haake

geboren am 14. August 1980 in Hannover

(2012)

**Referent** Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover

**Korreferentin** Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Kasper  
Department für Biotechnologie  
Universität für Bodenkultur, Wien

Tag der Promotion: 16. Januar 2012

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden. Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Januar 2012



# I Kurzfassung

Die Forschung in der regenerativen Medizin ist zu großen Teilen abhängig von der Verfügbarkeit hochreiner bioaktiver rekombinanter Zytokine. Deren Produktionsplattformen basieren immer häufiger auf Säugerzellen, da nur diese die Löslichkeit und die korrekte Faltung und post-translationale Modifikation der Proteine sicherstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden rekombinante CHO-Zelllinien, sowie Aufreinigungs- und Testungsverfahren im Labormaßstab zur Produktion von LIF (Leukämie inhibierender Faktor), VEGF<sub>165</sub> (Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor 165) und Dll1Fc (Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von Delta-like 1 und dem Fc-Teil von IgG) erstellt und etabliert.

Die Erstellung der Zelllinien erfolgte dabei mittels verschiedener chemischer Transfektionsverfahren, sowie per lentiviralem Gentransfer. Die lentivirale Transduktion stellte sich dabei als exzellenter Ansatz zur Erzeugung von Produktionszelllinien heraus und ergab deutlich überlegene Ergebnisse im Hinblick auf die Transfektionseffizienz sowie die Stabilität der Expression.

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Gewinnung von stabil hochproduzierenden Subzelllinien. Hierfür wurden Einzelzellklonierungen, sowie FACS-Sortierungen nach verschiedenen Kriterien durchgeführt. Die gewonnenen Subzelllinien wurden anschließend in Bezug auf ihre Produktivität, ihre Stabilität und ihr Kultivierungsverhalten im Vergleich mit ihren Parentalzelllinien analysiert.

Für jedes der Proteine konnte, nach einem umfangreichen Screening, erfolgreich ein jeweils maßgeschneidertes chromatographisches Aufreinigungsverfahren entwickelt und optimiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Entwicklung von zellbasierten Assays zur Testung der biologischen Aktivität von VEGF<sub>165</sub> und LIF. Für VEGF<sub>165</sub> wurden hierfür HUVECs verwendet. Diese wurden nach ihrer Isolierung anhand von Endothelzellmarkern sortiert und anschließend damit ein Proliferationsassay entwickelt. Für LIF basierte der Assay auf seiner Wirkung auf die Proliferation und Pluripotenz von murinen embryonalen Stammzellen. Diese wurde durchflusytometrisch anhand spezifischer Markerproteine untersucht.

Alle drei Proteine konnten erfolgreich aufgereinigt und ihre biologische Aktivität bestätigt werden. LIF wurde zudem auch als lösliches trx-Fusionsprotein in *E.coli* produziert.

Schlagwörter: Proteinproduktion, CHO Zellen, rekombinante Zytokine



## II Abstract

The research in regenerative medicine is heavily depending on the availability of highly purified bioactive recombinant cytokines. Whose production platforms are more and more often based on mammalian cells, since only they are able to assure the solubility and the correct folding and post-translational modifications of the proteins.

Within the scope of this work recombinant CHO cell lines as well as procedures for the purification and testing for the lab-scale production of LIF (leukemia inhibitory factor), VEGF<sub>165</sub> (vascular endothelial growth factor 165) and Dll1Fc (a fusion protein of the extracellular domain of Delta-like 1 and the Fc-part of IgG) were generated and established.

The generation of the cell lines was carried out using different chemical transfection procedures as well as lentiviral gene transfer. Within this context the lentiviral transduction turned out to be an excellent approach to generate production cell lines and achieved significantly superior results in matters of transfection efficiency and expression stability.

A key aspect of the work was the production of stable high producing substrains. For this single cell clonings as well as sortings via FACS by different criteria were utilized. The yielded substrains have afterwards been analyzed in regards to their productivity, their stability and their cultivation behaviour in comparison to the original cell lines.

A tailored chromatographic purification procedure was developed and optimized for each of the proteins through extensive screenings.

Another key aspect of the work lay was the development of cell based assays for the testing of the biological activity of VEGF<sub>165</sub> and LIF. For VEGF<sub>165</sub> HUVECs have been used. After their isolation these were sorted using endothelial cell marker proteins and subsequently used for the development of a proliferation assay. The assay for LIF based on its effects on the proliferation and pluripotency of murine embryonic stem cells, which was analyzed flow cytometrically on the basis of specific marker proteins.

All three proteins were successfully purified and their biological activities were confirmed. In addition LIF was also produced as a soluble trx-fusion protein in *E.coli*.

Key words: protein production, cho cells, recombinant cytokines



### III Abkürzungsverzeichnis

AU	<i>absorbance units</i>
B-CIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
bp	Basenpaare
CaP <sub>i</sub>	Calciumphosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIA	<i>cold incubation assay</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
CTB	Cell Titer Blue(-Assay)
Dll1	<i>Delta-like 1</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
ECD	<i>extracellular domain</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eif3i	<i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EPO	Erythropoetin
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FU	<i>fluorescence units</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HA	Hämagglutinin
HAC	Heparin-Affinitätschromatographie

### III Abkürzungsverzeichnis

---

HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HIV	humanes Immundefizientvirus
His	Histidin
HKG	<i>house keeping gene</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IDA	<i>Iminodiacetic acid</i>
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
INF	Interferon
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
JAK	Januskinase
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
mES-Zellen	murine embryonale Stammzellen
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NPP	Natriumphosphat
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i>
Oct4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
POD	Peroxidase
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
RLU	<i>relative luminescence units</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SSEA-1	<i>Stage Specific Embryonic Antigen 1</i>
SFFV	<i>spleen focus forming virus</i>

---

Stabw	Standardabweichung
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme</i>
TAE	<i>Tris Acetat EDTA</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TCI	Institut für Technische Chemie
TEMED	<i>N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin</i>
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
trx	Thioredoxin
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
yaf2	<i>YY-associated factor 2</i>



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Kurzfassung</b>	<b>v</b>
<b>II</b>	<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Entwicklung rekombinanter Säugerproduktionszelllinien . . . . .	3
2.1.1	Methoden zum nicht-viralen Gentransfer in eukaryotische Zellen . . . . .	4
2.1.1.1	Transfektion per Calciumphosphatpräzipitation . . . . .	5
2.1.1.2	Lipidvermittelte Transfektion . . . . .	7
2.1.2	Viraler Gentransfer in eukaryotische Zellen . . . . .	8
2.1.2.1	Retroviraler Gentransfer . . . . .	9
2.1.2.2	Lentivirale Vektoren . . . . .	10
2.2	Zytokine . . . . .	12
2.2.1	Der vaskuläre Endothelzellwachstumsfaktor . . . . .	13
2.2.2	Der Leukämie inhibierende Faktor . . . . .	14
2.2.2.1	Pluripotenzerhaltende Eigenschaften und Einsatz in der Stammzellkultivierung . . . . .	15
2.2.3	Der Notch-Signalweg . . . . .	16
2.2.3.1	Der Ligand Delta-like 1 und seine Rolle bei der Angiogenese und der postnatalen Arteriogenese . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Das Dll1Fc-Fusionsprotein</b>	<b>21</b>
3.1	Erstellung der Zelllinien . . . . .	21
3.1.1	Amplifikation des Vektors . . . . .	22
3.1.2	Transfektion per Lipofektion . . . . .	23
3.1.3	Transfektion per Calciumphosphatpräzipitation . . . . .	24
3.2	Lokalisierungs- und Expressionsnachweise . . . . .	24
3.3	Selektion von Hochproduzenten . . . . .	27
3.3.1	Einzelzellklonierung . . . . .	28
3.3.2	Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität . . . . .	28
3.3.3	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens . . . . .	30
3.4	Aufreinigung . . . . .	32

3.5	Aktivitätstestung . . . . .	34
3.6	Expressionsstabilität . . . . .	35
3.7	Zusammenfassung . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)</b>	<b>39</b>
4.1	Lokalisierungs- und Expressionsnachweise . . . . .	39
4.1.1	Intrazelluläres VEGF <sub>165</sub> . . . . .	39
4.1.2	Extrazelluläres VEGF <sub>165</sub> . . . . .	44
4.1.3	Quantitative Echtzeit-PCR . . . . .	46
4.2	Selektion von Hochproduzenten und Expressionsstabilität . . . . .	48
4.2.1	Extrazelluläres VEGF <sub>165</sub> . . . . .	48
4.2.2	Intrazelluläres VEGF <sub>165</sub> . . . . .	53
4.3	Aufreinigung . . . . .	54
4.3.1	Intrazelluläres VEGF <sub>165</sub> . . . . .	54
4.3.2	Extrazelluläres VEGF <sub>165</sub> . . . . .	56
4.4	Aktivitätstestung . . . . .	57
4.4.1	Entwicklung des Aktivitätstestes . . . . .	58
4.4.2	Primärzellisolation . . . . .	60
4.4.3	Aktivitätstestung des aufgereinigten VEGF <sub>165</sub> . . . . .	63
4.5	Zusammenfassung . . . . .	64
<b>5</b>	<b>Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)</b>	<b>67</b>
5.1	Vorarbeiten . . . . .	67
5.2	Aufreinigung . . . . .	69
5.3	Produktion im Reaktormaßstab . . . . .	72
5.4	Produktion in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	73
5.4.1	Kultivierung und Aufschluss . . . . .	73
5.4.2	Aufreinigung . . . . .	74
5.5	Aktivitätstestung von eukaryotischem und prokaryotischem LIF . . . . .	76
5.5.1	Effekte auf murine embryonale Stammzellen . . . . .	76
5.5.2	Effekte auf murine induzierte pluripotente Stammzellen . . . . .	79
5.5.3	Effekte auf adhärente murine embryonale Stammzellen . . . . .	81
5.6	Zusammenfassung . . . . .	83
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>85</b>
<b>A</b>	<b>Übersicht über die im Rahmen der Arbeit erstellten Zelllinien</b>	<b>89</b>
<b>B</b>	<b>Materialien</b>	<b>91</b>
B.1	Verbrauchsmaterialien . . . . .	91
B.2	Geräte . . . . .	91
B.3	Chemikalien . . . . .	93
B.4	Biomoleküle, Kits und Fertigmedien . . . . .	95

B.4.1	Antikörper . . . . .	95
B.4.2	Primer . . . . .	96
B.5	Puffer und Lösungen . . . . .	96
B.6	Medien . . . . .	98
B.7	Software . . . . .	99
B.8	Bakterienstämme und Zelllinien . . . . .	100
B.8.1	Bakterienstämme . . . . .	100
B.8.2	Zelllinien . . . . .	100
<b>C</b>	<b>Methoden</b>	<b>101</b>
C.1	Zellkulturmethoden . . . . .	101
C.1.1	Kultivierung von CHO-Zellen . . . . .	101
C.1.1.1	Kultivierung im Bioreaktor . . . . .	101
C.1.1.2	Kryokonservierung . . . . .	101
C.1.1.3	Revitalisierung . . . . .	102
C.1.2	Kultivierung von HEK293T-Zellen . . . . .	102
C.1.3	Kultivierung von mES- und miPS-Zellen . . . . .	102
C.1.4	Kultivierung von HUVE-Zellen . . . . .	103
C.1.5	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität . . . . .	103
C.1.6	MTT-Test . . . . .	104
C.1.7	BrdU-Inkorporationsassay . . . . .	104
C.1.8	Ez4U-Proliferationsassay . . . . .	105
C.1.9	Cell Titer Blue-Assay . . . . .	105
C.1.10	Primärzellisolation von Nabelschnurendothelzellen . . . . .	105
C.1.11	Lipofektion mit dem FuGene6-Kit . . . . .	106
C.1.12	Lipofektion mit dem TurboFect-Transfektionsreagenz . . . . .	107
C.1.13	Calciumphosphatpräzipitation von CHO-Zellen . . . . .	107
C.1.13.1	Protokoll I, adaptiert nach AG Schambach . . . . .	107
C.1.13.2	Protokoll II, adaptiert nach AG Flemington . . . . .	107
C.1.14	Calciumphosphatpräzipitation von HEK293T-Zellen . . . . .	107
C.1.15	Einzelzellklonierung per Verdünnungsmethode . . . . .	108
C.1.16	Zellaufschluss mittels Ultraschall . . . . .	108
C.2	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	110
C.2.1	TCA-Fällung . . . . .	110
C.2.2	Bradford-Assay . . . . .	110
C.2.3	BCA-Assay . . . . .	110
C.2.4	Densitometrie . . . . .	111
C.2.5	SDS-PAGE . . . . .	111
C.2.5.1	Silberfärbung . . . . .	111
C.2.5.2	Coomassie-Färbung . . . . .	112
C.2.6	Western Blot . . . . .	112
C.2.7	Vorbereitung der Zellkulturüberstände für die FPLC . . . . .	113

C.3	Mikrobiologische Methoden . . . . .	114
C.3.1	Bakterientransformation . . . . .	114
C.3.2	Kultivierung von <i>E.coli</i> zur Vektoramplifikation . . . . .	114
C.3.3	Kultivierung und Aufschluss von <i>E.coli</i> zur Expression des <i>trx-his-tev-hLIF</i> -Fusionsproteins . . . . .	114
C.4	Durchflusszytometrische Methoden . . . . .	116
C.4.1	Sortierung per FACS . . . . .	116
C.4.1.1	Sortierung CD31-positiver Zellen . . . . .	116
C.4.1.2	Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität . . . . .	116
C.4.2	Einzelzellklonierung per FACS . . . . .	117
C.4.3	Intrazelluläre Färbung des Zielproteins . . . . .	117
C.4.4	Messung der Expressionsstärke des Endothelzellmarkers CD31 . . . . .	117
C.4.5	Messung der Expressionsstärke des Pluripotenzmarkers SSEA-1 . . . . .	118
C.4.6	Apoptoseassay . . . . .	118
C.5	Molekularbiologische Methoden . . . . .	119
C.5.1	RNA-Isolierung . . . . .	119
C.5.2	cDNA-Synthese für die PCR . . . . .	119
C.5.3	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	119
C.5.4	Agarosegel-Elektrophorese . . . . .	120
C.5.5	Plasmidpräparation . . . . .	120
C.5.6	Quantitative Echtzeit-PCR . . . . .	121
C.6	Chromatographische Methoden . . . . .	124
C.6.1	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie . . . . .	124
C.6.1.1	Screening nach zu verwendender Metallsalzlösung für die präparative Aufreinigung mit <i>8-strip-columns</i> . . . . .	124
C.6.1.2	Vorbereitung der IDA75-Membranadsorber . . . . .	125
C.6.1.3	Aufreinigung des extrazellulären VEGF <sub>165</sub> . . . . .	125
C.6.1.4	Aufreinigung von LIF aus CHO-Zellen . . . . .	126
C.6.1.5	Aufreinigung von LIF aus <i>E.coli</i> . . . . .	126
C.6.2	Heparin-Affinitätschromatographie . . . . .	127
C.6.2.1	Aufreinigung von extrazellulärem VEGF <sub>165</sub> und CHO-LIF . . . . .	127
C.6.3	Protein G- und A-Affinitätschromatographie . . . . .	127
C.6.3.1	Aufreinigung des Dll1Fc-Fusionsproteins . . . . .	128
C.6.4	Größenausschlusschromatographie . . . . .	128
C.6.4.1	Aufreinigung von LIF aus CHO-Zellen . . . . .	128
C.6.5	Ionenaustauschchromatographie . . . . .	128
C.6.5.1	Aufreinigung von LIF aus CHO-Zellen . . . . .	129
C.6.6	Aufreinigung des intrazellulären VEGF <sub>165</sub> mit <i>magnetic beads</i> . . . . .	129
<b>D</b>	<b>Ergänzende Ergebnisse</b>	<b>131</b>
D.1	Optimierung der IMAC-Aufreinigung von intrazellulärem VEGF <sub>165</sub> mit <i>8-strip-columns</i> . . . . .	131

D.1.1	Optimierung der verwendeten Metallsalzlösung . . . . .	131
D.1.2	Optimierung des verwendeten Elutionspuffers . . . . .	131
D.1.3	Optimierung bezüglich Waschschrift und Molarität der Metallsalzlösung .	133
D.2	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der LIF-hochproduzierenden Einzelzellklone . . . . .	135
<b>E</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>137</b>
<b>F</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>141</b>
<b>G</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>143</b>
<b>H</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>165</b>
<b>I</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>167</b>
<b>J</b>	<b>Danksagung</b>	<b>169</b>

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Forschung in der regenerativen Medizin ist zu großen Teilen abhängig von der Verfügbarkeit hochreiner rekombinanter Proteine. Die Produktionsplattformen für rekombinante Proteine basieren in der Regel auf der Expression in Bakterien, Hefen, Insekten- oder Säugerzellen. Die Nutzung von Bakterien ermöglicht eine einfache, schnelle und kostengünstige Produktion der jeweiligen Zielproteine. Jedoch leiden eukaryotische Proteine, die in Prokaryoten exprimiert worden sind häufig unter schlechter Löslichkeit, woraus Aggregation oder fehlerhafte Faltung resultiert, oder ihnen fehlen nötige post-translationale Modifikationen, welche für die biologische Aktivität notwendig sind [1][2]. Hefe-basierte Expressionssysteme bieten Vorteile gegenüber Bakterien in Bezug auf die Ausbeute, die Komplexität der exprimierten Proteine und der Fähigkeit von Hefen einige post-translationale Modifikationen durchführen zu können [3][4]. Expressionssysteme die Insektenzellen verwenden, können zur Produktion komplexer rekombinanter Proteine eingesetzt werden. Ihre Etablierung ist jedoch häufig sehr aufwendig und die korrekte Glykosilierung mit komplexen N-Glykanen, welche Galaktose- und/oder Sialinsäurereste enthalten ist problematisch [5][6]. Aus diesen Gründen werden die meisten Proteine für die biomedizinische Verwendung in Säugerzellen produziert. Etwa 70% der kommerziell produzierten rekombinanten Proteine werden in *chinese hamster ovary*-Zellen (CHO) exprimiert [7].

Im Rahmen des Exzellenzclusters Rebirth (*From Regenerative Biology to Reconstructive Medicine*) sollen in dieser Arbeit Prozesse zur Produktion, Aufreinigung und Testung rekombinanter humaner Zytokine erarbeitet werden, um hochreine, biologisch aktive Proteine im Labormaßstab produzieren zu können, die dann anderen Arbeitsgruppen für ihre Forschungen zur Verfügung gestellt werden können. Die Zielproteine in dieser Arbeit sind ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne (ECD) des Liganden Delta-like 1 (Dll1) und dem Fc-Teil von humanem Immunglobulin G1 (IgG1), der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>) und der Leukämie inhibierende Faktor (LIF).

LIF fördert die Proliferation und verhindert die Ausdifferenzierung von murinen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen [8], wodurch es bei der Kultivierung dieser Zellen zu einem notwendigen Medienbestandteil wird. Murine embryonale Stammzellen werden als Modellsystem für humane embryonale Stammzellen verwendet, deren Kultivierung in Deutschland nur eingeschränkt erlaubt und stark reguliert ist.

VEGF<sub>165</sub> wirkt proliferationsfördernd auf Endothelzellen und somit positiv auf die Bildung und das Wachstum von Blutgefäßen [9]. Eingesetzt wird es als Medienbestandteil bei der Kultivierung verschiedener Endothelzellen. Es ist aber auch selber Gegenstand von Untersuchung z.B.

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

---

bezüglich seiner Rolle bei der Angiogenese, welche ein wichtiger Prozess beim Wachstum und der Metastase von Tumoren ist [10][11].

Das Dll1Fc-Fusionsprotein ist ein Konstrukt, das es ermöglicht die extrazelluläre Domäne des Liganden Dll1 zu immobilisieren um somit seine Rolle bei der der Angiogenese und der post-natalen Arteriogenese zu untersuchen.

Alle drei Proteine sollen in Säugerzellen produziert werden. Bei der Expression des Fusionsproteins ist es nötig, dass die DNA gespleißt wird, was nur in Eukaryoten möglich ist. Bei LIF und VEGF<sub>165</sub> handelt es sich um Glykoproteine, daher muss bei ihrer Produktion ein Apparat zur post-translationalen Modifizierung vorhanden sein. Für die Erstellung der Zelllinien sollen sowohl chemische Transfektionsmethoden, als auch, in Zusammenarbeit mit einer anderen Rebirth-Arbeitsgruppe, die Transduktion mittels Lentiviren erprobt werden. Bei der Erarbeitung der Produktionsprozesse soll nach der Bestätigung der Expression und Sezernierung ein Schwerpunkt auf die Erzeugung hochproduzierender Subzelllinien gelegt werden. Um dies zu erleichtern wird in einige der Vektorkonstrukte das Gen für das *green fluorescent protein* (GFP) eingefügt, dessen Expressionsstärke als ein Maß für die Produktivität herangezogen werden kann [12]. Die Erarbeitung und Optimierung von maßgeschneiderten Aufreinigungsstrategien soll dadurch erleichtert werden, dass VEGF<sub>165</sub> und LIF mit Tags exprimiert werden, da für sie keine spezifischen affinitätschromatographischen Methoden existieren. Um die biologische Aktivität der aufgereinigten Proteine zu bestätigen, müssen zudem Aktivitätsassays etabliert und durchgeführt werden. Abschließend sollen die bei der Erarbeitung der Produktionsprozesse gewonnenen Erkenntnisse auf ihre Übertragbarkeit hin diskutiert werden, um abschätzen zu können, in wie weit sich diese zur Erstellung einer allgemeinen Plattform für weitere Produktionsprozesse rekombinanter Proteine im Labormaßstab einsetzen lassen.

## 2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen für die durchgeführten Arbeiten dargestellt. Zunächst gilt es das allgemeine Vorgehen zur Erstellung rekombinanter Säugerproduktionszellen zu erläutern um dann speziell die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zum Gentransfer zu beschreiben. Der zweite Teil dieses Kapitels ist den zu produzierenden Zytokine gewidmet. Für LIF wird dabei speziell auf seine pluripotenzerhaltenden Eigenschaften eingegangen. Es ist ein vielfach genutzter Medienzusatz bei Stammzellkultivierung. Im Dll1Fc-Abschnitt wird besonders die Rolle des Dll1-Liganden bei der Angiogenese und postnatalen Arteriogenese erläutert. Da die zahlreichen Einsatzgebiete des VEGF<sub>165</sub> den Rahmen dieses Kapitels überschreiten würden, wird nur eine allgemeine Darstellung seiner Eigenschaften gegeben.

### 2.1 Entwicklung rekombinanter Säugerproduktionszelllinien

Der erste Schritt bei der Entwicklung einer Säugerproduktionszelllinie ist die Klonierung des ausgewählten Genes (GOI, *gene of interest*) in einen Säugerexpressionsvektor. Zusammen mit einem Selektionsgen, welches sich auf demselben oder einem separaten Vektor befinden kann, wird das GOI in die Zielzellen transferiert. Hierfür zur Verfügung stehende Methoden werden in den Abschnitten 2.1.1 und 2.1.2 näher beschrieben. Zur stabilen Integration des exogenen Gens in ein Chromosom werden die Zellen anschließend selektiven Kultivierungsbedingungen ausgesetzt. Etablierte Selektionsstrategien basieren auf der Komplementierung einer Auxotrophie der Wirtszellen. Die am häufigsten verwendeten Selektionssysteme in CHO-Zellen basieren auf den Genen für Dihydrofolatreduktase (*dhfr*) [13] und Glutamat-Ammonium-Ligase (*gs*) [14]. Eine Alternative zur auxotrophen Selektion ist die Verwendung von Genen, welche Resistenzen gegen Antibiotika wie Geneticinsulfat (G418), Hygromycin B, Bleomycin-Sulfat oder Puromycin vermitteln [15]. Ein deutlicher Vorteil der *dhfr*- und *gs*-Selektionsmethoden ist, dass sie Vervielfachung der integrierten rekombinanten Gene ermöglichen. Dies wird dadurch erreicht, dass die Zellen steigenden Konzentrationen an Inhibitoren der Selektionsproteine ausgesetzt werden. DHFR kann durch den Zusatz von Methotrexat (MTX) [13] und GS durch Methioninsulphoximid (MSX) [14] inhibiert werden. Um unter diesen Bedingungen zu überleben, müssen die Zellen größere Mengen des Selektionsproteins produzieren, was durch Vervielfältigung des Selektionsgens erreicht werden kann, wodurch auch die Kopienzahl des GOI erhöht wird [16][17][18].

Die Zellpopulationen, welche nach der Selektion erhalten werden, sind meist stark heterogen in

## 2 Theoretische Grundlagen

---

Bezug auf das Zellwachstum und die spezifische Produktivität. Um homogene Zellpopulationen zu erhalten, welche die gewünschten Charakteristika aufweisen, müssen zahlreiche Zellen isoliert und individuell evaluiert werden. Dies wird standardmäßig durch Einzelzellklonierung per Verdünnung erreicht, bei welcher die Zellen in Multiwellplatten auf eine Konzentration von einer Zelle pro Ansatz verdünnt werden. Die einzelnen mit diesem Verfahren gewonnenen Klone werden anschließend im Hinblick auf ihre Produktivität analysiert. Die ausgewählten Hochproduzenten werden zusätzlich einem Langzeittest in Bezug auf die rekombinante Expressionsstabilität unterzogen, da eine Abnahme dieser ein häufig beobachtetes Problem bei durch Einzelzellklonierung erzeugten Zelllinien darstellt [19]. Die stabilen Hochproduzenten können anschließend in größerem Maßstab zur Produktion kultiviert werden.

### 2.1.1 Methoden zum nicht-viralen Gentransfer in eukaryotische Zellen

Die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen ist eine zentrale Technik der Biotechnologie und Molekularbiologie. Neben der Erstellung von Produktionszelllinien stellt sie einen kritischen Prozess für *in vivo*-Anwendungen wie die Gentherapie und für die Impfstoff- und Medikamentenentwicklung dar. Das grundsätzliche Problem ist, dass Zellmembranen aufgrund der bipolaren Eigenschaften ihrer Phospholipiddoppelschicht nicht spontan Nukleinsäuren aufnehmen [20]. Daher wurden verschiedene Möglichkeiten entwickelt Nukleinsäuren mit Hilfe mechanischer, chemischer, biologischer oder physikalischer Systeme durch die Membranen zu transportieren.

Methoden, bei denen die Zellmembran mechanisch überwunden wird, sind beispielsweise die Mikroinjektion und der Partikelbeschuss. Die Mikroinjektion ist eine sehr einfache Methode, bei der die Nukleinsäure mittels einer Glaskapillare direkt in die Zelle injiziert wird. Dabei stellt jedoch der geringe Durchsatz eine große Einschränkung dar, da jede Zelle einzeln transfiziert werden muss. Beim Partikelbeschuss wird eine so genannte Genkanone verwendet. Dabei werden Gold- oder Wolframmikropartikel mit Nukleinsäuren beladen und auf hohe Geschwindigkeiten beschleunigt um so Zellmembranen oder Zellwände von Pflanzenzellen durchdringen zu können [21][22].

Eine der am häufigsten angewendeten physikalischen Methoden ist die Elektroporation. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an die Zellsuspension kommt es zu kurzzeitiger Depolarisation der Membran und zur Bildung von Poren, durch welche hydrophile Makromoleküle wie Nukleinsäuren passiv in die Zellen diffundieren können [23].

Die chemischen Transfektionsmethoden umfassen, neben der Calciumphosphatpräzipitation (Abschnitt 2.1.1.1) und dem lipidvermittelten Transfer (Abschnitt 2.1.1.2), unter anderem polymervermittelte Transfermethoden. Hierfür kann zum Beispiel poly-L-Lysin [24] oder Diethylaminoethyl-Dextran [25] verwendet werden. Die genauen Mechanismen, nach denen der Transfer dabei abläuft sind jedoch nicht bekannt. Weitere Polymere, die verwendet werden können, sind Polyethylenimine (PEIs). Diese synthetischen Polymere bilden Komplexe mit hochkondensierter DNA, welche von den Zellen per Endozytose aufgenommen werden können [26].

### 2.1.1.1 Transfektion per Calciumphosphatpräzipitation

Die Calciumphosphatpräzipitation ist, aufgrund ihrer einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit, eine weit verbreitete Methode. Das Prinzip beruht darauf, dass in übersättigten Calciumphosphatlösungen, in denen DNA vorliegt, diese in ausfallendes Calciumphosphat inkorporiert wird. Die entstandenen DNA-Calciumphosphat-Copräzipitate können anschließend von Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Die erreichbare Transfektionseffizienz hängt dabei von zahlreichen unterschiedlichen Parametern ab.

Die Calciumphosphatpräzipitation ist ein dynamischer und reversibler Prozess und die Größe und Struktur des Präzipitates hängen stark von der Durchführung der Mischung der verwendeten Lösungen ab. Zudem kann es schwierig sein die Charakteristika des Präzipitates nach dessen Bildung während des gesamten Transfektionsprozesses konstant zu halten. Diese hängen zum großen Teil von der relativen Übersättigung der Lösung ab, welche wiederum hauptsächlich von den Calcium- und Phosphatkonzentrationen abhängig ist [27][28][29]. Calcium liegt hierbei in großem Überschuss vor, was bedeutet, dass das relative Verhältnis der beiden Ionensorten starken Schwankungen unterliegt. Der pH-Wert verändert die Löslichkeit durch Einfluss auf das Verhältnis zwischen  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  und ist damit ein Schlüsselfaktor der sorgfältig kontrolliert werden muss [30][31][32]. Des Weiteren ist die Löslichkeit abhängig von der DNA-Konzentration [30], der Temperatur [33], sowie Verunreinigungen der DNA und der verwendeten Chemikalien [34]. Nach der Zugabe des Präzipitates zum Medium hängt sein Zustand zusätzlich noch von der Serumkonzentration, der  $\text{CO}_2$ -Sättigung und der Zellaktivität ab. Da für diese komplexen Zusammenhänge kein mathematisches Modell zur Verfügung steht, muss man auf Interpretationen empirischer Experimente zurückgreifen.

Die Größe des Präzipitates wird neben der Calcium- und Phosphatkonzentration und dem pH-Wert von der Temperatur und dem Gehalt an DNA, Serum und  $\text{CO}_2$  beeinflusst. Sie bestimmt die DNA-Bindungs Kapazität und die Anzahl der Partikel pro Zelle und beeinflusst damit die Transfektionseffizienz [30]. Auch wenn die Einflussfaktoren auf die Partikelgröße alle genau kontrolliert werden ist eine hohe Reproduzierbarkeit nicht gegeben, denn auch die Art und Weise in welcher die Calciumchlorid- und die Phosphatlösung gemischt werden hat messbaren Einfluss [35]. Für die Durchführung dieses Schrittes gibt es grundsätzlich unterschiedliche Vorgaben in den Protokollen (tropfenweise zugeben (z.B. bei Shen et al. (1982) [36]) oder schnell mischen (z.B. bei Jordan et al. (1996) [29])). Lösungen und Inkubationszeiten die sich für einen Ansatz eignen, müssen nicht auch zwangsläufig für einen Anderen funktionieren [37].

Die negativ geladene DNA kann physikochemisch direkten Einfluss auf die Formation des Präzipitates nehmen [38]. Die optimale DNA-Konzentration liegt im Bereich von 25  $\mu\text{g DNA/mL}$ , wobei dieses experimentell bestimmte Optimum relativ scharf ist [31][39][40]. Es kann auch *carrier*-DNA eingesetzt werden [27]. Die Vorteile dabei sind, dass der Anteil der Vektor-DNA gesenkt und dass das Expressionslevel auf ein mehr physiologisches Niveau reduziert werden kann [41][42].

Wenn das Präzipitat in das Kulturmedium gegeben wird, kommt es dadurch generell zu ei-

## 2 Theoretische Grundlagen

---

ner Stabilisierung der Partikel [43]. Zudem treten jedoch auch Prozesse auf, durch die sich die Partikel in ihrer Zusammensetzung verändern. Diese sind komplex und beinhalten unter anderem den Austausch von Calciumionen durch andere zweiwertige Ionen aus dem Medium und den Ersatz von Phosphationen durch z.B. Carbonate [44][45]. Diese können sowohl aus dem von den Zellen produzierten  $\text{CO}_2$  als auch aus dem im Medium enthaltenen  $\text{NaHCO}_3$  stammen. Die Carbonatkonzentration ist daher von verschiedenen Faktoren wie dem pH-Wert, der Zelldichte und den Konzentrationen von sauren Verbindungen wie Laktat abhängig, die damit alle indirekt auch die Transfektionseffizienz beeinflussen. Um größere pH-Schwankungen zu vermeiden, wird daher meist ein zusätzlicher Puffer zum Medium zugegeben.

Am Ende der Transfektionsprozedur kann durch Zusatz von Verbindungen wie Glycerol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) ein osmotischer Schock induziert werden [46][47][48]. Dieser fördert bei schwer zu transfizierenden Zelllinien die Expression des Transgens. Der osmotische Schock bewirkt jedoch keine vermehrte Aufnahme von DNA, sondern wirkt auf Zellen, welche schon DNA aufgenommen haben [49]. Er erleichtert der DNA das Überwinden der Kernmembran und verhindert so ihre Degradation durch zytosolische Nukleasen [50][51].

Prinzipielle Unterschiede zwischen adhärennten Zellen in statischer Kultur und Suspensionszellen erfordern entsprechende Angleichung des verwendeten Protokolls. Bei adhärennten Zellen ist eine Mindestpartikelgröße erforderlich, um zu erreichen, dass die Partikel bis auf den Boden der Zellkulturflasche absinken, während zu große Partikel mit einer verminderten Effizienz aufgenommen werden. Das Bedecken der Zellen mit zahlreichen kleinen Partikeln im Gegensatz zu einigen Großen, erhöht zudem die Wahrscheinlichkeit, dass zumindest einer der Partikel von der Zelle auch aufgenommen wird. Bei einer angenommenen Dichte der Plasmidmoleküle von 100-10.000 pro Partikel kann auch schon ein einzelner ausreichend für die Transfektion der entsprechenden Zelle sein [35]. Bei Suspensionszellen, welche kontinuierlich durchmischt werden, spielt das Absinken keine Rolle. Hier dominiert die Affinität der Partikel zu den Zellen. Da Zellen negativ geladen sind, interagieren sie vornehmlich mit positiv geladenen Partikeln, deren Größe diesbezüglich zweitrangig ist.

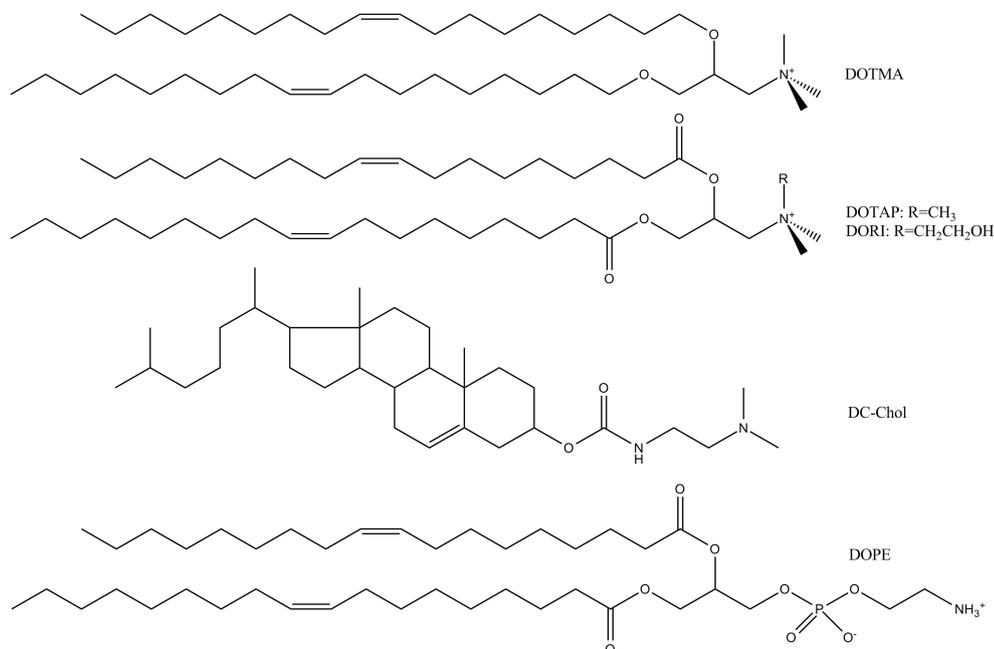
Die höchsten Transfektionseffizienzen lassen sich erreichen, wenn exponentiell wachsende Zellen verwendet werden. Die Zellpopulation in der späten S-Phase des Zellzyklus ist am besten transfizierbar, da so kurz nach der Transfektion die Mitose eingeleitet wird und die DNA so in den Kern gelangen kann [52]. Bei adhärennten Zellen sollte darauf geachtet werden, dass sie subkonfluent sind, damit noch mindestens eine Populationsverdopplung stattfinden kann.

Insgesamt gesehen ist die Transfektion per Calciumphosphat eine komplexe Prozedur, die mehrere Schritte beinhaltet, die nicht direkt kontrolliert werden können und deren molekulare Mechanismen nicht vollständig geklärt sind. Obwohl eine große Bandbreite verschiedener effizienter Transfektionsreagenzien zur Verfügung steht, findet die Calciumphosphatpräzipitation weiter Anwendung. Es ist die einzige Methode, bei der keine Spuren synthetischer Reagenzien in den Zellen oder dem Medium verbleiben. Dies ist ein Vorteil für die Viabilität der Zellen, sowie für die Qualität und Reinheit des Produktes.

### 2.1.1.2 Lipidvermittelte Transfektion

Kationische Lipide sind aufgrund ihrer Ladung und ihres Aufbaus besonders gut geeignet um negativ geladene DNA durch die, ebenfalls negativ geladene Zellmembran zu transportieren. Kationische Lipide bestehen aus einem unpolaren lipophilen Schwanz aus Kohlenwasserstoffketten, einem Lipidanker und einer polaren positiven Kopfgruppe.

Es sind eine Reihe von Lipiden bekannt, welche in diesem Zusammenhang Verwendung finden. Die erste Gruppe hierbei sind monokationische Lipide, die sowohl als Einzelkomponenten als auch in Kombination mit Helferlipiden verwendet werden. Beispiele hierfür sind DOTMA [53], DOTAP [54][55] oder DORI [56]. Zusätzlich können neutrale oder amphiphile Phospholipide, wie Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) als Additive (Helferlipide) mit hinzugegeben werden [56]. DOPE wird z.B. zusammen mit DC-Chol eingesetzt [57]. Die Strukturen dieser Lipide sind in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abbildung 2.1:** Strukturen monokationischer Lipide zum Gentransfer.

Eine Weiterentwicklung sind polykationische Lipide, Lipopolyamine bzw. Lipospermine, welche mehrere positive Ladungen tragen und auf natürlichen DNA-kondensierenden Stoffen basieren. Ein Beispiel hierfür ist das Spermin bzw. seine Vorstufe das Spermidin, welche im Zellkern von Eukaryonten vorkommen [58][59][60]. Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Varianten bezüglich der Reagenzien. Lipide werden mit oder ohne Helferlipide in Mischungen verwendet [56][61][62]. Es ist auch möglich die DNA zu (prä)kondensieren. Hierfür können Peptide [63][64][65], Polypeptide wie Polyethylenimin [58][66][67] oder Protamin [68][69], Transferrin [70] oder Histoproteinen [65][71] eingesetzt werden. Zudem gibt es die Möglichkeit statt Lipiden Dendrimere zur Komplexierung der DNA zu verwenden [67][72].

Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften sind kationische Lipide in der Lage in wässrigem Milieu Liposomen zu bilden, welche aus einer oder mehrerer membranartiger Lipid-

## 2 Theoretische Grundlagen

---

doppelschichten bestehen. Die positiven Kopfgruppen, welche sich auf der Oberfläche des Liposoms befinden, können mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats wechselwirken und so DNA-Lipid-Komplexe (Lipoplexe) bilden [53][73]. Morphologisch entstehen hierbei verschiedenste Typen von Lipoplexen, deren Struktur durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird. Eine typische Struktur ist der sog. „Spaghetti-Meatball“-Komplex, bei welchem kugelförmige Lipid-DNA-Aggregate von fadenförmigen Strukturen umgeben sind [74][75]. Bei Letzteren handelt es sich höchstwahrscheinlich um je einen röhrenförmigen DNA-Faden, welcher von einer Lipidschicht ummantelt ist [76]. Des Weiteren sind multilamellare Komplexe [77][78][79], fadenförmige Strukturen [80][81], honigwabenartige Komplexe aus zylindrischen, DNA-enthaltenden Lipidröhren [82][74] und glockenförmige, eingestülpte Hohlkugelstrukturen nachgewiesen worden. Ein direkter Zusammenhang zwischen der jeweiligen Struktur und der entsprechenden Transfektionseffizienz konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden [83][84].

Für den Mechanismus mit welchem die Lipoplexe von der Zelle aufgenommen werden, gibt es zwei grundsätzliche Möglichkeiten: Endozytose [85][86][87] oder Fusion des Liposoms mit der Zellmembran [53][80]. Viele Studien favorisieren den Mechanismus, nach dem die Lipoplexe endozytotisch aufgenommen werden. Da die entsprechenden Ergebnisse jedoch nicht vollständig eindeutig sind, wird eine Beteiligung von Fusionsprozessen nicht vollständig ausgeschlossen [85][88][89]. Die Lipoplex-enthaltenden Endosomen, welche aus rezeptorvermittelter Aufnahme entstehen, reifen zu späten Endosomen und fusionieren anschließend mit Lysosomen [90][91][92]. Das Austreten der Lipoplexe aus den Endosomen vor deren Verschmelzung mit den Lysosomen wird als kritischer Parameter für die effiziente Freisetzung der Nucleinsäuren ins Zytoplasma betrachtet [93]. In Bezug auf den Eintritt der Plasmid-DNA in den Kern schließlich, konnte nachgewiesen werden, dass in der Mitose befindliche Zellen leichter mit höheren Effizienzen transfizierbar sind, als solche, die sich in der G1- oder G0-Phase befinden [61][94][95].

### 2.1.2 Viraler Gentransfer in eukaryotische Zellen

Diverse verschiedene Viren sind schon verwendet worden, um Expressionsvektoren für Säugerzellensysteme zu erzeugen: Adenoviren [96], Adeno-assoziierte Viren [97], Alphaviren [98], Baculoviren [99], Herpes-simplex-Viren [100] und Retroviren [101].

Bei der Verwendung von Viren als Vektoren werden die Gene, welche für die Replikationsphase ihres Lebenszyklus benötigt werden (nicht-essentiellen Gene) entfernt und eine fremdes GOI eingefügt. Bei der Produktion der Vektoren werden die nicht-essentiellen Gene separat zur Verfügung gestellt, wodurch die resultierenden Viren die Wirtszelle einmalig infizieren, sich danach aber nicht mehr replizieren können (sog. Transduktion). Die dabei verwendete Zelllinie (Packungszelllinie) enthält die nicht-essentiellen Gene entweder im Genom oder auf einem oder mehreren Plasmiden [102].

### 2.1.2.1 Retroviraler Gentransfer

Retroviren sind aus verschiedenen Gründen besonders geeignet für diesen Prozess. Sie sind eine Klasse eingehüllter Viren, deren Genom aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül besteht, von welchem jeweils zwei identische Kopien vorliegen. Das retrovirale Genom hat eine Größe von ungefähr 10 kB und beinhaltet mindestens drei Gene. Das Gen *gag* codiert Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, *pol* codiert Proteasen, reverse Transkriptasen und Integrasen und *env* codiert die Hüllenproteine und enthält Spleißstellen. An beiden Enden des Genoms befinden sich LTR-Einheiten (*long terminal repeats*), die Promotor- und *enhancer*-Regionen, sowie Sequenzen, welche für die Integration benötigt werden, enthalten. Im 5'-Bereich befindet sich zudem eine Sequenz mit der Bezeichnung  $\Psi$ , welche ein Signal für das Verpacken der RNA in die Viruspartikel beinhaltet [102].

Der Replikationszyklus eines Retrovirus beginnt mit der Infektion der Wirtszelle. Glykoproteine auf der Oberfläche des Virus binden an Rezeptoren der Wirtszelle und ermöglichen so die Internalisierung des Virus. In der Wirtszelle wird die Virus-RNA durch eine virale reverse Transkriptase in DNA transkribiert und durch virale Integrasen ins Genom der Wirtszelle integriert. Dadurch können die Proteinbiosynthesemechanismen der Wirtszelle verwendet werden um neue virale Proteine zu exprimieren. Diese assemblieren zu neuen Viren, die aus der Zelle ausgeschleust werden [103].

Retrovirale Vektoren basieren häufig auf dem Moloney Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV), einem amphotrophen Virus, das sowohl murine als auch humane Zellen infizieren kann. Die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* können durch das entsprechende GOI ersetzt und in der Packungszelllinie auf separaten Plasmiden exprimiert werden. Da den nicht-essentiellen Genen die Packsequenz  $\Psi$  fehlt werden sie nicht in die Virionpartikel aufgenommen [104]. Um zu verhindern, dass durch Rekombination wieder replikationsfähige Retroviren entstehen müssen alle homologen Sequenzen zum Vektorrückgrat entfernt und die nicht-essentiellen Gene auf mindestens zwei verschiedenen Transkriptionseinheiten exprimiert werden [105].

Die essentiellen Regionen des Virusgenoms beinhalten die 5'- und 3'-LTR und die Packsequenz  $\Psi$ . Die Expression des Transgens in der Zielzelle kann entweder von Promotor- und *enhancer*-Regionen im 5'-LTR oder durch alternative virale oder zelluläre Promotoren angetrieben werden. Es ist möglich die gesamte *gag*-Sequenz inklusive der stromaufwärts gelegenen Region zu entfernen ohne das die Transgenexpression oder das Verpacken des Virus beeinflusst wird [106]. Die Transgenexpression wird jedoch beeinflusst durch die Position des Transgens, das Startcodon und Abweichungen im 5'-LTR. Die Kapazität eines retroviralen Vektors ist maximal 7,5 kb, was für einige Gene zu wenig ist, selbst wenn cDNA verwendet wird [107].

Die Zellerkennung des Virus durch die Hülle kann manipuliert werden, um Zellen zu transduzieren, welche das Virus normalerweise nicht infizieren würde. Die Bindungsstelle des Hüllenproteins und des zellulären Rezeptors direkt zu verändern, führt jedoch zu Problemen bei der Aufnahme des Viruspartikels [108]. Durch Ersetzen eines Teils des Hüllproteingens durch 150 Codons aus dem Erythropoetin (EPO)-Gen, konnten jedoch zum Beispiel EPO-Rezeptor-

## 2 Theoretische Grundlagen

---

tragende Zellen mit hoher Affinität angesprochen werden [109]. Durch Behandlung der viralen Partikel mit Laktose konnten Zellen angesprochen werden, welche Asialoglykoproteinrezeptoren exprimieren [110]. Viren unterscheiden sich in Bezug auf ihren Tropismus, daher kann man durch Ersetzen der Hüllenproteine durch die eines anderen Virus die Anzahl der möglichen Wirtszellen stark erhöhen (Pseudotypisierung) [111][112][113].

Eine Voraussetzung für die Integration und Expression der retroviralen Gene ist, dass sich die Zielzellen teilen müssen, was bei der Erstellung von Produktionszellen irrelevant ist, aber erhebliche Einschränkungen für die Gentherapie darstellt [114][115]. Eine Schwierigkeit besteht zudem in der dauerhaften Expression der Transgene, da Retroviren durch den Komplementfaktor C1 und den anti- $\alpha$ -Galactosyl-Antikörper, welche beide in humanem Serum vorhanden sind, inaktiviert werden [116][117]. Die Expression wird auch reduziert durch inflammatorische Interferone, wie IFN- $\alpha$  und  $\gamma$ , die auf virale LTRs wirken [118]. Wenn sich das retrovirale Genom in das der Wirtszelle integriert, ist es sehr wahrscheinlich, dass die viralen LTR-Promotoren inaktiviert werden, weshalb alternative Promotoren verwendet werden sollten [119].

### 2.1.2.2 Lentivirale Vektoren

Lentiviren sind eine Untergattung der Retroviren und können sowohl proliferierende als auch nicht-proliferierende Zellen infizieren [120]. Sie sind deutlich komplexer als einfache Retroviren und enthalten sechs zusätzliche Proteine: *tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *nef* und *vif*. Lentivirale Vektoren haben gegenüber retroviralen noch zwei weitere Vorteile: sie können längere DNA-Sequenzen von bis zu 10 kB aufnehmen und ermöglichen Langzeitexpression, da sie das Transgen vorzugsweise in aktive Transkriptionsbereiche des Wirtsgenoms integrieren [121].

Lentiviralen Vektoren basieren häufig auf dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), wobei einige der nicht-essentiellen regulatorischen Gene entfernt werden um die Biosicherheit dieser Methode zu gewährleisten [122][123][124]. Zusätzlich zur Verwendung von nicht-replikationsfähigen Viren, werden selbst-inaktivierende (SIN) Vektoren verwendet. Die Transkription viraler Sequenzen nach der Integration ins Genom der Wirtszelle ist bei diesen nicht möglich. Um dies zu erreichen können zum Beispiel die virale Promotoren aus den 3'-LTRs entfernt werden [125].

Auch die in dieser Arbeit verwendeten transduzierten Zelllinien wurden mit einem modifizierten HI-Virus (HIV-I) erstellt (nach [124][125]):

Für die Produktion der Lentiviren wird als Packungszelllinie HEK293T verwendet. Diese werden mit vier verschiedenen Plasmiden transient transfiziert. Neben dem SIN-Vektor, welcher das GOI trägt, werden drei Helferplasmide verwendet. Diese bestehen jeweils nur aus einem Promoter und einem oder zwei Genen. Das erste Helferplasmid trägt die Gene *gag* und *pol*, das zweite das Gen *rev*, welches für den Transport der viralen RNA ins Cytoplasma der Zelle zuständig ist und das dritte Helferplasmid die Informationen für die Hüllenproteine. Hierbei wurde das HIV-I-*env*-Gen durch ein Gen für Protein G aus dem *Vesicular stomatitis virus* (VSV) ersetzt. VSV-Protein G erkennt ein breites Spektrum an Säugerzellen [126] und ermöglicht so-

## 2.1 Entwicklung rekombinanter Säugerproduktionszelllinien

---

mit einer Transduktion von CHO-Zellen, welche HIV-I nicht infiziert. Der SIN-Vektor enthält als einziger die Packsequenz  $\Psi$ , wodurch nur dieser in die Viren, die zum Transduzieren der CHO-Zellen verwendet werden, gelangt. Neben der Packsequenz und dem GOI (flankiert vom starken SFFV-Promoter (aus dem *spleen focus forming virus*)) enthält der SIN-Vektor eine RRE-Sequenz (*rev response element*), welche mit dem REV-Protein interagiert und den Export der RNA aus dem Kern ermöglicht. In den 3'- und 5'-LTRs befinden sich zudem regulatorische Sequenzen, die in der Packungszelllinie die Transkription der Plasmid-DNA in virale RNA ermöglichen. Um eine höhere Virusproduktion zu ermöglichen, wurde zudem der U3-Promoter von HIV-I auf dem SIN-Vektor durch den stärkeren RSV-Promoter (aus dem Rous-Sarkom-Virus) ersetzt.

### 2.2 Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe löslicher Proteine, welche im Immun- und Nervensystem als humorale Vermittler wirken. Dabei spielen sie hauptsächlich eine Rolle bei der Zellkommunikation und der Regulation von Immunantworten [127]. Die Zytokine lassen sich unterteilen in fünf Untergruppen: Interleukine, Chemokine, Tumor-Nekrose-Faktoren (TNFs), koloniestimulierende Faktoren (CSFs) und Interferone (INFs)

Interferone werden von Zellen als Antwort auf Pathogene oder Tumorzellen exprimiert und freigesetzt werden. Sie ermöglichen die interzelluläre Kommunikation bei der Steuerung der Immunantwort zur Bekämpfung von Pathogenen und Tumoren. Interferone sind benannt nach ihrer Fähigkeit bei der viralen Replikation zu interferieren. Zudem sind sie in der Lage Immunzellen zu aktivieren, die Antigenpräsentation für T-Lymphozyten hochzuregulieren und die Widerstandsfähigkeit von Zellen gegenüber neuen Virusinfektionen zu erhöhen [128].

Interleukine sind nach ihrer Fähigkeit benannt die interzelluläre Kommunikation zwischen Leukozyten zu steuern. Inzwischen ist bekannt, dass verschiedene Körperzellen Interleukine mit verschiedenen Wirkungen produzieren, welche teilweise sehr unterschiedlich sind. So regen einige Wachstum, Reifung und Teilung bestimmter Zellen des Immunsystems an, während andere diese inhibieren [129].

Koloniestimulierende Faktoren sind Glykoproteine, die Rezeptoren auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen binden. Die dadurch aktivierten intrazellulären Signalwege können zu Proliferation und zu einer Ausdifferenzierung in spezielle Blutzellen (hauptsächlich Leukozyten) führen [130].

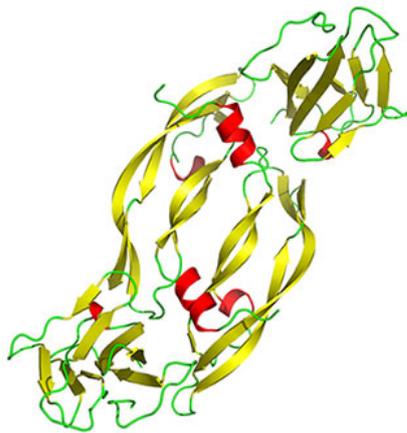
Tumor-Nekrose-Faktoren spielen eine Rolle bei der Entzündung und der sog. Akute-Phase-Reaktion. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulation von Immunzellen, wobei apoptotischer Zelltod induziert, Entzündungen ausgelöst und Tumorgenese und virale Replikation inhibiert werden können [131]. Dysregulation der TNF-Expression wurde in Zusammenhang mit zahlreichen, weit verbreiteten Krankheiten, wie Morbus Alzheimer [132], Krebs [133], Depressionen [134] und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBDs), wie Morbus Crohn [135] gebracht.

Chemokine sind nach ihrer Fähigkeit benannt Chemotaxis auszulösen. Die Mitglieder dieser Zytokinunterfamilie weisen alle ähnliche strukturelle Charakteristika auf. Sie haben eine Größe im Bereich von 8 bis 10 kDa und vier Cysteine-Reste an konservierten Positionen, wodurch sie ihre spezielle dreidimensionale Struktur ausbilden können. Chemokine wirken durch die Aktivierung spezieller G Protein-gekoppelter Rezeptoren, wodurch unter anderem die Migration von inflammatorischen und antiinflammatorischen Zellen ausgelöst wird [136].

### 2.2.1 Der vaskuläre Endothelzellwachstumsfaktor

Die Proteinfamilie der vaskulären Endothelzellwachstumsfaktoren (VEGFs) umfasst sieben verschiedene Formen. Zuerst entdeckt wurde VEGF-A [137], gefolgt von dem Plazentawachstumsfaktor PLGF [138] und VEGF-B [139], dessen Funktion in der Stimulierung der embryonalen Angiogenese liegt, sowie VEGF-C [140] und VEGF-D [141], welche beide eine wichtige Rolle bei der Bildung von Lymphgefäßen spielen. Zuletzt wurden die viralen Homologen mit der Bezeichnung VEGF-E [142] und die im Schlangengift enthaltenen VEGF-F [143] entdeckt.

VEGF-A hat zahlreiche Funktionen. Es induziert die Proliferation von Endothelzellen, fördert die Zellmigration, inhibiert die Apoptose und induziert die Permeabilisierung von Blutgefäßen [144]. Das humane Gen für VEGF-A ist aufgebaut aus acht Exons die durch sieben Introns getrennt werden. Durch alternatives Exon-Splicing können verschiedene Formen von VEGF-A generiert werden, welche nach der Anzahl ihrer Aminosäuren benannt werden. Die Hauptvarianten sind VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> [145][146]. Die stärkste Wirksamkeit hat die Variante VEGF<sub>165</sub> [147]. Diese liegt als antiparalleles Homodimer vor, welches über zwei Disulfidbrücken verknüpft ist (Abbildung 2.2) [148][149]. Das humane Homodimer hat ein Molekulargewicht von 46 kDa [150][151].

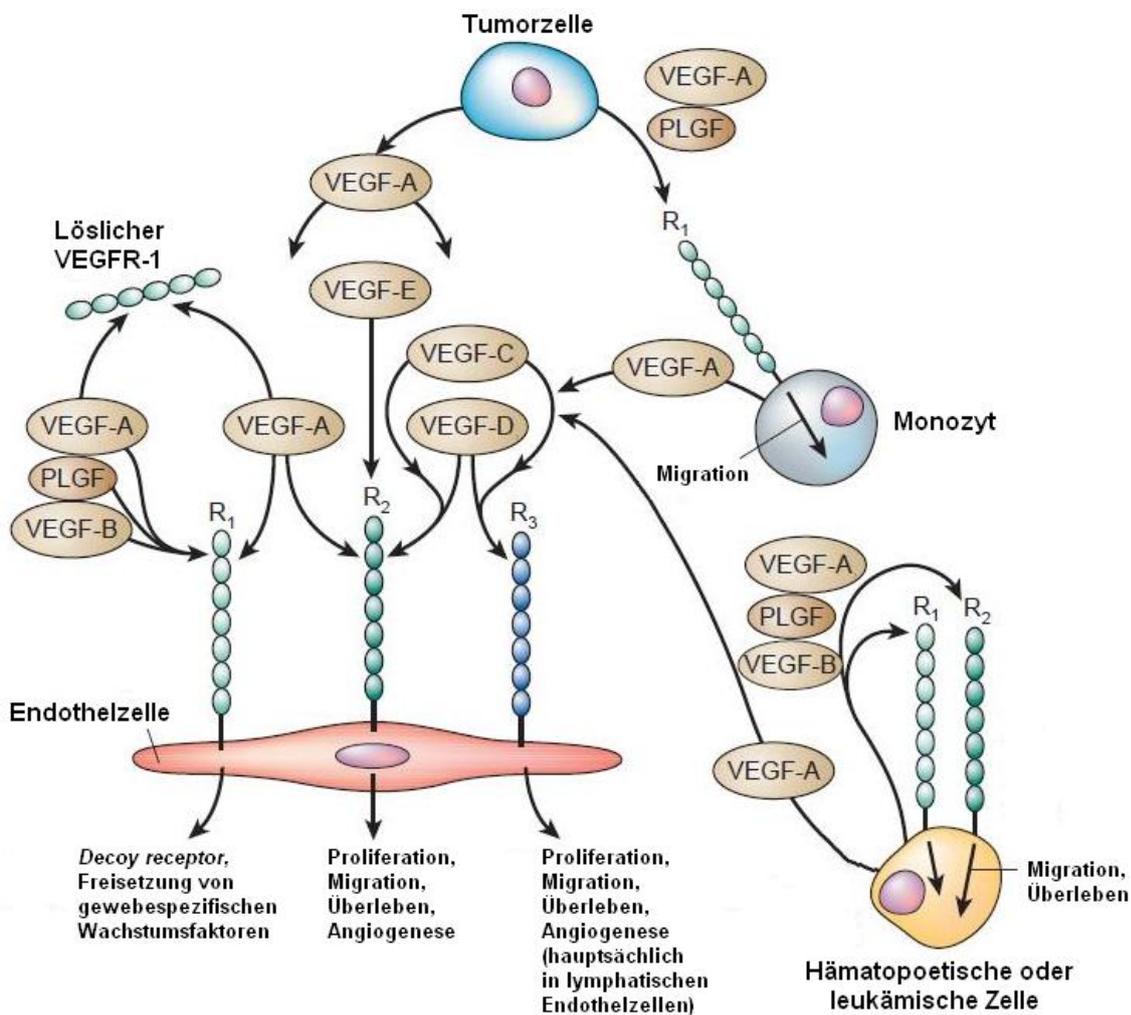


**Abbildung 2.2:** Schematisches Diagramm der Struktur des Homodimers von VEGF<sub>165</sub>. Die zwei Disulfidbrücken sind in rot markiert (aus [152]).

Die biologischen Effekte von VEGF-A werden hauptsächlich durch zwei verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) vermittelt: VEGFR-1 und VEGFR-2, die sich in ihren Signaltransduktionseigenschaften deutlich unterscheiden. Beide Rezeptoren beinhalten sieben Immunoglobulin-ähnliche Domänen in ihrem extrazellulären Teil, eine Transmembranregion und eine Tyrosinkinasekonsensussequenz, unterbrochen durch eine *kinase-insert domain* [153][154]. Beide werden auf der Zelloberfläche der meisten Blutendothelzellen exprimiert und in lymphatischem Gewebe gibt es eine weitere Variante, den VEGF-Rezeptor 3. VEGFR-2 ist der hauptsächliche Vermittler für Mitogenese und Überleben von Endothelzellen, Angiogenese und mikrovaskuläre Permeabilität [155][156]. Im Gegensatz dazu vermittelt VEGFR-1 keine effektive Signale zur Mitogenese von Endothelzellen. Besonders während der frühen embryonalen Entwicklung scheint VEGFR-1 VEGF zu binden, um dessen Interaktion mit VEGFR-2 zu verhindern, also

## 2 Theoretische Grundlagen

um einen inhibierenden Effekt auszuüben [157]. Solch eine Rolle als *decoy receptor* erfüllt wahrscheinlich auch der lösliche VEGFR-1, der eine Spleiß-Variante von VEGFR-1 darstellt [158]. Im vaskulären Endothelium kann die Aktivierung von VEGFR-1 auch zur Freisetzung von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren führen [159]. VEGFR-1, welcher auf der Oberfläche von Monozyten lokalisiert ist, hat als Hauptaufgabe die Vermittlung von Chemotaxis. Diese wird dabei sowohl von VEGF-A als auch von PLGF ausgelöst [160][161][159]. Auf den Oberflächen von Leukämiezellen oder hämatopoetischen Stammzellen kommen beide Arten VEGF-Rezeptoren vor. Hier vermitteln sie, aktiviert durch VEGF-A, -B oder PLGF, Migration und Überleben [162][163]. Einen Überblick über die Rolle der VEGF-Rezeptoren und der sie aktivierenden VEGF-Varianten in Abhängigkeit vom Zelltyp gibt Abbildung 2.3.



**Abbildung 2.3:** Überblick über die Rolle der VEGF-Rezeptoren und der sie aktivierenden VEGF-Varianten (R1: VEGFR-1, R2: VEGFR-2, R3: VEGFR-3) (nach [164]).

### 2.2.2 Der Leukämie inhibierende Faktor

LIF (*Leukimia inhibitory factor*) wurde erstmals 1987 von Gearing et al. [165] beschrieben. Es ist ein Glykoprotein, welches aus 180 Aminosäuren besteht und je nach Glykosilierungsgrad

ein Molekulargewicht zwischen 32 und 62 kDa aufweist [166][167]. Es gehört der Klasse der Interleukin-6-Zytokine an. Diese weisen eine 4-Helix-Bündel-Struktur auf, welche durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird (Abbildung 2.4) [168].



**Abbildung 2.4:** Schematisches Diagramm der Struktur von LIF. Die Polypeptidfaltung ist gefärbt in Regenbogenfarben, von blau am N-Terminus zu rot am C-Terminus. Die drei Disulfidbrücken sind in rot markiert (aus [168]).

Der Name leitet sich von der Wirkung ab die Proliferation von Myeloidzellen zu inhibieren und deren Differenzierung zu Makrophagen zu induzieren [165]. LIF ist ein pleiotropes Zytokin, was bedeutet, dass es Wachstum und Differenzierung von verschiedenen Zellen regulieren kann. Es spielt unter anderem bei Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen, aber auch beim Verlauf von Entzündungen und der Reproduktion eine wichtige Rolle. [169].

### 2.2.2.1 Pluripotenzerhaltende Eigenschaften und Einsatz in der Stammzellkultivierung

Bei der Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) ist LIF ein essentieller Medienzusatz, da es pluripotenzerhaltend wirkt. Die Signalwege, die dabei eine Rolle spielen sind JAK/STAT3 (*Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription*) [170], TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* )/Smad [171][172][173][174] und MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) [175][176][177][178].

Der JAK/STAT3-Signalweg (Abbildung 2.5) wird aktiviert durch LIF. Dieses bindet den Transmembranrezeptor gp130 (*glyco protein 130*) und den LIF-Rezeptor  $\beta$  (LIFR- $\beta$ ), welche dadurch heterodimerisieren. Die intrazellulären Untereinheiten der Rezeptoren enthalten jeweils eine Januskinase (JAK), die durch die Heterodimerisierung miteinander assoziieren und sich gegenseitig phosphorylieren [180]. An diese, durch die Phosphorylierung aktivierten Rezeptoruntereinheiten, binden nun STATs (*signal transducers and activators of transcription*), welche ebenfalls

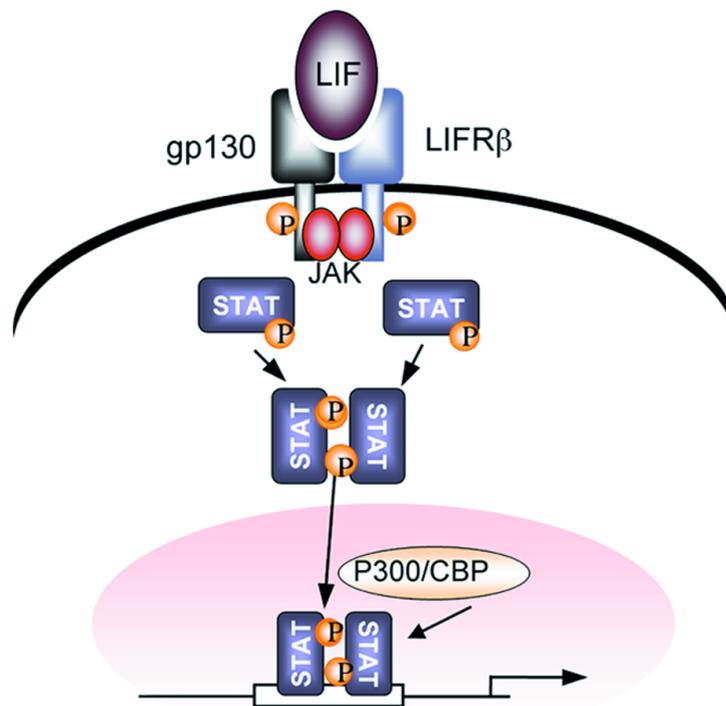


Abbildung 2.5: Der JAK/STAT3-Signalweg (aus [179]).

phosphoryliert werden. Die phosphorylierten STATs dimerisieren und, nach ihrer Translokation in den Kern, rekrutieren den Transkriptionskofaktor p300/CBP, um so die Transkription ihrer assoziierten Gene zu aktivieren [181][182]. Im Fall von LIF beinhaltet dies den Transkriptionsfaktor Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*), welcher einer der Hauptregulatoren der Pluripotenz ist [183].

Fehlt LIF im Zellkulturmedium kommt es zu spontaner Ausdifferenzierung der mESCs, wobei sie 1-2 mm große Zellaggregate, sog. *embryoid bodies* bilden [184]. Zudem muss das Medium serumhaltig sein, woraus geschlossen werden kann, dass im Serum enthaltene Faktoren synergistisch mit LIF agieren und nur so eine kontinuierliche Selbsterneuerung der mESCs ablaufen kann [185].

### 2.2.3 Der Notch-Signalweg

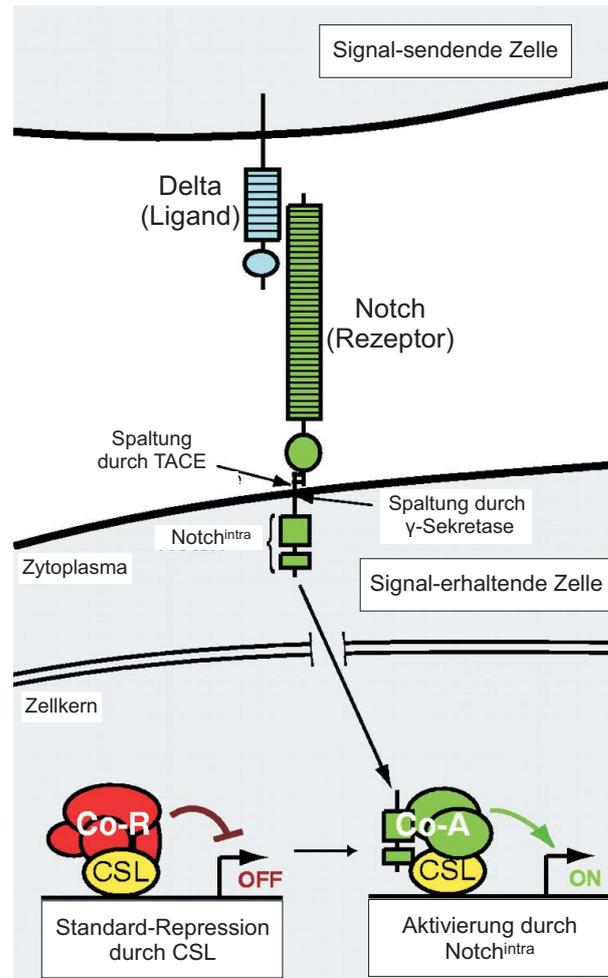
Der Notch-Signalweg ist ein hochkonservierter Signalweg zur interzellulären Kommunikation, welcher bei den meisten mehrzelligen Organismen vorliegt [186]. In Säugetieren gibt es vier verschiedene Notch-Rezeptoren (NOTCH1-4), die als Transmembranproteine vorliegen. Da die meisten Liganden auch als Transmembranproteine vorliegen, erfolgt die Bindung des Rezeptors in der Regel nur durch direkten Zell-Zell-Kontakt. Dadurch können sich Gruppen von Zellen so gegenseitig beeinflussen, dass sie größere Strukturen bilden können, wobei laterale Inhibierungsmechanismen eine große Rolle spielen [130].

Die Notch-Liganden gehören zur Proteinfamilie DSL (Delta/Serrate/LAG-2). In *Drosophila melanogaster*, einem Organismus, in dem viele Studien des Notch-Signalweges durchgeführt worden sind, gibt es zwei Liganden, welche die Namen Delta und Serrate tragen. In Säugetieren heißen die korrespondierenden Liganden Delta-like und Jagged und es gibt jeweils mehrere Varianten von ihnen [187]. Die Liganden sind, ebenso wie die Rezeptoren, Transmembranproteine mit nur einer Transmembrandomäne und bestehen extrazellulär aus kleinen EGF-ähnlichen (*epidermal growth factor*) Wiederholungseinheiten [188]. Spezielle Strukturen innerhalb dieser EGF-ähnlichen Wiederholungseinheiten vermitteln direkten Kontakt zwischen Ligand und Rezeptor [189]. Wenn Ligand und Rezeptor miteinander in Kontakt getreten sind, spaltet die Metalloprotease TACE (*Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme*) den Rezeptor direkt außerhalb der Membran. Die freigesetzte extrazelluläre Domäne des Rezeptors und der Ligand, mit dem sie weiterhin in Wechselwirkung steht, werden von der Ligand-exprimierenden Zelle per Endozytose aufgenommen [190]. Nach der ersten Spaltung wird der Rezeptor ein weiteres Mal direkt innerhalb der Membran von der  $\gamma$ -Sekretase gespalten. Das freigesetzte Fragment Notch<sup>intra</sup> kann nun, nach seiner Translokation in den Kern, durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors CSL direkt Einfluss auf die Genexpression nehmen [191][192]. CSL-Proteine sind sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine, welche stromabwärts von Notch agieren und nach der Bindung des Fragmentes Notch<sup>intra</sup> von einem Repressor zu einem Aktivator der Transkription werden [193]. In Abbildung 2.6 ist ein Überblick über den Notch-Signaltransduktionsweg gegeben.

### 2.2.3.1 Der Ligand Delta-like 1 und seine Rolle bei der Angiogenese und der postnatalen Arteriogenese

Die Verstopfung von Arterien führt zur Blutunterversorgung von Gewebe, welches zum Teil relativ weit entfernt sein kann. Für die Wiederherstellung des Blutflusses und die Regeneration der ischämischen Organe ist das Wachstum funktionaler Arterien essentiell. Durch arterielle Verstopfung wird das Sprießen von Kapillaren aus kleinen postkapillaren Venolen induziert. Dieser Vorgang, genannt Angiogenese, hat jedoch nur einen begrenzten Einfluss auf die Wiederherstellung des Blutflusses. Die Entwicklung und Reifung kleiner kollateraler Arterien, genannt postnatale Arteriogenese hat das Potential den Blutfluss vollkommen wiederherzustellen [194]. Die genetischen Grundlagen, durch welche die postnatale Arteriogenese reguliert wird sind jedoch größtenteils unbekannt.

Für die Regulierung der Entwicklung des embryonalen vaskulären Systems spielen zwei Proteine eine wichtige Rolle. In arteriellem Gewebe wird spezifisch der Transmembranligand Ephrin-B2 und in venösem bevorzugt der Rezeptor EphB4 exprimiert, welcher nur mit Ephrin-B2 interagiert [195][196]. Die Vermittlung der angiogenen Umgestaltung von Arterien und Venen läuft durch bidirektionale Signalübertragungen dieser zwei Proteine ab [197][198]. Durch EphB4-Aktivierung kann sowohl Endothelzellsprießung und -migration, als auch die postnatale Angiogenese gefördert werden [199][200][201]. Der Notch-Signalweg reguliert die vaskuläre Entwicklung stromabwärts von VEGF und stromaufwärts von Ephrin-B2 [202][203][204]. Wäh-



**Abbildung 2.6:** Schematisches Diagramm des Notch-Signaltransduktionsweges. Ligand Delta und Rezeptor Notch sind Transmembranproteine bestehend aus EGF-Wiederholungseinheiten (dargestellt durch Rechtecke). Die Aktivierung von Notch führt zu zwei proteolytischen Spaltungen, woraufhin die intrazelluläre Domäne von Notch (Notch<sup>intra</sup>) in den Kern gelangen kann und dort den Transkriptionsfaktor CSL aktiviert. Der CSL-Co-Repressor-Komplex wird daraufhin durch einen Co-Aktivatorkomplex ersetzt, welcher Notch<sup>intra</sup> enthält und die Transkription aktiviert (nach [187]).

rend der vaskulären Entwicklung ist das primäre Zielgewebe der Notch-Signaltransduktion das Endothel [205][206]. In der späten Phase der embryonalen Entwicklung konnte hier die Expression des Liganden Delta-like 1 (Dll1) und seine essentielle Rolle für die embryonale Entwicklung nachgewiesen werden [207][208]. In postnatalen arteriellen Endothelzellen ist Dll1 ein essentieller Ligand, welcher die von der Notch-Signaltransduktion abhängige Ephrin-B2-Expression und die postnatale Arteriogenese reguliert. Seine Expression ist in Gewebe im stationären Zustand gering, weshalb auch die Notch-Aktivität und das Ephrin-B2-Level gering sind. Während der Arteriogenese kommt es zu einer perivaskulären Induktion eines pro-angiogenen Milieus, was die Freisetzung der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF (*basic fibroblast growth factor*) beinhaltet [209]. Durch deren synergistische Wirkung kann die Dll1-Expression stark hochreguliert werden, was die Notch-Signaltransduktion aktiviert und somit Ephrin-B2-Expression anregt. Dies induziert eine Ephrin-B2- und EphB4-abhängige Morphogenese der Verzweigungen humaner arterieller Endothelzellen [210]. Der Mechanismus der post-

natalen Angiogenese ähnelt also dem der Arterienentwicklung, wo Notch-Signaltransduktion die arterielle Differenzierung stromabwärts von VEGF und stromaufwärts von Ephrin-B2 reguliert [203]. Unterschiede finden sich in der Expressionsstärke von Delta-like 4 (Dll4), welches bei der embryonalen arteriellen Entwicklung ein kritischer Faktor ist, während bei der postnatalen Arteriogenese keine spezifische Regulation dieses Faktors stattfindet [211]. Der Schlüsselfaktor ist hier Dll1. Daher wäre es möglich das Eingriffe oder Medikamente, welche die vaskuläre Dll1-Expression während ischämischem Stress hochregulieren, einen fördernden Effekt auf die Arteriogenese haben und so zur Rettung oder Regeneration von Organen beitragen könnten [210]. Untersuchungen zu diesem Thema werden dadurch erschwert, dass die löslichen Formen der Liganden eine geringere Aktivität haben als zellassoziierte [212] und sich erst zusammenlagern [213][214] oder auf einer Oberfläche immobilisiert werden müssen [215] um die Notch-Signaltransduktion effektiv zu aktivieren und eine biologische Antwort zu induzieren. Daher soll in dieser Arbeit die extrazelluläre Domäne des Dll1 als Fusionsprotein mit dem Fc-Fragment von IgG produziert werden. Dieses lösliche und sezernierte Protein könnte auf Plastikoberflächen, wie Zellkulturplatten immobilisiert werden und somit in den entsprechenden Untersuchungen Verwendung finden.



## 3 Das Dll1Fc-Fusionsprotein

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Abschnitt werden die Arbeiten am Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von Dll1 und dem Fc-Teil von IgG dargestellt (im weiteren als Dll1Fc bezeichnet). Der zweite Abschnitt befasst sich mit den Arbeiten zu VEGF<sub>165</sub> und der dritte mit denen an LIF (welches zusätzlich auch in *E.coli* produziert wurde). Der Aufbau dieses Kapitels gliedert sich jeweils ungefähr wie folgt: Erstellung der Zelllinie, Expressions- und Sezernierungsnachweis, Hochproduzentengewinnung, Langzeitexpressionsstabilität, Aufreinigung und Testung.

Die CHO-Plattform die in dieser Arbeit verwendet wurde, um die Produktionszelllinien für die verschiedenen Zytokine zu erzeugen, ist die CHO<sup>SFS</sup> (Klon II)-Zelllinie, welche von der Firma Cell Culture Service bezogen wurde. Diese ist ein Subklon der Zelllinie CHO/dhfr<sup>-</sup> DUKX B11, der speziell für serumfreie Suspensionskultur (SFS) entwickelt worden ist. Die Kultivierung der Zellen wurde in ProCHO4- und ProCHO5-Medium durchgeführt, welches serumfrei ist und damit die Aufreinigung sezernierter Proteine deutlich erleichtert. Da die verwendete Zelllinie dhfr<sup>-</sup> negativ ist, bietet sich die Möglichkeit, durch Kotransfektion des dhfr-Gens einen Selektionsmarker einzuführen. Die Zellen vor der Transfektion oder jene, welche nicht mit einem dhfr-Gen kotransfiziert worden sind, wurden unter Zusatz von Hypoxanthin und Thymidin kultiviert. Die Zellen wurden in verschiedenen Systemen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Suspension kultiviert und die Master- und Arbeitszellbänke wurde mittels der in Kapitel C.1 angegebenen Methoden angelegt.

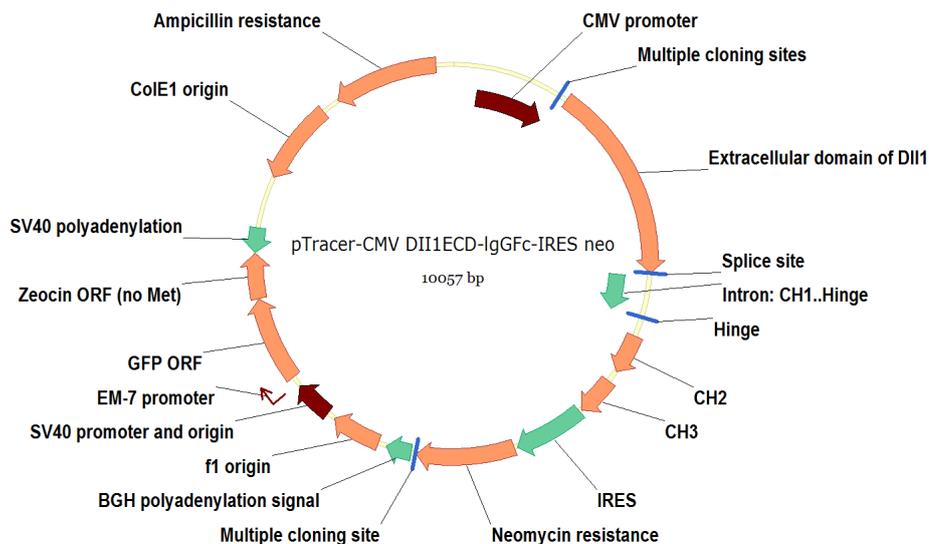
### 3.1 Erstellung der Zelllinien

Der verwendete Vektor (Abbildung 3.1) basiert auf dem pTracer-CMV-Vektor von Invitrogen und enthält ein Gen für die Expression des Markerproteins *green fluorescent protein* (GFP)<sup>1</sup> und das *Sh ble*-Resistenzgen. Dies vermittelt eine Resistenz gegen das Glykopeptidantibiotikum Phleomycin D1 (im Weiteren nach seinem Handelsnamen als Zeocin (Abkürzung: Zc) bezeichnet), welches zur Selektion stabil transfizierter CHO-Zellen verwendet werden kann [216]. Das enthaltene Gen für das Fusionsprotein besteht aus dem Teil für die extrazelluläre Domäne des Dll1, dem Teil für die Fc-Region von IgG und einem Intron, durch welches die beiden zusammengespliced werden. Das Dll1Fc-Gen ist über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit dem *neo*-Gen verbunden, welches eine Resistenz gegen das Proteinbiosynthese-hemmende

<sup>1</sup>Die hier verwendete Variante ist sog. Cycle3-GFP, welche durch die Einführung von 4 Punktmutationen (F64L, F100S, M154T und V164A) aus Wildtyp-GFP erzeugt wurde.

### 3 Das Dll1Fc-Fusionsprotein

Aminoglykosid Geneticin vermittelt, welches ebenfalls zur Selektion stabil transfizierter CHO-Zellen verwendet werden kann [217]. Die Insertion der IRES-Sequenz erlaubt die simultane Expression der zwei Gene durch eine einzelne cDNA in proportionalem Verhältnis [218]. Die Expression des Fusionsproteins und die Geneticin-Resistenz stehen unter der Kontrolle des CMV-Promoters (aus dem humanen Cytomegalievirus), welcher eine effiziente Expression auf hohem Level ermöglicht [219] [220]. Die Expression des GFP und der Zeocin-Resistenz steht unter der Kontrolle des SV40-Promoters (aus dem Simian-Virus 40), dessen Expressionsstärke geringer ist [221] [222].



**Abbildung 3.1:** Schematische Karte des Vektors, welcher für die Erstellung der Dll1Fc-produzierenden Zelllinie verwendet wurde (erstellt von Kai-Oliver Mutz mit der Software Vektor NTI).

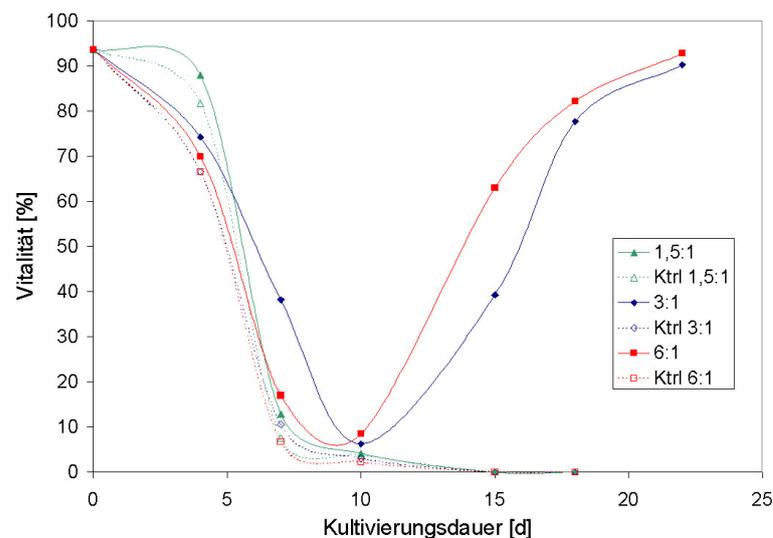
Für die Erstellung der Produktionszelllinie sollen zwei verschiedene Transfektionsmethoden miteinander verglichen werden: Die Lipofektion und die Transfektion per Calciumphosphat-Präzipitation.

#### 3.1.1 Amplifikation des Vektors

Der aus der Medizinischen Hochschule Hannover von der AG Limbourg (Institut für Molekulare Kardiologie) erhaltene Vektor wurde zunächst in *E.coli* amplifiziert. Dazu werden kompetente *E.coli* XL1 blue nach dem in Abschnitt C.3.1 angegebenen Protokoll transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden verwendet, um eine 100 mL-Flüssigkultur anzupflanzen, welche nach 18 Stunden geerntet wurde. Mittels des Qiagen Plasmid Purification Midi Kit wurde der Vektor aufgereinigt (Durchführung siehe Abschnitt C.5.5) und in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) umgepuffert. Eine Analyse per Agarosegel ergab eine Größe im Bereich von 10 kbp, welche mit der erwarteten Größe übereinstimmt. Die Quantifizierung mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 ergab eine Menge von 88,1 µg, welche für die geplanten Transfektionsexperimente ausreichend ist.

### 3.1.2 Transfektion per Lipofektion

Für die Lipofektion wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: das FuGene6-Kit von Roche und das TurboFect-Transfektionsreagenz von Invitrogen. Die CHO<sup>SFS</sup> Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion subkultiviert und mit einer Dichte von 50.000 Zellen/mL in 2 mL Medium in 6-Loch-Platten (FuGene6-Ansatz) bzw. mit einer Dichte von 400.000 Zellen/mL in 1 mL Medium in 24-Loch-Platten (TurboFect-Ansatz) ausgesät. Die Transfektionen wurden entsprechend der Protokolle in den Abschnitten C.1.11 und C.1.12 durchgeführt. Es wurden jeweils drei Ansätze mit unterschiedlichen Reagenz:DNA-Verhältnissen (1,5:1, 3:1 und 6:1 für FuGene und 1:6, 1:3 und 1:1,5 für TurboFect) angefertigt. Außerdem wurden jeweils drei entsprechende Kontrollansätze, welche keine DNA enthielten, angefertigt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden jeweils 500 µg Zeocin/mL zugegeben. Zeocin, und nicht Geneticin, wurde zur Selektion ausgewählt, da seinem Resistenzgen der schwächere Promotor vorangeht und so Zellen selektiert werden sollten, welche eine höhere Kopienzahl des entsprechenden Vektors integriert haben. Nachteile in Bezug auf die Expressionsstärke des Dll1Fc sollten dabei nicht zu erwarten sein, da diese mit der der Zeocin-Resistenz korrelieren sollte [223]. Während der Kultivierung im Selektionsmedium wurde zweimal wöchentlich das Medium gewechselt und die Vitalität bestimmt. Für die Zellen der Kontrollen, der TurboFect-Ansätze, sowie des Ansatzes 1,5:1 der FuGene6-Transfektion konnte nach fünfzehn Tagen keine Vitalität mehr festgestellt werden. Die Vitalitäten der Zellen der Ansätze 3:1 und 6:1 durchlief nach zehn Tagen ein Minimum und hatte nach 22 Tagen wieder einen Wert von über 90% erreicht (Abbildung 3.2). Die Selektionskultivierung wurde hier beendet und Masterzellbänke wurden angelegt. Die Zelllinien wurden DF6 (Ansatz 6:1) und DF3 (Ansatz 3:1) benannt (eine Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Dll1Fc-Zelllinien und -Subzelllinien ist im Anhang in Tabelle A.1 gegeben).



**Abbildung 3.2:** Vitalitätsverlauf der drei FuGene6-Ansätze sowie ihrer jeweiligen Kontrollen (Ktrl) während der Selektionskultivierung.

Eine Bestimmung der Transfektionseffizienz konnte nicht erfolgen, da die GFP-Fluoreszenz der Zellen zu gering ausgeprägt war, als dass man sie hätte mikroskopisch unterscheiden können.

### 3 Das Dll1Fc-Fusionsprotein

---

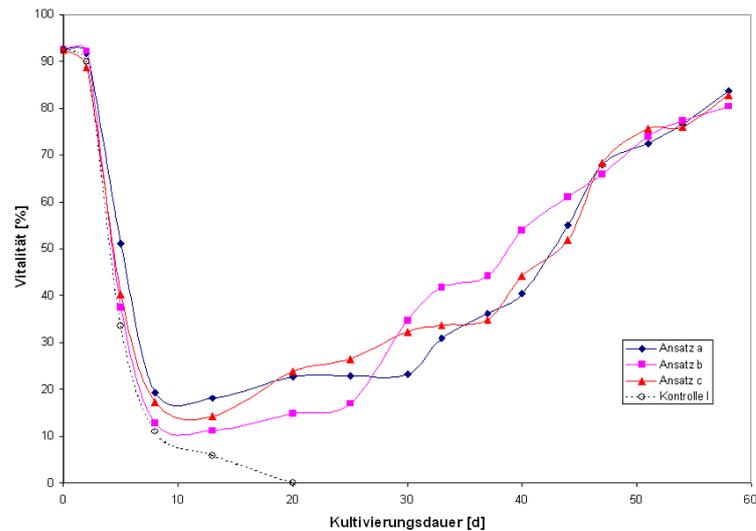
Auch ist nicht anzunehmen, dass die Transfektionseffizienz mit dem Anteil am Vitalitätsminimum vorliegender Zellen übereinstimmt. Es gibt große Abweichungen im Level der Expression und Amplifikation der transfizierten Gene in Abhängigkeit von der Integrationsstelle des Plamids im Genom [224][225][226]. Integration eines Transgens in oder nahe Heterochromatin führt zu einem stillgelegten oder unterdrückten Expressionsstatus, während Integration in das aktiv transkribierte Euchromatin zur Expression führt [227]. Da der unterdrückte Heterochromatinstatus auch an die Tochterzellen weitergegeben wird [228][229][230], werden die positiv transfizierten Zellen, bei welchen die Integration in diesen Bereich ablief, während der Selektion ebenfalls eliminiert. Zudem wurde das Vitalitätsminimum erst nach 10 Tagen Kultivierung erreicht und die resistenten Zellen wuchsen nach der Transfektion entsprechend weiter.

#### 3.1.3 Transfektion per Calciumphosphatpräzipitation

Es wurden Calciumphosphat ( $\text{CaP}_i$ )-Präzipitationen nach zwei verschiedenen Protokollen mit denselben Reagenzien durchgeführt. Eine Durchführung wurde adaptiert nach einem Protokoll der AG Schambach (Institut für Experimentelle Hämatologie, Medizinische Hochschule Hannover) (Protokoll I), das andere nach einer Vorschrift der AG Flemington (Abteilung für Pathologie, Tulane Health Sciences Center, New Orleans) (Protokoll II). Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion subkultiviert und mit einer Dichte von 400.000 Zellen/mL in 1 mL Medium in 24-Loch-Platten ausgesät. Die Transfektionen wurden entsprechend der Protokolle in den Abschnitten C.1.13.1 und C.1.13.2 durchgeführt. Es wurden drei bzw. vier verschiedene Ansätze und entsprechende Kontrollen angefertigt. Für Protokoll I wurde mit einem  $\text{CaCl}_2$ :DNA-Verhältnis von 160:1 gearbeitet und dabei 0,2, 0,4 und 0,8  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt (Ansätze a-c). Bei Protokoll II wurde ein  $\text{CaCl}_2$ :DNA-Verhältnis von 278:1 verwendet, wobei konstant 1100 ng DNA für alle Ansätze eingesetzt wurde. Dabei wurde ein *carrier*-Plasmid (pET29a(+)) von Novagen verwendet und 3,6, 6,3, 9,0 und 1100 ng Dll1Fc-Plasmid bei konstanten 1100 ng Gesamtplasmidmenge eingesetzt (Ansätze d-g). Die Selektion wurde wie bei den Lipofektionsansätze durchgeführt. Für die Zellen der Kontrollen, sowie der Ansätze d-g konnte nach 21 Tagen keine Vitalität mehr festgestellt werden. Die Ansätze a-c durchliefen ein Vitalitätsminimum bei Tag 13 und wiesen nach 58 Tagen wieder Vitalitäten von über 80% auf (siehe Abbildung 3.3). Die Selektionskultivierung wurde hier beendet und Masterzellbänke wurden angelegt. Die Zelllinien wurden DFa, DFb und DFc benannt. Der im Vergleich zur Lipofektion deutlich längere Zeitraum für die Wiedererlangung hoher Vitalität könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Resistenz durch eine geringere Anzahl integrierter Vektorkopien nicht so ausgeprägt war wie bei den durch Lipofektion erzeugten Zellen.

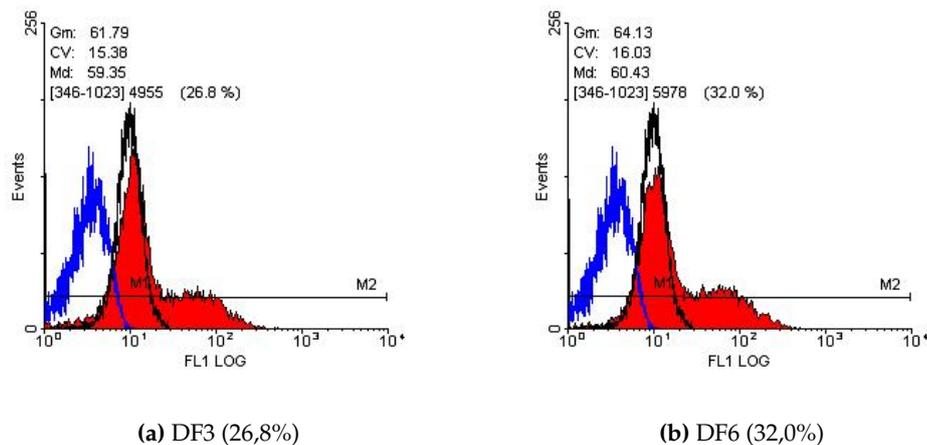
## 3.2 Lokalisierungs- und Expressionsnachweise

Der Nachweis der Expression des Zielproteins erfolgte per intrazellulärer Färbung. Diese wurde entsprechend dem Protokoll in Abschnitt C.4.3 durchgeführt. Für die per Lipofektion erstell-



**Abbildung 3.3:** Vitalitätsverlauf der CaP<sub>7</sub>-Präzipitationsansätze a-c sowie ihrer entsprechenden Kontrollen während der Selektionskultivierung.

ten Zelllinien wurde eine Kombination aus einem sheep-anti-goat-Dll1-<sup>2</sup> und einem anti-sheep-IgG-FITC-Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte CHO<sup>SFS</sup>-Zellen verwendet. Bei der Auswertung wurden diejenigen Zellen als positiv gewertet, deren Fluoreszenzsignal höher war als das von 99% der Zellen der Negativkontrolle. Der Anteil positiver Zellen lag für DF3 bei 26,8% und für DF6 bei 32,0% (Abbildung 3.4).



(a) DF3 (26,8%)

(b) DF6 (32,0%)

**Abbildung 3.4:** Fluoreszenzintensitäten der untransfizierten Kontrolle ohne Antikörper (blau), mit Antikörpern (schwarz, Negativkontrolle) und der jeweiligen Proben (rot) für die mittels Lipofektion erstellten Zelllinien (in Klammern angegeben ist der Anteil Dll1Fc-positiver Zellen).

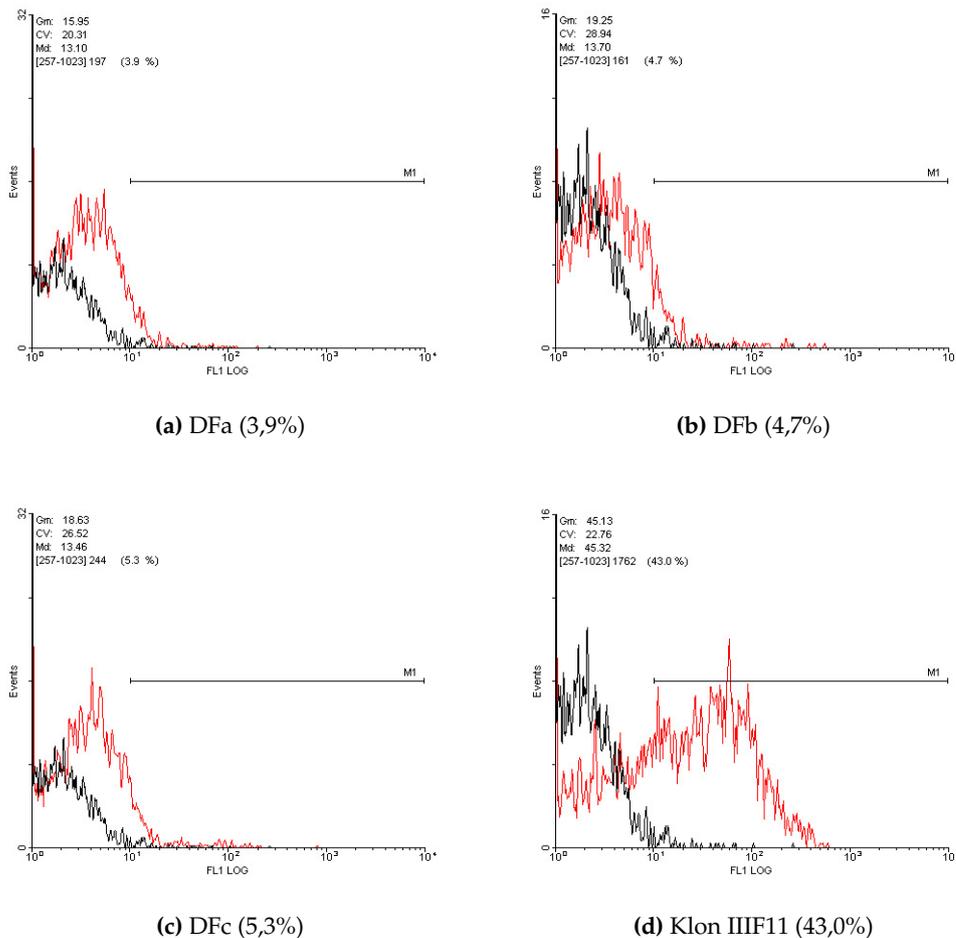
Für die durch Calciumphosphatpräzipitation erstellten Zelllinien wurde eine Kombination aus einem sheep-anti-rat-Dll1-<sup>3</sup> und einem donkey-anti-sheep-IgG-FITC-Antikörper verwendet. Da

<sup>2</sup>Der Antikörper wurde von der AG Limbourg zur Verfügung gestellt und dort zuvor erfolgreich mit humanem Dll1 getestet

<sup>3</sup>Auch dieser Antikörper wurde von der AG Limbourg zur Verfügung gestellt und zuvor erfolgreich mit humanem Dll1 getestet

### 3 Das Dll1Fc-Fusionsprotein

eine andere Antikörperkombination zwangsläufig zu anderen Ergebnissen führt, wurde der aus der DF6-Zelllinie erzeugte Einzelzellklon IIIIF11 (siehe Abschnitt 3.3.1) zusätzlich als Positivkontrolle gemessen. Die Ergebnisse in Abbildung 3.5 zeigen, dass die per Lipofektion erhaltenen Zelllinien deutlich mehr positive Zellen aufweisen, als die per Calciumphosphatpräzipitation erhaltenen. Zwar ist mit der hier verwendeten Antikörperkombination ein deutlich schlechteres Ergebnis erhalten worden, wie der Vergleich der beiden Messungen des Klons IIIIF11 zeigt (43,0% gegenüber 83,6% (siehe Abbildung 3.7)), jedoch sind die Werte für die durch Lipofektion erhaltenen Zelllinien mehr als fünfmal so hoch wie die hier für die Ansätze a-c erreichten.

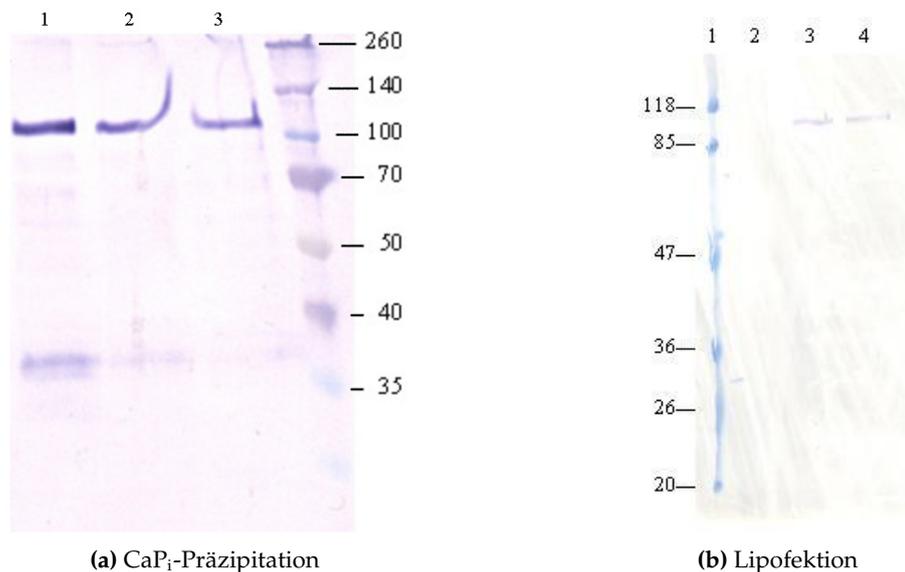


**Abbildung 3.5:** Fluoreszenzintensitäten der untransfizierten Kontrolle (schwarz) und der jeweiligen Proben (rot) für die durch  $CaP_i$ -Präzipitation erstellten Zelllinien und den Einzelzellklon IIIIF11 (in Klammern angegeben ist der Anteil Dll1Fc-positiver Zellen).

Diese Ergebnisse waren dahingehend unerwartet, dass alle Zellen die Zeocinresistenz exprimieren, nicht jedoch das Zielprotein. Es gibt mehrere mögliche Ursachen hierfür. Das verwendete Plasmid wurde vor der Transfektion nicht linearisiert. Wenn die zur Integration in das Genom nötige Bruchstelle innerhalb des Dll1Fc-IRES-neo-Gens liegen sollte, könnten diese Proteine nicht mehr exprimiert werden, die Zeocinresistenz hingegen bliebe bestehen. Eine andere mögliche Ursache ist der Aufbau des Plasmids. Es ist bekannt, dass wenn das Zielgen stromabwärts über eine IRES mit dem *neo*-Gen verbunden ist, die Expression des Zielproteins si-

gnifikant herunter reguliert sein kann [231]. Eine weitere Möglichkeit sind das Auftreten von Gen-Stillegung und Kopienverlusten, welche zusammen mit den Ergebnissen von Abschnitt 3.6 ausführlich diskutiert werden. Außerdem könnten auch mehrere dieser Phänomene zusammen aufgetreten sein und so zu den hier erhaltenen Ergebnissen geführt haben.

Der Nachweis der Sekretion erfolgte per Western Blot des Zellkulturüberstandes. Dieser wurde entsprechend dem Protokoll in Abschnitt C.2.6 durchgeführt. Es wurden jeweils 500  $\mu\text{L}$  Überstand (Lipofektionsansätze) bzw. 1,5 mL Überstand ( $\text{CaP}_i$ -Präzipitationsansätze) per TCA-Fällung aufkonzentriert (Durchführung siehe Abschnitt C.2.1). Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, konnte im Überstand aller 5 Zelllinien das Zielprotein bei einer Größe von ca. 110 kDa nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde eine äquivalente Menge Überstand der untransfizierten Ursprungszelllinie aufgetragen, hier ist keine Bande zu sehen.



**Abbildung 3.6:** Western Blots der Überstände der fünf Dll1Fc-Zelllinien ((a) 1: DFa; 2: DFb; 3: DFc; (b) 2: Negativkontrolle; 3: DF6; 4: DF3).

### 3.3 Selektion von Hochproduzenten

Durch den ausgeübten Selektionsdruck wurde das aufgenommene Plasmid in das Genom der Zellen integriert. Dieser Prozess geschieht jedoch zufällig und die Wahrscheinlichkeit einer Insertion in hochtranskribierte Genombereiche ist gering [232].

Um eine geeignete Methode zur Gewinnung einer hochproduzierende Zelllinie zu erhalten, wurden mit der aus der Lipofektion stammenden Zelllinie DF6 zwei Einzelzellklonierungen durchgeführt. Zusätzlich wurde die mittels Calciumphosphatpräzipitation erzeugte Zelllinie DFc per FACS bezüglich ihrer GFP-Expression sortiert, die mit der Expressionsstärke des Zielproteins korrelieren sollte [223].

#### 3.3.1 Einzelzellklonierung

Es wurden zwei Einzelzellklonierungen durchgeführt. Dabei wurden per Verdünnungsmethode 300 Ansätze und per FACS-Sortierung 360 Ansätze angefertigt. Die Protokolle finden sich in den Abschnitten C.1.15 und C.4.2.

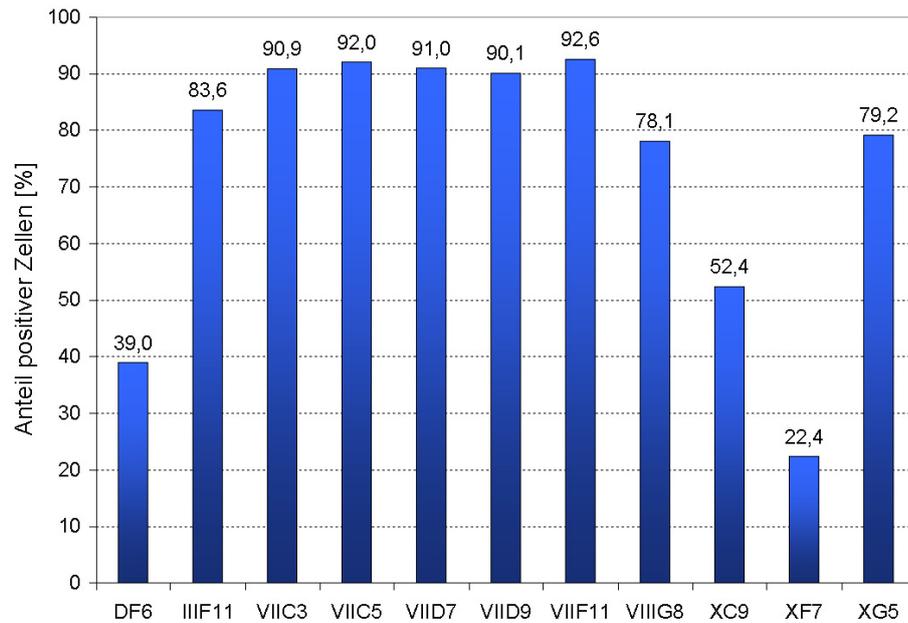
Nach 5 Tagen Kultivierung wurden alle Ansätze ausgezählt, um abschätzen zu können, ob zu Beginn der Kultivierung tatsächlich nur eine einzelne Zelle vorlag. Wenn man von einer Verdopplungszeit von 24 Stunden ausgeht, können nach 5 Tagen maximal 32 Zellen pro Ansatz vorliegen. Da die Zellen statisch kultiviert wurden, konnte auch dadurch, dass zwei oder mehr räumlich getrennte Zellansammlungen vorlagen darauf geschlossen werden, dass zu Beginn mehr als eine Zelle vorlag. Diese Ansätze wurden ebenfalls ausgeschlossen. Insgesamt mussten von den Ansätzen der Durchführung per Verdünnung 101 (33,7%) und von den Ansätzen der Durchführung per FACS 20 (5,6%) ausgeschlossen werden. Die Fehleranfälligkeit der manuellen Methode ist deutlich höher.

Während der Expansion wurde alle 6 Tage die Hälfte des Mediums vorsichtig abgenommen und durch frisches ersetzt. Nach 17 Tagen wurden die gewachsenen Ansätze, welche nicht aussortiert worden sind, auf 1 mL Kulturvolumen in 24-Loch-Platten expandiert. Nach 30 Tagen erfolgte die Expansion auf 2 mL in 6-Loch-Platten. Nach weiteren sechs Tagen wurden 500 µL des abgenommenen Zellkulturüberstandes per TCA-Fällung aufkonzentriert und für einen Western Blot verwendet um zu bestimmen ob die erhaltenen Zelllinien das Zielprotein exprimieren. Zu diesem Zeitpunkt waren von den 300 Verdünnungsansätzen noch sieben und von den 360 FACS-Ansätzen noch 24 verblieben. Das Zielprotein konnte nachgewiesen werden im Überstand von einem der Klone aus dem Verdünnungsansatz (Klon IIIIF11) und neun der Klone des FACS-Ansatzes (VIIC3, VIIC5, VIID7, VIID9, VIIF11, VIIG8, XC9, XF7 und XG5). Um zu bestimmen, welcher der zehn erhaltenen produzierenden Klone die höchste Produktivität aufweist, wurde eine intrazelluläre Färbung durchgeführt.

Nach Abbildung 3.7 ist der Anteil der produzierenden Zellen bei neun der zehn Klone höher als bei der ursprünglichen DF6-Zelllinie. Vorausgesetzt, dass die erhaltenen Zelllinien wirklich aus einer einzelnen Zelle entstanden sind, wäre zu erwarten gewesen, dass der Anteil der positiven Zellen jeweils bei 100% liegt. Da dies nicht der Fall ist, weist wie schon die Ergebnisse nach der Selektion auf instabile Zellen hin, welche ihre Produktivität durch Kopienverlust und Gen-Stillegung zu verlieren scheinen. Dies wird ausführlich im Abschnitt 3.6 diskutiert.

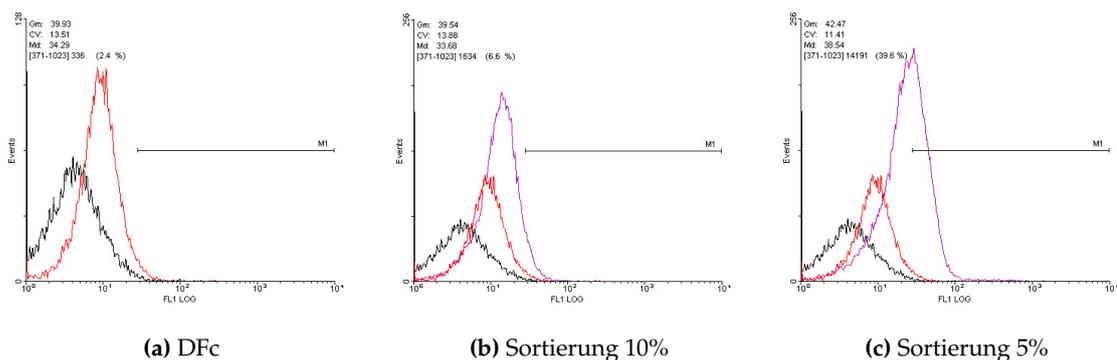
#### 3.3.2 Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität

Da die Expressionsstärke des Reportergens mit der Expressionsstärke des GOI korrelieren sollte, kann durch die Sortierung der am stärksten GFP-exprimierenden Zellen eine Dll1-hochproduzierende Zelllinie gewonnen werden. Als Maß für die GFP-Expression kann die GFP-Fluoreszenz verwendet werden, welche mit dem intrazellulären GFP-Gehalt korreliert [233] [234]. Es wurden zwei Sortierungen durchgeführt, bei denen die am stärksten fluoreszierenden



**Abbildung 3.7:** Anteil der positiven Zellen der mittels Einzelzellklonierung aus DF6 erzeugten Zelllinien im Vergleich zu ihrer Parentalzelllinie.

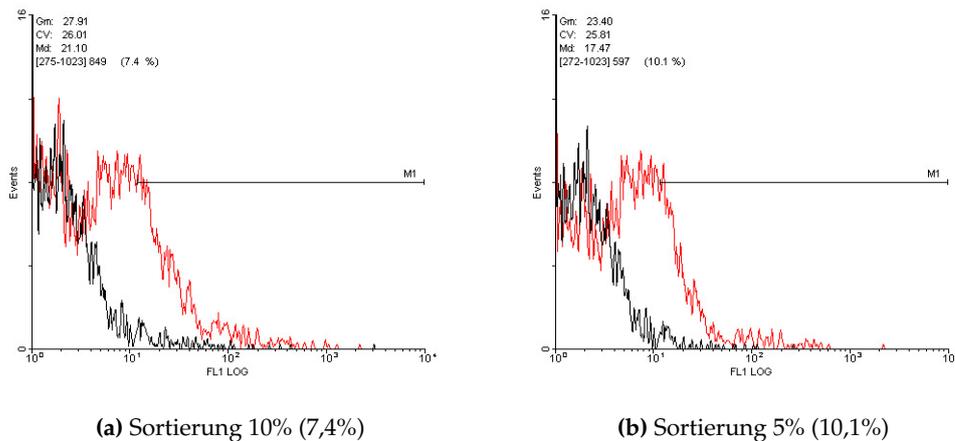
5% bzw. 10% der Zellen isoliert worden sind. Es wurden jeweils ca. 20.000 Zellen in eine Kavität einer 6-Loch-Platte sortiert (Durchführung siehe Abschnitt C.4.1) und diese anschließend expandiert. Nachdem genügend Zellen zum Anlegen einer Masterzellbank vorlagen, wurde eine intrazelluläre Färbung per Durchflusszytometer durchgeführt, um den Anteil produzierender Zellen zu bestimmen. Hierbei wurde, neben dem Anteil Dll1Fc-produzierender Zellen, auch der Anteil der GFP-positiven Zellen bestimmt.



**Abbildung 3.8:** GFP-Fluoreszenzintensitäten der mittels GFP-Sortierungen der Dll1Fc-Zelllinie DFc gewonnenen Zellen (schwarz: untransfizierte Zellen als Kontrolle, rot: Ansatz c, lila: jeweilige Sortierungen).

Die Ergebnisse in den Abbildungen 3.8 und 3.9 zeigen, dass die Sortierung prinzipiell funktioniert hat. Der Anteil GFP-positiver Zellen konnte von 2,4% auf 6,6% (10%-Sortierung, benannt DFc-10) bzw. 39,6% (5%-Sortierung, benannt DFc-05) gesteigert werden. Korrelierend damit nahm auch der Anteil der Dll1Fc-positiven Zellen von 5,3% auf 7,4% bzw. 10,1% zu. Insgesamt ist der Ansatz per Einzelzellklonierung jedoch deutlich erfolgreicher gewesen, da höher

### 3 Das Dll1Fc-Fusionsprotein



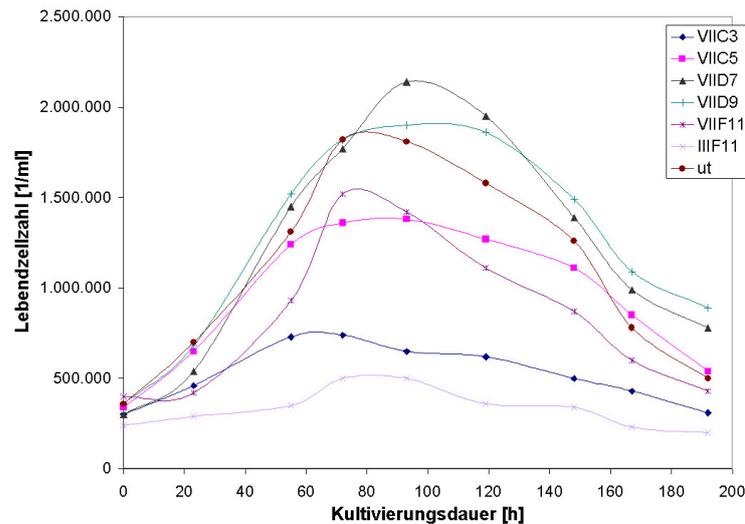
**Abbildung 3.9:** Anteile der Dll1Fc-positiven Zellen der mittels GFP-Sortierungen der DFC-Zelllinie gewonnenen Zellen (schwarz: untransfizierte Zellen als Kontrolle) (in Klammern angegeben ist jeweils der Anteil Dll1Fc-positiver Zellen).

produzierende Zelllinien gewonnen werden konnten.

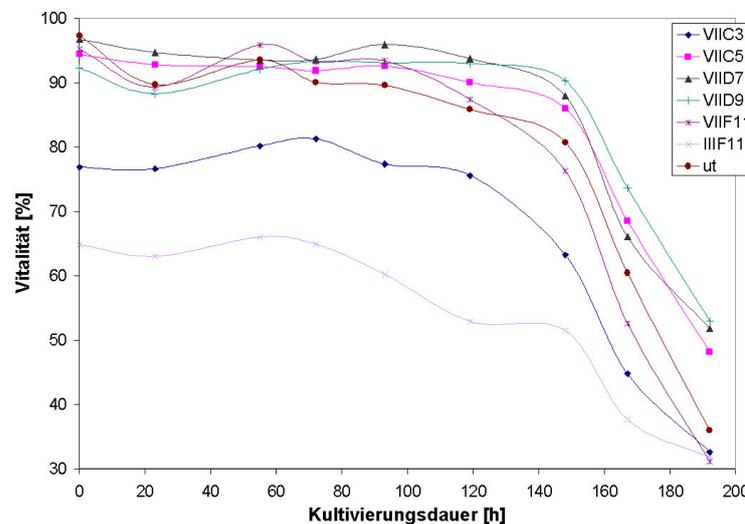
Das Ergebnis von 2,4% GFP-positiver Zellen bei der DFC-Zelllinie ist unerwartet. Da das GFP zusammen mit der Zeocinresistenz als Fusionsprotein exprimiert, sollten alle nach der Zeocin-Selektion vorhandenen Zellen auch GFP-positiv sein. Dies kann lediglich dadurch erklärt werden, dass die GFP-Fluoreszenz sehr gering ist. Betrachtet man den Verlauf der Fluoreszenzintensität (Abbildung 3.8), erkennt man, dass das Maximum nach der Transfektion deutlich zu höheren Fluoreszenzwerten hin verschoben ist. Die Verteilung der Fluoreszenzintensität bei der Negativkontrolle ist jedoch sehr breit, so dass der Unterschied in den GFP-Fluoreszenzstärken nicht deutlich wird. Hier wäre es nötig, die Zellen einzeln mit ihren Gegenstücken vor der Transfektion zu vergleichen, da dies jedoch nicht möglich ist, wird die etablierte Auswertungsmethode auch hier verwendet. Die Ergebnisse sind in diesem Zusammenhang nicht als Absolutwerte, sondern als Trend zu verstehen. Die geringe Fluoreszenz ist neben dem niedrigen Expressionslevel von GFP auch damit zu erklären, dass das primäre Anregungsmaximum der hier verwendeten GFP-Variante Cycle3-GFP bei 395 nm nicht genutzt werden konnte. Im Durchflusssytometer stand nur eine Anregungswellenlänge von 488 nm zur Verfügung, welche nahe dem sekundären Anregungsmaximum des Cycle3-GFP bei 478 nm liegt.

#### 3.3.3 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens

Durch Einzelzellklonierung erzeugte Zelllinien können in ihrem Wachstumsverhalten (z.B. in Bezug auf die Verdopplungszeit oder die maximale Zelldichte) von ihrer Ursprungszelllinie erheblich abweichen. Um zu bestimmen, welcher der Einzelzellklone zur Produktion des Zielproteins besonders geeignet ist, wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Die Zellen wurden hierbei in 50 mL Spinnerflaschen bei 80 rpm kultiviert. Die sechs Einzelzellklone mit den höchsten Anteilen produzierender Zellen (IIIF11, VIIC3, VIIC5, VIID7, VIID9 und VIIF11, siehe Abbildung 3.7) wurden mit untransfizierten CHO<sup>SFS</sup>-Zellen verglichen.



(a) Lebendzellzahl



(b) Vitalität

**Abbildung 3.10:** Lebendzellzahlen und Vitalitäten der sechs höchstproduzierenden Einzelzellklone und untransfizierter CHO<sup>SFS</sup>-Zellen (ut).

Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen, weisen die beiden Klone VIID7 und VIID9 im Vergleich zur Ursprungszelllinie ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten und höhere maximale Zelldichten und Vitalitäten in der zweiten Hälfte der Kultivierung auf. Aufgrund seiner höheren Maximalzelldichte wurde von diesen beiden der Klon VIID7 für die Kultivierungen zur Produktion des Zielproteins ausgewählt.

Das zum Teil sehr unterschiedliche Kultivierungsverhalten kann damit erklärt werden, dass bei der zufälligen Insertion des Plasmids Leseraster vorhandener Gene zerstört werden können [235]. Was sich, wenn für die Proliferation wichtige Proteine dadurch nicht mehr transkribiert werden können, negativ auf das Zellwachstum auswirken kann. Eine entgegengesetzte Wirkung könnte auftreten, wenn durch die Insertion apoptotische Faktoren wie p53 und Caspase-8 ausgeschaltet werden [236]. Diese Effekte treten vor allem bei Einzelzellklonen deut-

lich auf.

## 3.4 Aufreinigung

Der Klon VIID7 wurde in 100 mL Spinnerflaschen bei 80 rpm kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden nach fünf Tagen abgenommen, da nach diesem Zeitpunkt die Vitalität der Kultur abnehmen würde (Vergleich Abbildung 3.10b) und ein erhöhtes Vorliegen toter Zellen Verunreinigung des Überstandes mit intrazellulärem Protein nach sich ziehen würde.

Für die Aufreinigung von Fc-Fusionsproteinen können, wie für die Aufreinigung von IgGs, Protein A- und G-Affinitätschromatographien verwendet werden. Diese beiden Methoden sollten bezüglich der Reinheit und Ausbeute verglichen werden.

Es wurden 200 mL Überstand auf 10 mL aufkonzentriert. Anschließend wurde das Konzentrat mit 30 mL Bindungspuffer (20 mM Natriumhydrogenphosphat, pH=7,0) verdünnt und in viermal 10 mL aliquotiert. Die Aufreinigung erfolgte automatisiert mittels einer BioLogic DuoFlow FPLC Anlage von Bio-Rad mit 1 mL HiTrap-Protein A- bzw. G-Säulen von GE-Healthcare Life Sciences (Protokolle siehe Abschnitte C.2.7 und C.6.3). Die Elution erfolgte bei der Verwendung der Protein A-Säule mit 100 mM Citratpuffer (pH 4,0) und bei der Protein G-Säule mit 100 mM Glycinpuffer (pH 2,7). Es wurden insgesamt vier identische Läufe durchgeführt, bei denen beide Säulen je zweimal verwendet wurden.

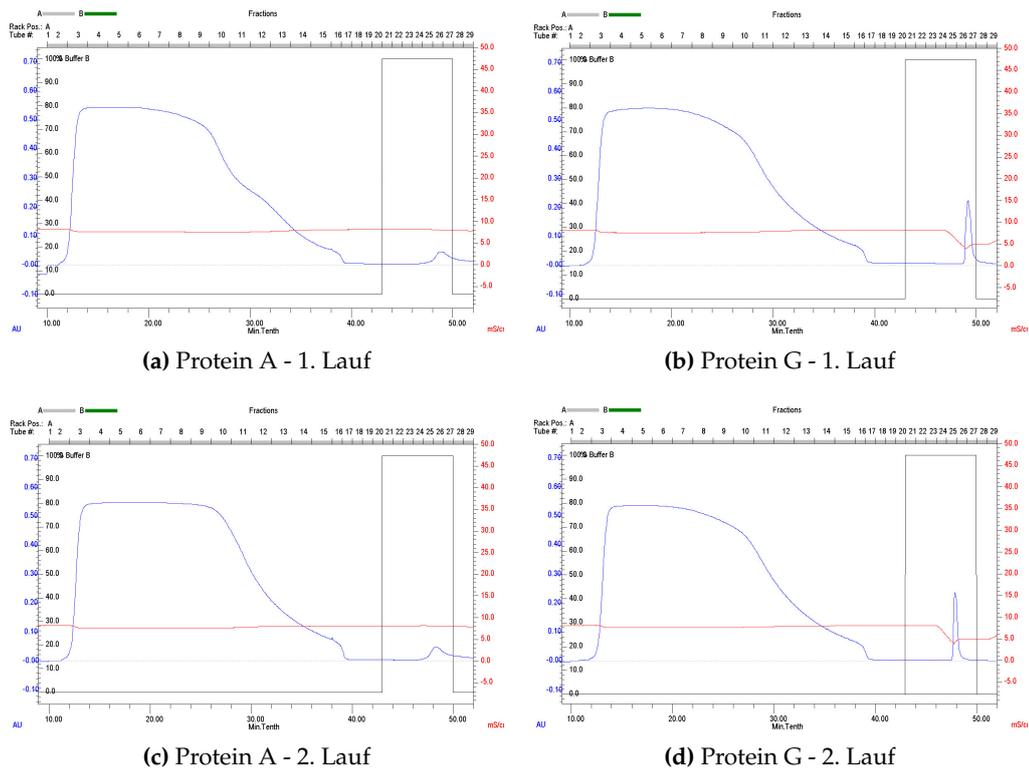
Abbildung 3.11 zeigt die Chromatogramme der vier Läufe und Abbildung 3.12 die entsprechenden vergrößerten Elutionspeaks. In Abbildung 3.13 ist ein silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel von vier Elutionsfraktionen der entsprechenden vier Läufe abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die Ergebnisse gut reproduzierbar sind und dass die Elutionspeaks bei Protein G-Affinitätschromatographie schärfer sind. Die Elutionsfraktionen der einzelnen Läufe wurden vereinigt und sollten mittels Bradford- (Durchführung siehe Abschnitt C.2.2) bzw. mittels BCA-Assay (Durchführung siehe Abschnitt C.2.3) quantifiziert werden. Jedoch lagen die erhaltenen Ergebnisse in allen Fällen unterhalb der Nachweisgrenzen der beiden Methoden<sup>4</sup>. Um Abschätzen zu können mit welcher stationären Phase höhere Ausbeuten erzielt werden können, wurden daher die Flächen unter den Elutionspeaks betrachtet, da diese proportional zur Proteinmenge sind, betrachtet. Die einzelnen UV-Werten von Minute 47 bis 52 wurden nach dem Abziehen einer Grundlinienkorrektur aufaddiert und folgende Summen erhalten:

	Protein G Lauf 1	Protein A Lauf 1	Protein G Lauf 2	Protein A Lauf 2
Summe der UV-Werte [AU]	39,2	20,9	32,8	20,7

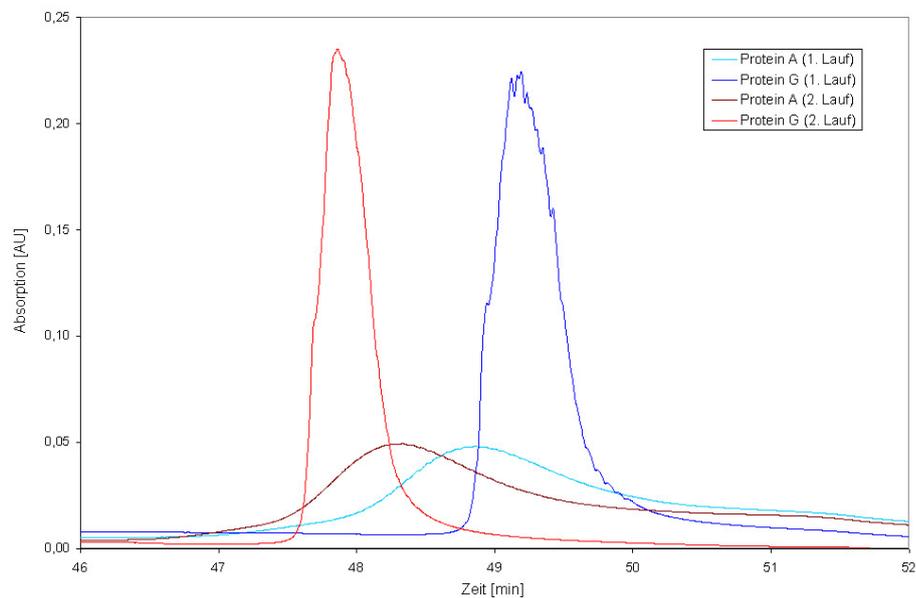
Die erhaltenen Werte weisen auf eine höhere Ausbeute bei der Protein G-Affinitätschromatographie hin. Dieses Ergebnis sollte allerdings noch einmal bestätigt werden. Im besten Fall durch eine Proteinquantifizierung nach einer Aufreinigung mit höherer Ausbeute.

---

<sup>4</sup>Unter Optimalbedingungen liegt die Nachweisgrenze für den Bradford-Assay bei 1 µg/mL und für den BCA-Assays bei 0,1 µg/mL

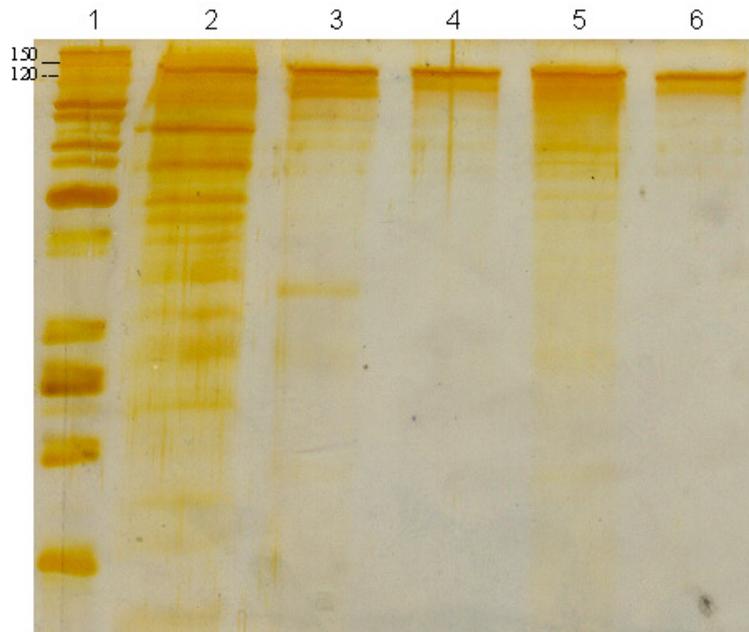


**Abbildung 3.11:** Chromatogramme der vier affinitätschromatographischen Aufreinigungen von Dll1Fc (blau: UV-Absorption bei 280 nm [AU], rot: Leitfähigkeit [ $\text{mS}/\text{cm}^2$ ], schwarz: Pufferzusammensetzung [%] (A: Bindungspuffer, B: Elutionspuffer)).



**Abbildung 3.12:** Elutionspeaks der vier affinitätschromatographischen Aufreinigungen von Dll1Fc.

Die Elutionspeaks der beiden Läufe der jeweiligen Methoden wurden vereinigt und in PBS umgepuffert. Mit diesen Proben wurde der im nächsten Abschnitt beschriebene Aktivitätstest durchgeführt.



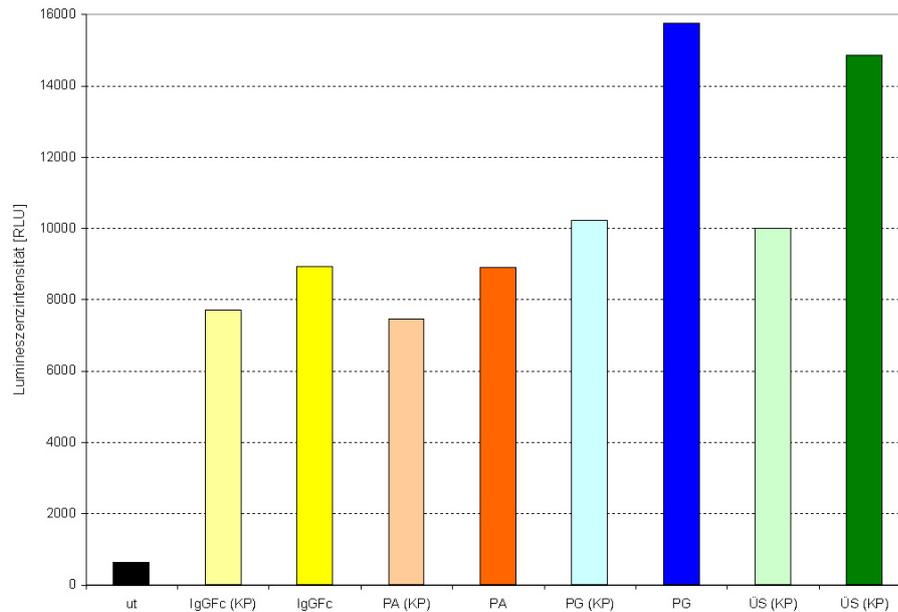
**Abbildung 3.13:** Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel von Elutionsfraktionen der vier affinitätschromatographischen Aufreinigungen von Dll1Fc. 1: Marker; 2: Aufkonzentrierter Zellkulturüberstand; 3: Protein G, 1. Lauf, Fraktion 28; 4: Protein A, 1. Lauf, Fraktion 27; 5: Protein G, 2. Lauf, Fraktion 26; 6: Protein A, 2. Lauf, Fraktion 27.

### 3.5 Aktivitätstestung

Der hier beschriebene Aktivitätstest wurde im Institut für Molekulare Kardiologie (AG Limbourg) der Medizinischen Hochschule Hannover etabliert und durchgeführt.

Die wie im Abschnitt 3.4 beschrieben aufgereinigten Proben, sowie aufkonzentrierter Zellkulturüberstand wurden in einem indirekten Aktivitätstest mit einem Luciferaseassay getestet. Hierfür wurden Zellkulturflaschen mit den Proben, beziehungsweise einem IgG-Fc-Fragment als Kontrolle beschichtet. Für den Assay wurden menschliche Nabelschnurendothelzellen (HUVECs, *human umbilical vein endothelial cells*), welche den Notch-Rezeptor tragen, in diesen Flaschen kultiviert. Sie wurden zuvor mit einem von zwei verschiedenen Plasmiden transfiziert. Eines enthielt die Bindungsstelle für den CSL-Co-Aktivator-Komplex (siehe auch Theorie zur Notch-Signaltransduktion in Abschnitt 2.2.3) stromaufwärts eines Luciferase-Gens (aus dem Leuchtkäfer), das andere fungierte als Kontrollplasmid und enthielt eine mutierte Bindungsstelle. Die nach dem Zusatz von Luciferin resultierende relative Lumineszenz ist in Abbildung 3.14 dargestellt.

Der Zellkulturüberstand und die über Protein G aufgereinigte Probe zeigten im Vergleich zu ihren Kontrollen deutlich Aktivität, nicht jedoch die über Protein A aufgereinigte Probe. Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass die Konzentration der Probe zu gering war um einen Effekt zu erzeugen. Die Probenhandhabung war identisch und der einzige Unterschied bei der Aufreinigung bestand darin, dass der Elutionspuffer bei der Protein G-Affinitätschromatographie acider war, was aber nur einen Aktivitätsverlust dieser Probe erklären würde. Der Aktivitätstest



**Abbildung 3.14:** Ergebnisse des Luciferase-Aktivitätsassays. Lumineszenzintensitäten (RLU: *relative luminescence units*) für eine untransfizierte Kontrolle (ut), die Kontrollprobe (IgGFc), die zwei aufgereinigten Proben (PA: aufgereinigt über Protein A, PG: aufgereinigt über Protein G), sowie aufkonzentrierten Zellkulturüberstand. Jeweils mit entsprechender Negativkontrolle per Kontrollplasmid mit mutierter Bindungsstelle (KP).

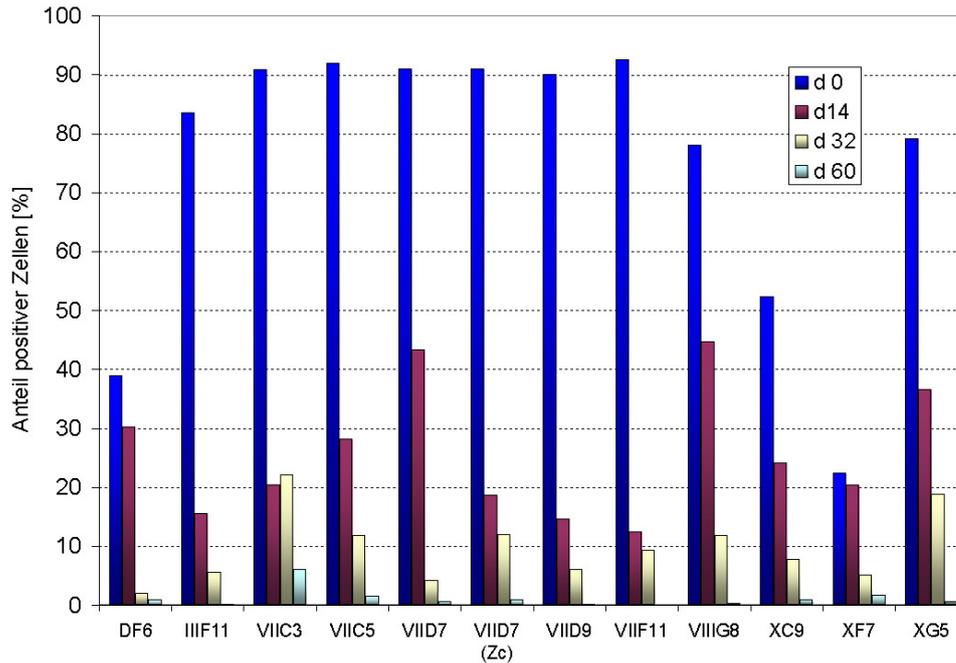
sollte mit Proben einer höheren Konzentration noch einmal wiederholt werden.

### 3.6 Expressionsstabilität

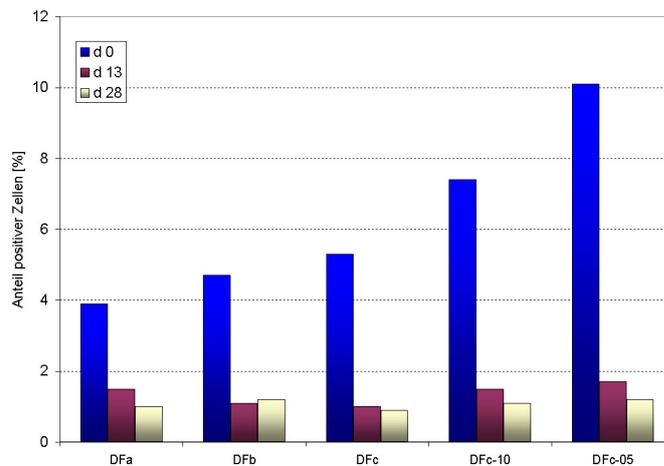
Bei der Aufreinigung von Dll1Fc aus Kultivierungsüberständen für eine Wiederholung des Aktivitätstestes wurde eine deutliche Abnahme der Ausbeute beobachtet. Nachdem Fehler bei der Durchführung und den verwendeten Materialien der Aufreinigung ausgeschlossen werden konnten, wurden die verwendeten Zellen auf Expressionsstabilität getestet. Da kein ELISA-Kit für Dll1Fc zur Verfügung stand, wurden die Zellen hierfür über 60 Tage (per Lipofektion erzeugte Zelllinien) bzw. 30 Tage (per  $\text{CaP}_i$ -Präzipitation erzeugte Zelllinien) in 15 mL-Schüttelkolben kultiviert und mehrfach durch intrazellulärer Färbung der Anteil Dll1Fc-positiver Zellen bestimmt. Es wurden hierfür jeweils die gleichen Antikörperkombinationen wie in Abschnitt 3.2 verwendet. Um zu überprüfen, ob Selektionsdruck einen Einfluss auf die Expressionsstabilität hat, wird die Zelllinie VIID7 zusätzlich unter Zusatz von Zeocin kultiviert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.15 und 3.16 dargestellt.

Wie in den Abbildungen 3.15 und 3.16 zu erkennen ist, nahm der Anteil produzierender Zellen schon nach 13 bzw. 14 Tagen bei fast allen Zelllinien deutlich ab. Bei den durch  $\text{CaP}_i$ -Präzipitation erzeugten Zelllinien konnten nach 13 Tagen keine produzierenden Zellen mehr nachgewiesen werden. Nach 60 Tagen hatten auch die durch Lipofektion erzeugten Zelllinien diesen Zustand erreicht (mit Ausnahme von 6% positiver Zellen bei VIIC3). Die Ausübung von Selektionsdruck hatte hierauf keinen Einfluss. Alle vorhandenen Zelllinien sind instabil und

### 3 Das Dll1Fc-Fusionsprotein



**Abbildung 3.15:** Anteile positiver Zellen der durch Lipofektion erzeugten Zelllinien zu Beginn der Kultivierung und nach 14, 32 und 60 Tagen (Zc: Kultivierung unter Zeocin-Zusatz).



**Abbildung 3.16:** Anteile positiver Zellen der durch CaP<sub>1</sub>-Präzipitation erzeugten Zelllinien zu Beginn der Kultivierung und nach 13 und 28 Tagen.

folglich nicht zur Produktion in präparativem Maßstab geeignet.

Die instabile Expression rekombinanter Proteine ist ein weit verbreitetes Problem, welches sowohl genetische als auch epigenetische Ursachen haben kann. Häufig wurde eine Abnahme der Kopienzahl des Transgens beobachtet [237][238][239][240][241][242][243]. Der Genverlust wird bedingt durch homologe Rekombinationsvorgänge während der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA, wie NAHR (*non-allelic homologous recombination*) und SSA (*single-strand annealing*) [244]. Die Kopienzahl des Transgens kann per quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) bestimmt werden, wenn der verwendete Vektor als Standard zur Kalibrierung eingesetzt wird. Neben einer Abnahme der Kopienzahl wurden auch häufig verringerte Mengen der transge-

nen mRNA-Menge bei gleich bleibender Kopienzahl [243][245][246] bzw. eine Abnahme der mRNA-Menge pro Kopie [240] beobachtet. Diese Phänomene können durch epigenetische Regulationsmechanismen ausgelöst werden. Dabei kann entweder, um das Transgen herum durch Modifikationen der Histone, ein Heterochromatinstatus erzeugt werden [247][248] oder, was häufiger beobachtet wurde, die Methylierung eines Promoters zur Stilllegung der entsprechenden Gene führen [248][249][250]. Für den hier verwendeten CMV-Promotor konnte nachgewiesen werden, dass seine Methylierung in transfizierten Zellen zur Inaktivierung führt [251][252]. Als Nachweismethode für die Inaktivierung durch Promotormethylierung, kann stellvertretend die Methylierung des Cytosins an Position -179 durch eine spezielle quantitative PCR bestimmt werden [235]. Eine Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungs-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin kann die Produktivität teilweise wieder herstellen [253]. Es können zudem Kopienzahlreduzierung und geringere Transkriptionsaktivität auch kombiniert auftreten [254][235].

Die hier nachgewiesene Instabilität kann auch erklären, warum die selektierten Zellen trotz Zeocin-Resistenz, sowie die Einzelzellklone, jeweils nur zum Teil das Zielprotein exprimierten. Die Zeiträume, welche zwischen den Transfektionen und den intrazellulären Färbungen (23 bzw. 59 Tage), sowie den Einzelzellablagen und den entsprechenden Messungen (38 Tage) lagen, entsprechen den Zeiträumen, in welchen massiver Produktivitätsverlust nachgewiesen werden konnte. Die Stabilität der Expression des Markergens (welches hier auch die Resistenz enthält) und des Zielgens müssen nicht korrelieren [234]. Dies konnte auch hier beobachtet werden. Der Klon VIID7 wuchs unter Zc-Zusatz, woraus eine Expression der Resistenz folgt, er exprimierte jedoch nicht das Zielprotein.

### 3.7 Zusammenfassung

Es konnten sowohl mittels Lipofektion als auch per Calciumphosphatpräzipitation die Zellen erfolgreich transfiziert werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch Lipofektion höhere Kopienzahlen erreicht werden konnten. Eine weitere Erhöhung der Transfektionseffizienz könnte sich durch Optimierung des Vektors erreichen lassen. Da die Plasmidaufnahme bei Säugerzellen umgekehrt proportional zu seiner Größe ist [255], könnte ein Entfernen des nicht benötigten *neo*-Gens, sowie der dann überflüssigen IRES eine höhere Transfektionseffizienz zur Folge haben. Zudem könnte dies auch die Produktivität erhöhen, da das über die IRES mit dem Zielgen verbundene *neo*-Gen möglicherweise die Expression des Zielgens herunterreguliert [231].

Die erhaltenen Zellen sezernierten das Produkt, welches sich durch Protein A- und G-Affinitätschromatographie aufreinigen ließ, wobei keine ausgeprägten Unterschiede zwischen diesen Methoden festgestellt werden konnten. Im auf einem Luciferase-Assay mit HUVECs basierende Aktivitätstest zeigte anschließend nur das über Protein G aufgereinigte Protein Aktivität. Dies liegt möglicherweise daran, dass die Konzentration in der über Protein A aufgereinigten Probe zu gering war. Eine Wiederholung der entsprechenden Experimente konnte aufgrund der

### 3 Das Dll1Fc-Fusionsprotein

---

instabilen Expression nicht durchgeführt werden.

Für die Gewinnung von Hochproduzenten wurden Einzelzellklonierungen und Sortierungen nach GFP-Fluoreszenz durchgeführt. Für die Einzelzellklonierungen hat sich der Einsatz eines FACS als sinnvoll erwiesen. Da die Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität zu einer Steigerung des Anteils positiver Zellen geführt hat, wäre es durchaus sinnvoll, diese beiden Methoden miteinander zu kombinieren, um ausschließlich Einzelzellklone zu erhalten, die Hochproduzenten sind.

Die Problematiken, die diesen Produktionsprozess erheblich erschwerten, waren die geringe Produktivität und Instabilität aller Zelllinien. Als Ursachen hierfür sind epigenetische Gen-Stillegung und/oder Kopienverlust am wahrscheinlichsten. Auch wenn es Möglichkeiten gibt, diese zu ergründen und im Falle der Promotormethylierungen sogar die Möglichkeit besteht diese teilweise rückgängig zu machen, so ist es aufgrund der Schwere der Instabilität voraussichtlich besser einen anderen Ansatz zu wählen. Es gibt zahlreiche Ansätze zur Erzeugung stabiler Produktionszelllinien. So kann die Integration des Expressionsvektors durch die Verwendung von *site*-spezifischen Nukleasen gezielt ablaufen [256]. Es können Expressionsvektoren verwendet werden, welche *chromatin opening elements* oder *matrix attachment regions* tragen, wodurch die Stillegung des transgenen Locus verhindert werden sollte [257][258]. Die Integration des GOI kann gezielt Rekombinase-vermittelt in ausgewählte Abschnitte erfolgen, z.B. durch die Verwendung der Rekombinase Cre in einen loxP-Locus [259] oder durch das Flp-FRT-System [260]. Zudem kann stabile Expression auch durch lentiviralen Gentransfer erreicht werden [261]. Ein Ansatz der bei der Erzeugung der Zelllinien für VEGF<sub>165</sub> und LIF verfolgt wurde.

## 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)

Die CHO<sup>SFS</sup>-Zellen wurden in der AG Schambach an der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem in Abbildung 4.1 dargestellten Vektor lentiviral transduziert (entsprechend Abschnitt 2.1.2.2). Der Vektor enthält das native Signalpeptid und keine zusätzlichen Marker- oder Selektionsgene. Das VEGF<sub>165</sub> wird mit einem C-terminalen Polyhistidin-Tag<sup>1</sup> exprimiert. Der Vektor entspricht damit vom Aufbau her prinzipiell dem Vektor, welcher für die (erfolgreiche) Produktion von LIF verwendet wurde (siehe Abschnitt 5).

Das verwendete Lentivirus HIV-1 tendiert dazu mit hoher Frequenz in transkriptionell aktives Chromatin zu integrieren [262]. Daher sollten auf diese Weise erstellte Produktionszelllinien, im Vergleich zu chemisch oder physikalisch transfizierten, höhere und stabilere Expressionslevel erreichen. Da es bei der Integration des viralen Genoms in das der Wirtszelle häufig zur Inaktivierung der viralen LTR-Promotoren kommt [119], müssen zusätzliche Promotoren zur Expression des GOI auf dem Vektor vorhanden sein. Da beim CMV-Promoter Stilllegung durch Methylierung ein häufiges Problem ist und dies auch nicht durch lentiviralen Gentransfer verhindert werden kann [263], wird hier der Promoter aus dem *spleen focus forming virus* (SFFV) verwendet. Dieser wurde bisher für die Erstellung von CHO-Produktionszelllinien noch nicht eingesetzt, aber durch seine Verwendung als interner Promoter in einem HIV-1-basierten Vektor konnten hohe und stabile Expressionslevel in humanen hämatopoetischen Zellen erreicht werden [263].

### 4.1 Lokalisierung- und Expressionsnachweise

#### 4.1.1 Intrazelluläres VEGF<sub>165</sub>

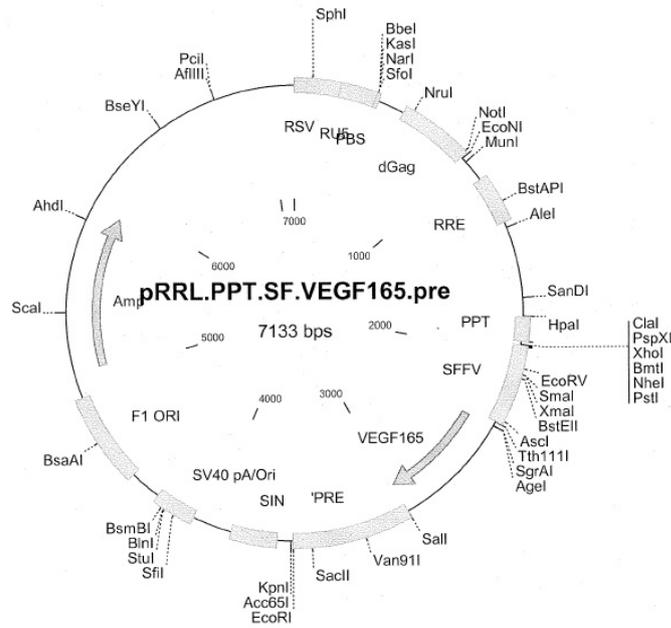
Zum Nachweis der Expression wurden die Zellen per durchflusszytometrischer intrazellulärer Färbung analysiert, bei welcher der Primärantikörper gegen den His-Tag gerichtet war. Die Ergebnisse (Abbildung 4.2) zeigen, dass 97,1% der Zellen das Zielprotein exprimieren.

Anschließend wurde, ebenfalls mit einem gegen den His-Tag gerichteten Primärantikörper ein Western Blot mit aufkonzentriertem Zellkulturüberstand durchgeführt (Durchführung siehe C.2.6). Da keine Bande auf dem Blot zu erkennen war, wurde dieser noch einmal wiederholt

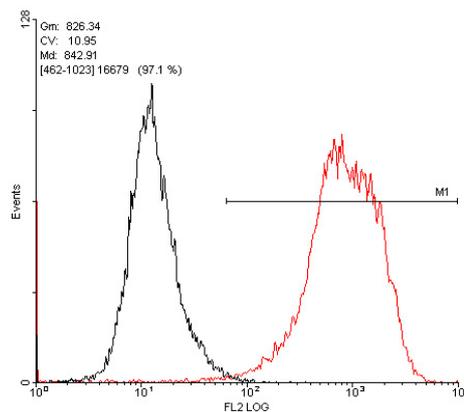
---

<sup>1</sup>Ein Aminosäuremotiv aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten (kurz: His-Tag)

## 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)



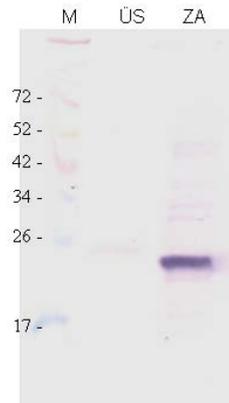
**Abbildung 4.1:** Schematische Karte des Vektors, welcher für die Erstellung der VEGF<sub>165</sub>-produzierenden Zelllinie verwendet wurde.



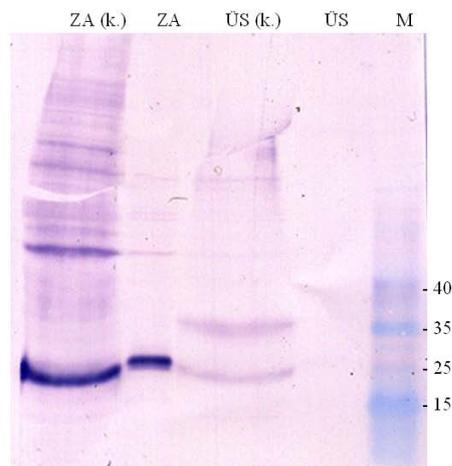
**Abbildung 4.2:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der VEGF<sub>165</sub>-positiven Zellen (rot) im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle (schwarz).

und neben dem Überstand auch Zellaufschluss aufgetragen (Protokoll für den Zellaufschluss siehe C.1.16). Das Ergebnis dieses Western Blots (Abbildung 4.3) zeigt, dass das Zielprotein zwar exprimiert, aber nicht, wie es zu erwarten gewesen wäre, sezerniert wird. Parallel erstellte CHO-Zelllinien, die als Transgene *tgf-β* und *bfgf* enthielten und nach dem gleichen Prinzip aufgebaut waren, also das Gen für das Zielprotein mit His-Tag und dem jeweils nativen Signalpeptid im selben Vektorrückgrad enthielten, zeigten dieselbe Problematik. In Abbildung 4.4 ist dies beispielhaft für die bFGF-Zelllinie dargestellt.

Als mögliche Ursache hierfür kommt das Signalpeptid in Frage, da dies das jeweilige Protein für den Export aus der Zelle markiert. Es ist bekannt, dass das bei der Expression von Transgenen verwendete Signalpeptid in direktem Zusammenhang mit dem Sezernierungslevel steht [264].



**Abbildung 4.3:** Western Blot von Zellaufschluss (ZA) und Überstand (ÜS) der VEGF<sub>165</sub>-Zelllinie (M: Marker).

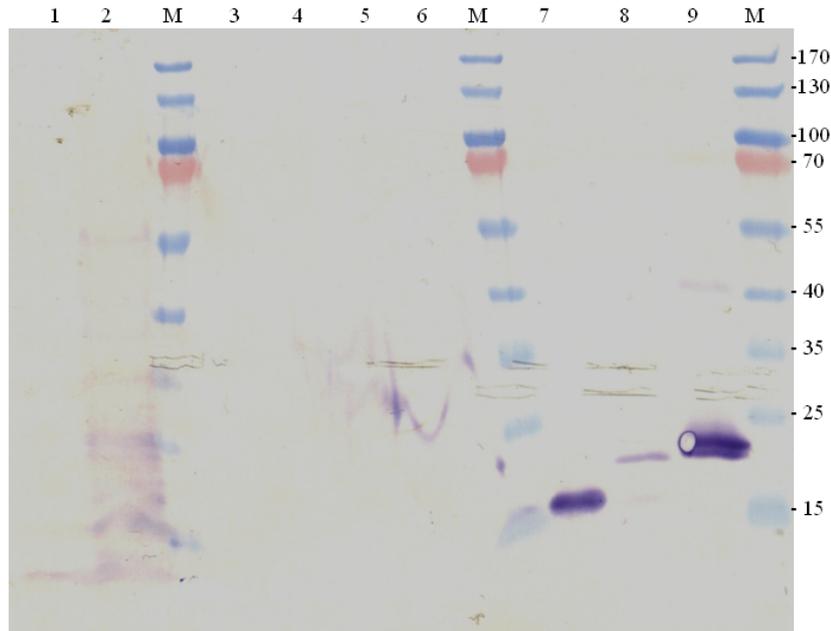


**Abbildung 4.4:** Western Blot vom Zellaufschluss (ZA) und Überstand (ÜS) der bFGF-Zelllinie (k.: konzentriert per TCA-Fällung; M: Marker).

Daher wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover von der AG Schambach neue Vektoren konstruiert, die zwei andere Signalpeptide verwenden: Das von murinem IgG- $\kappa$ , häufig in der Industrie verwendet und das der Luciferase aus *Gaussia princeps* (g.Luc.), in der Literatur als besonders geeignet beschrieben [265]. Als Zielproteine wurden TGF- $\beta$  und bFGF ausgewählt (jeweils His-getagt). Die Zelllinien wurden, wie die vorhergehenden auch, lentiviral transduziert. Wie in Abbildung 4.5 zu erkennen ist, konnte jedoch auch mit diesen Vektoren keine Sekretion erreicht werden. Die Zielproteine sind nur im Zellaufschluss der TGF- $\beta$ -exprimierenden Zellen mit IgG- $\kappa$ - (Spur 7) und g.Luc-Signalpeptid (Spur 9) und der bFGF-exprimierenden Zellen mit IgG- $\kappa$ - Signalpeptid (Spur 8) nachzuweisen. (Die unterschiedlichen Größen des TGF- $\beta$  in Spur 7 und 9 liegen vermutlich an einem unterschiedlichen Glykosilierungsgrad.)

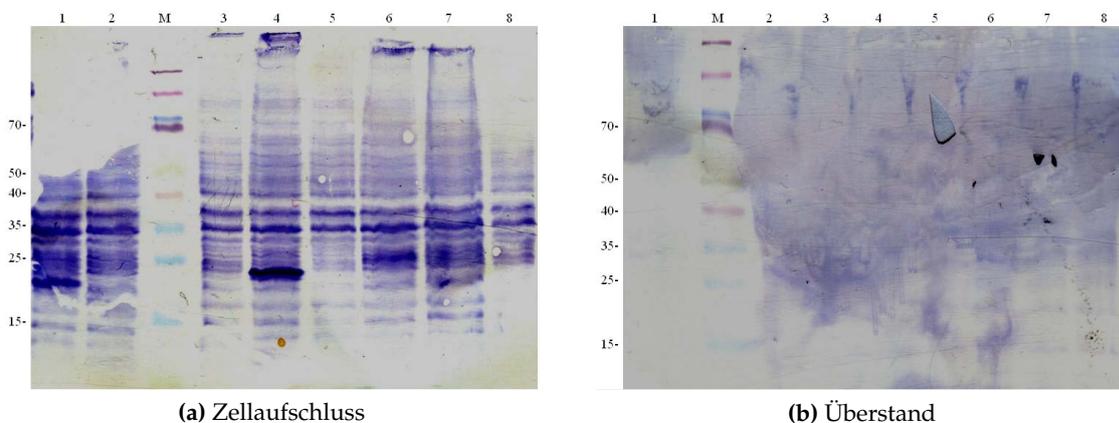
Da die Vermittlung der sekretorischen Expression ein komplexer Prozess ist, welcher von sehr vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst wird [264][266], sollte geklärt werden, ob mit einer Variation der Zelllinie oder der Transfektionsmethode Sekretion eines der Zielproteine erreicht werden könnte. Zu diesem Zweck wurden HEK293T-Zellen (*human embryonic kidney*) mittels Calciumphosphatpräzipitation mit verschiedenen Plasmiden transfiziert (Durchführung siehe

#### 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)



**Abbildung 4.5:** Ergebnis des Western Blots der Überstände und Aufschlüsse der Zelllinien transduziert mit den Vektoren, die die neuen Signalpeptiden enthalten (M: Marker, 1: ÜS(k.) TGF- $\beta$  (IgG- $\kappa$ ), 2: ÜS(k.) bFGF (IgG- $\kappa$ ), 3: ÜS(k.) TGF- $\beta$  (g.Luc), 4: ZA TGF- $\beta$  (IgG- $\kappa$ ), 5: ZA bFGF (IgG- $\kappa$ ), 6: ZA TGF- $\beta$  (g.Luc), 7: ZA(k.) TGF- $\beta$  (IgG- $\kappa$ ), 8: ZA(k.) bFGF (IgG- $\kappa$ ), 9: ZA(k.) TGF- $\beta$  (g.Luc) (ZA: Zellaufschluss, ÜS: Überstand, k.: konzentriert durch TCA-Fällung)).

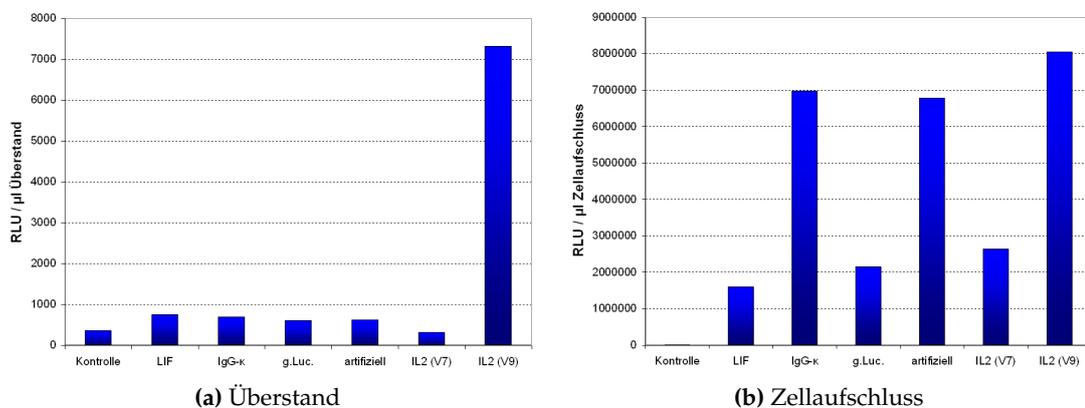
Abschnitte C.1.2 und C.1.14). Dabei wurden die Vektoren für ANGPL-5 (*Angiopoietin-related protein-5*), bFGF, hLIF, Activin A und VEGF mit den nativen Signalpeptiden, sowie für TGF- $\beta$  mit den Signalpeptiden von g.Luc. und IgG- $\kappa$  verwendet. (Bei den zuvor mittels lentiviralem Gentransfer erstellten Zelllinien für Activin A und ANGPL-5 konnte keine Expression nachgewiesen werden. Der Aufbau dieser Vektoren entsprach grundsätzlich dem in Abbildung 4.1.) Fünf Tage nach der Transfektion wurden jeweils 1 mL Kultivierungsüberstand und der Aufschluss der entsprechenden Menge Zellen per TCA-Fällung aufkonzentriert und per Western Blot mit Anti-His-Tag-Antikörper analysiert.



**Abbildung 4.6:** Ergebnisse der Western Blots der Zellaufschlüsse und Kultivierungsüberstände der HEK293T-Zellen. (1: TGF- $\beta$  (g.Luc.), 2: TGF- $\beta$  (IgG- $\kappa$ ), 3: ANGPL-5, 4: bFGF, 5: hLIF, 6: VEGF, 7: Activin A, 8: untransfizierte Zellen als Kontrolle).

Die Ergebnisse in Abbildung 4.6 zeigen, dass die Effizienz der Transfektion per Calciumphosphatpräzipitation sehr gering war. Nur bei zwei der sieben Ansätze konnte das entsprechende Protein nachgewiesen werden (in Abbildung (a) in Spur 1 bei 21 kDa und in Spur 4 bei 24 kDa). Beide Nachweise gelangen ausschließlich im Zellaufschluss, woraus folgt, dass das Ausbleiben der Sezernierung nicht durch die verwendete Zelllinie oder Transfektionsmethode begründet werden kann.

Für das Erreichen der Sekretion wurde ein weiterer Versuch durch Variation des Signalpeptides unternommen. Hierfür wurde von der AG Schambach, basierend auf dem Vektor in Abbildung 4.1, ein Vektor konstruiert, welcher das Gen für Luciferase kombiniert mit verschiedenen Signalpeptiden enthält. Um zu überprüfen, ob die Luciferase sekretiert worden ist, konnte direkt die Lumineszenz des Zellaufschlusses und des Kultivierungsüberstandes vermessen werden. Neben den schon verwendeten Signalpeptiden von g.Luc., IgG- $\kappa$  und LIF wurden zusätzlich ein artifizielles und zwei Varianten des Signalpeptides von Interleukin-2 (IL2) getestet. Von Interleukinen abgeleitete Signalpeptide sind, sowohl bei der kommerziellen Proteinproduktion, als auch in der Gentherapieforschung weit verbreitet [267][268][269][270]. Die Vektoren wurden lentiviral in HEK293T-Zellen transduziert und nachdem eine ausreichende Zellzahl erreicht war, wurde die Lumineszenz bestimmt. In Abbildung 4.7 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt.



**Abbildung 4.7:** Ergebnisse der Lumineszenzmessung für Überstand und Zellaufschluss der HEK293T-Zellen nach Transduktion mit den Luciferase-Vektoren (RLU: *relative luminescence units*).

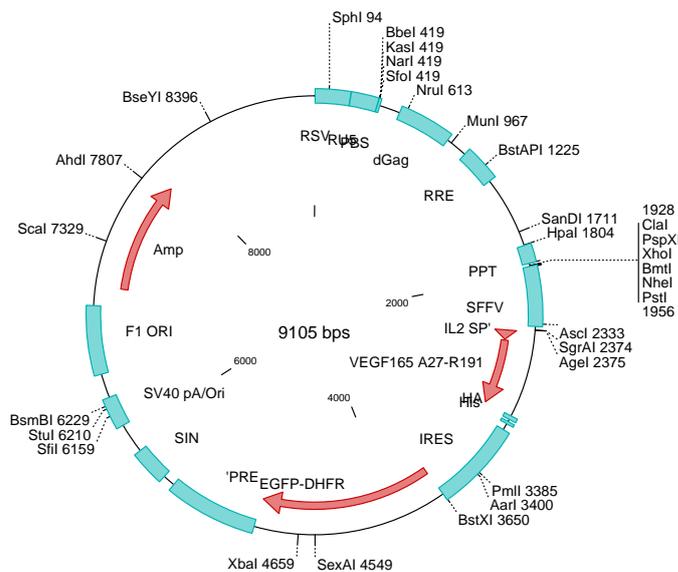
Die Ergebnisse der Lumineszenzmessungen zeigen, dass die Variante 9 des Signalpeptides von Interleukin-2 zu einer Sekretion der Luciferase führt. Jedoch zeigen die Ergebnisse auch die Komplexität der gesamten Problematik, denn mit dem nativen Signalpeptid von LIF konnte im Gegensatz zu seiner Verwendung mit LIF als Zielprotein in CHO-Zellen (siehe Abschnitt 5.1) keine Sekretion erreicht werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist der Einfluss den das Signalpeptid nach seiner Abspaltung auf die Proteinreifung im ER nimmt. Dabei kann, je nach Kombination aus Signalpeptid und Protein, die Glykosylierung beeinflusst werden [271]. Dies beinhaltet auch die Markierung mit N-gebundenen Glykanen, welche wiederum Einfluss auf den Export des Proteins haben [272]. Obwohl eine einfache Übertragbarkeit der Ergebnisse nicht gegeben ist, sind die Resultate für das IL2-Signalpeptid vielversprechend, weshalb ein neuer

## 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)

VEGF<sub>165</sub>-Vektor erstellt wurde, welcher dieses beinhaltet.

### 4.1.2 Extrazelluläres VEGF<sub>165</sub>

Das neue Vektorkonstrukt enthält, neben dem Signalpeptid von Interleukin-2, das Markergen *egfp* (*enhanced green fluorescent protein*)<sup>2</sup> und das Selektionsgen *dhfr*. Diese werden als Fusionsprotein mit dem Zielgen über die enthaltene IRES zusammen als eine mRNA transkribiert. Zusätzlich sollte das Zielprotein C-terminal neben dem His- auch noch mit einem HA-Tag<sup>3</sup> exprimiert werden. Die Vektorkarte ist in Abbildung 4.8 dargestellt.



**Abbildung 4.8:** Schematische Karte des Vektors, der für die Erstellung der neuen VEGF<sub>165</sub>-produzierenden Zelllinie verwendet wurde.

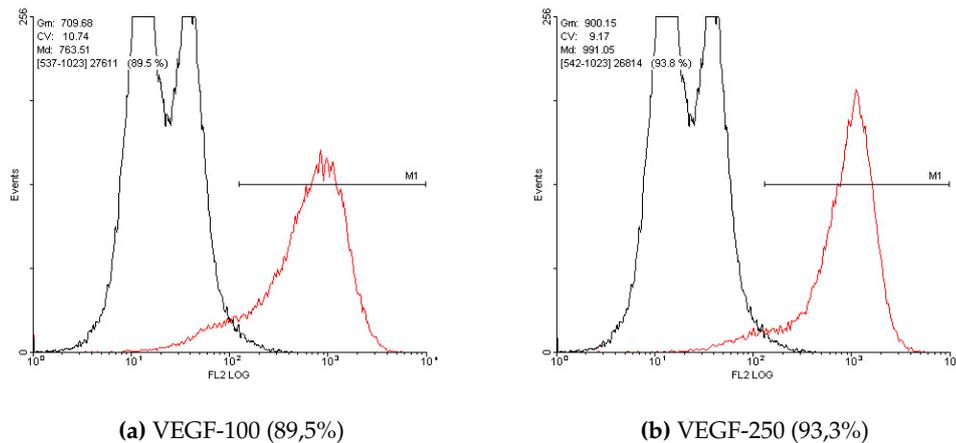
Für die Erstellung der Zelllinie wurden zwei Ansätze durchgeführt. Vom infektiösen Überstand der Packungszelllinie wurden zur Transduktion der CHO<sup>SFS</sup>-Zellen einmal 100 µL und einmal 250 µL verwendet. Die resultierenden Zelllinien werden im Weiteren als VEGF-100 und VEGF-250 bezeichnet. Eine genaue Berechnung der MOI (*multiplicity of infection*) ist nicht möglich, da der Virentiter vor der Transduktion nicht bestimmt wurde. Relativ ist die MOI für die VEGF-250-Zelllinie zweieinhalbmal so hoch.

Der Nachweis der Expression erfolgte auch hier per durchflusszytometrischer intrazellulärer Färbung. Die Ergebnisse für die beiden Zelllinien sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

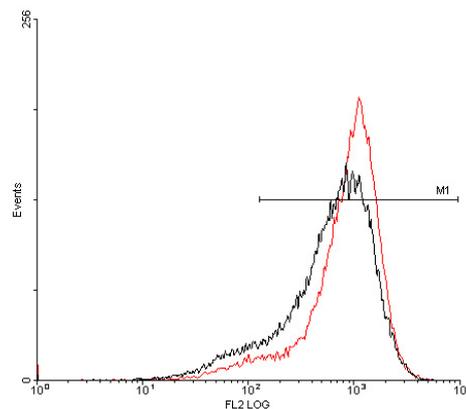
Die intrazelluläre Färbung ergab, in Bezug auf den Anteil der positiven Zellen, keinen signifikanten Unterschied für die beiden Zelllinien. Wenn man jedoch einen direkten Vergleich der Histogramme betrachtet (Abbildung 4.10), scheint es (unter Beachtung der logarithmischen Auftragung) so, als würde die Zelllinie VEGF-250 deutlich mehr VEGF<sub>165</sub> exprimieren.

<sup>2</sup>EGFP ist eine GFP-Variante die aus dem Wildtyp durch zwei Punktmutationen (S65T und F64L) erzeugt wurde.

<sup>3</sup>Ein HA-Tag besteht aus neun Aminosäuren und hat die Sequenz YPYDVPDYA, welche aus dem Hämagglutinin (HA) stammt.



**Abbildung 4.9:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der VEGF<sub>165</sub>-positiven Zellen (rot) im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle (schwarz) für die Zelllinien VEGF-100 und VEGF-250 (in Klammern angegeben ist jeweils der Anteil der VEGF<sub>165</sub>-positiven Zellen).



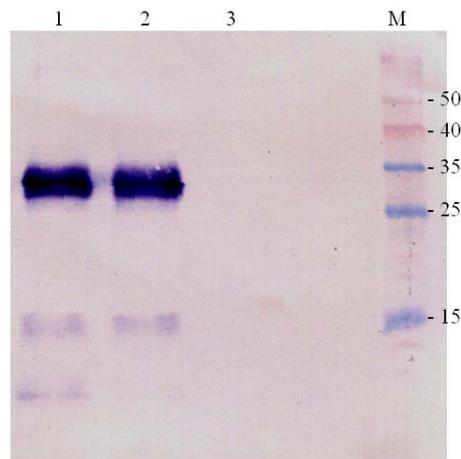
**Abbildung 4.10:** Überlagerung der Histogramme für VEGF-100 (schwarz) und VEGF-250 (rot) aus Abbildung 4.9.

Wenn die zu vergleichenden Zelllinien zu großen Teilen positiv sind, scheint die Aussagekraft dieser Auswertungsmethode an ihre Grenzen zu stoßen. Daher wurde hier eine noch weitreichendere Auswertungsmethode angewendet, welche auf der Annahme beruht, dass die gemessene intrazelluläre Proteinmenge sowohl proportional zur Fläche unter der entsprechenden Kurve als auch zur Expressionsstärke ist. Die Durchflusszytometrie-Software WinMDI ermöglicht einen Export der 1024 diskreten *events*-Messwerte, die anschließend mittels des Tabellenkalkulationsprogramms Excel mit ihren entsprechenden logarithmischen Fluoreszenzintensitätswerten multipliziert wurden, um einen Wert für die Fläche zu erhalten. Um eine Verfälschung der Vergleiche durch unterschiedliche Anzahlen an Messwerten zu verhindern, wurde der erhaltene Flächenwert durch die Anzahl der Gesamtereignisse geteilt und so der Flächenquotient  $A_q$  gebildet. Dieser beträgt für die VEGF-100-Zelllinie 724,08 und für die VEGF-250-Zelllinie 1015,22. Der Quotient aus diesen beiden Werten sollte ein Maß für die relative Expressionsstärke der beiden Zelllinien zueinander sein. Danach ist die Expressionsstärke der VEGF-

## 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)

250-Zellen 1,4 mal so hoch wie die der VEGF-100-Zellen. Um die Aussagekraft dieses Ergebnisses beurteilen zu können, sollten nun die relativen Expressionsstärken der beiden Zelllinien mittels des etablierten Verfahrens der qRT-PCR bestimmt werden (siehe Abschnitt 4.1.3).

Für den Sekretionsnachweis wurde wiederum ein Western Blot mit einem Anti-His-Tag-Antikörper durchgeführt, dessen Ergebnis in Abbildung 4.11 dargestellt ist. Hierfür wurden jeweils 500 µL Kultivierungsüberstand aufkonzentriert.



**Abbildung 4.11:** Western Blot (15% SDS-PAGE) des aufkonzentrierten Überstandes der Zelllinien VEGF-100 (1), VEGF-250 (2) und der untransfizierten Ursprungszelllinie (3) (M: Marker).

Der Western Blot zeigt, dass beide Zelllinien das Zielprotein sezernieren. Die Bande für das Zielprotein liegt bei etwas über 25 kDa, zusätzlich sind aber noch zwei weitere Banden bei ca. 15 und 12 kDa zu sehen. Die Tatsache, dass diese in der Kontrolle nicht vorliegen und offensichtlich den Anti-His-Tag-Antikörper binden, legt die Vermutung nahe, dass es sich um unvollständig translatierte Formen des Zielproteins handelt, welche den His-Tag tragen.

### 4.1.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die qRT-PCR wurden drei *house keeping genes* (HKGs) nach Bahr et al. (2009) ausgewählt [273]: *yaf2*, *eif3i* und *gapdh*. Mittels der Primer-BLAST Online-Software des *National Center for Biotechnology Information*<sup>4</sup> wurden geeignete Primer ausgewählt. Als Rahmenbedingungen wurden eine Länge zwischen 70 und 200 Basenpaaren (bp) und möglichst ähnliche Schmelzpunkte gewählt. Die Sequenzen dieser Primer und derer für das GOI *vegf* finden sich in Abschnitt B.4.2.

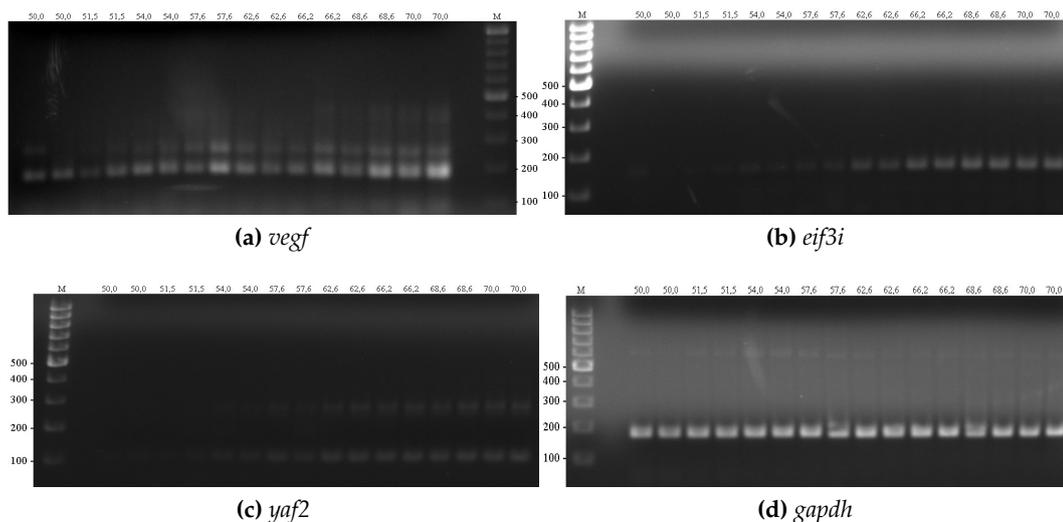
Mit dem Qiagen RNeasy Plus Mini Kit wurde aus Ansätzen von jeweils 10<sup>6</sup> Zellen die RNA isoliert (Protokoll siehe Abschnitt C.5.1). Das erhaltene Präparat wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 quantifiziert. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (Protokoll siehe Abschnitt C.5.2). Mit dieser konnten jetzt PCRs und qRT-PCRs durchgeführt werden.

<sup>4</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

**Tabelle 4.1:** Erwartete Produktlängen und ermittelte optimale Anlagerungstemperaturen für die vier verwendeten Primerpaare.

Primerpaar	Produktlänge	Temperaturoptimum
<i>vegf</i>	177 bp	50,0 °C
<i>eif3i</i>	150 bp	68,6 °C
<i>yaf2</i>	100 bp	54,0 °C
<i>gapdh</i>	69 bp	50,0 °C

Um die optimalen Anlagerungstemperaturen für die einzelnen Primer zu ermitteln, wurden zunächst Optimierungsversuche mittels PCR durchgeführt. Dafür wurden sechzehn Ansätze pro Primerpaar angefertigt und eine PCR mit Temperaturgradient (50-70°C) durchgeführt (Protokoll siehe Abschnitt C.5.3). Es wurden acht verschiedene Temperaturen jeweils per Doppelbestimmung getestet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden per Agarosegel (Durchführung siehe Abschnitt C.5.4) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12 dargestellt und in Tabelle 4.1 zusammengefasst.



**Abbildung 4.12:** Agarosegele der Temperaturoptimierungsexperimente für die vier Primerpaare. (M: Marker; Angegeben sind die Temperaturen in °C und die Größen in bp).

Mit den so ermittelten optimalen Anlagerungstemperaturen wurde nun die qRT-PCR durchgeführt (Protokoll siehe Abschnitt C.5.6). Es wurde die iQ5 RT-PCR-Station von Bio-Rad verwendet, dessen Software automatisch die Ct-Werte der entsprechenden Messungen berechnet. Aus diesen wurde (mittels der ebenfalls in Abschnitt C.5.6 erläuterten Auswertung) das relative Expressionslevel von VEGF<sub>165</sub> in den beiden Zelllinien berechnet. Nach diesem ist die Expression in den VEGF-250-Zellen 1,8 mal so stark ist, wie in den VEGF-100-Zellen. Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem aus den durchflusszytometrischen A<sub>q</sub>-Werten bestimmten Verhältnis von 1,4 überein. Somit konnte diese Art der Bestimmung durch die etablierte qRT-PCR-Technik bestätigt werden.

### 4.2 Selektion von Hochproduzenten und Expressionsstabilität

#### 4.2.1 Extrazelluläres VEGF<sub>165</sub>

Für die Selektion von Hochproduzenten per FACS wurde die VEGF-250-Zelllinie gewählt, da ihre ursprüngliche Expressionsstärke höher ist, als die der VEGF-100-Zellen.

Es wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, die miteinander verglichen werden sollten. Zum Einen wurden die Zellen anhand ihrer eGFP-Expressionsstärke indirekt nach Hochproduzenten sortiert, zum Anderen wurde ein Kälteinkubationsassay (CIA, *cold incubation assay*) verwendet, um eine direkte Hochproduzentenselektion zu ermöglichen. Der Kälteinkubationsassay beruht auf einer von Brezinsky et al. (2003) entwickelten Methode [274]. Er beruht auf der Tatsache, dass sekretiertes Protein während der Sekretion transient mit der Zelloberfläche assoziiert ist und dadurch mit einem proteinspezifischen Antikörper detektierbar wird. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man bei den erhaltenen Subzelllinien neben hoher Expression auch die Sezernierung berücksichtigt hat.

Es wurden für beide Ansätze zwei Sortierungen durchgeführt, bei denen jeweils die 10% bzw. 30% am stärksten fluoreszierenden Zellen isoliert wurden (Werte unter 10% sind am verwendeten FACS-Vantage SE nur schwer zu reproduzieren). Die erhaltenen Zelllinien wurden V250-GFP10, V250-GFP30, V250-CIA10 und V250-CIA30 genannt (Eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit erstellten VEGF-Zelllinien ist im Anhang in Tabelle A.2 gegeben). Sie wurden ebenso wie die Parentalzelllinie VEGF-250 am Durchflusszytometer per intrazellulärer Färbung vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Eine Bestimmung der Produktivität war nicht möglich, da für in Eukaryoten produziertes VEGF keine ELISA-Kits kommerziell erhältlich sind<sup>5</sup>.

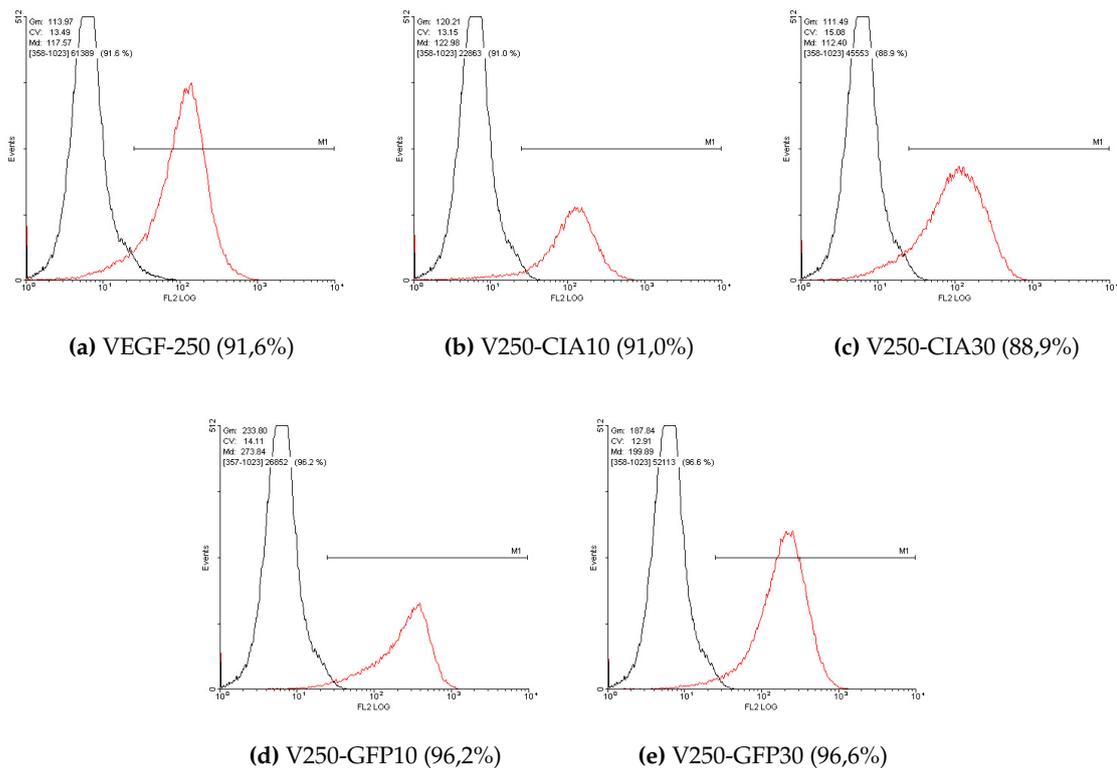
Für die Messungen wurde das Messprogramm des Durchflusszytometers neu eingestellt und kompensiert. Um zu verhindern, dass eine Verschiebung der Ergebnisse zu höheren Fluoreszenzintensitäten dazu führt, dass Messwerte oberhalb des höchsten FL2-Kanales auftreten, was die Auswertungen erheblich verzerren würde. Hierdurch kommen auch die Abweichungen der Ergebnisse von VEGF-250 mit denen aus Abschnitt 4.1.2 zustande.

Neben dem Anteil an VEGF<sub>165</sub>-positiven Zellen wurde auch der Anteil an eGFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Damit sollte zum Einen kontrolliert werden, ob die eGFP-Sortierung erfolgreich war. Der Anteil der eGFP-positiven Zellen bei den Zelllinien V250-GFP10 und V250-GFP30 müsste dann deutlich erhöht sein. Zum anderen sollte untersucht werden, ob eine direkte Korrelation zwischen eGFP- und VEGF<sub>165</sub>-Expression besteht, dann müsste der eGFP-positiv-Anteil bei den Zelllinien V250-CIA10 und V250-CIA30 proportional zum VEGF<sub>165</sub>-positiv-Anteil erhöht sein. Die Ergebnisse dieser durchflusszytometrischen Messungen sind in Abbildung 4.14 dargestellt.

---

<sup>5</sup>Es sind ELISA-Kits für VEGF erhältlich, die jedoch Antikörper enthalten, bei welchen in *E.coli* produziertes VEGF das Antigen ist. Laut Herstellerangaben würde eine Verwendung mit glykolisiertem VEGF eine verminderte Bindungsfähigkeit und dadurch zu geringe Ergebniswerte zur Folge haben.

## 4.2 Selektion von Hochproduzenten und Expressionsstabilität



**Abbildung 4.13:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der VEGF<sub>165</sub>-positiven Zellen (rot) im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle (schwarz) für die per eGFP-Sortierung und Kälteinkubationsassay erzeugten Subzelllinien sowie ihre Parentalzelllinie VEGF-250 (in Klammern ist jeweils der Anteil der VEGF<sub>165</sub>-positiven Zellen angegeben).

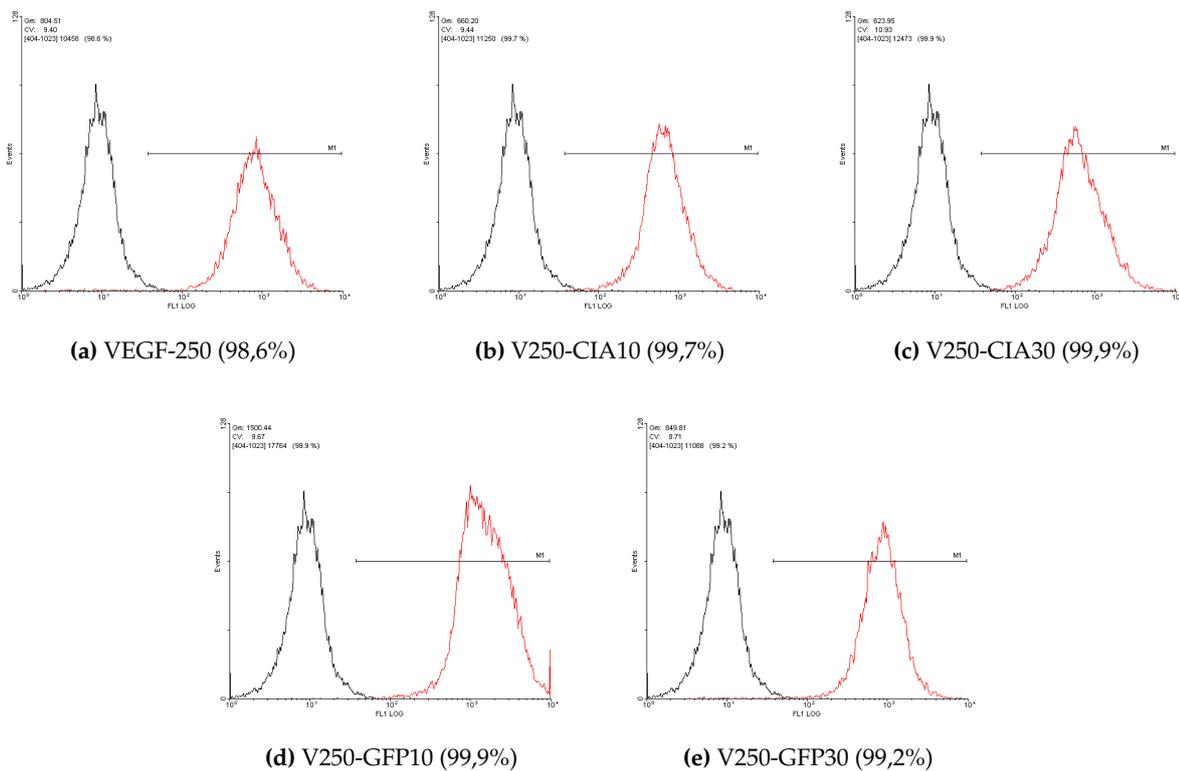
Da die Anteile der positiven Zellen, besonders bei den eGFP-Messungen, sehr hoch sind, lassen sich kaum aussagekräftige Angaben über die Güte der Ergebnisse der Sortierungen machen. Daher wurden zusätzlich die  $A_q$ -Werte der Messungen bestimmt. Diese sind zusammen mit den Anteilen der positiven Zellen in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

**Tabelle 4.2:** Zusammenfassung der Messergebnisse der durchflusszytometrischen VEGF<sub>165</sub>- und eGFP-Bestimmungen der durch eGFP-Sortierung und Kälteinkubationsassay erzeugten Zelllinien sowie ihre Parentalzelllinie VEGF-250.

Zelllinie	Anteil VEGF <sub>165</sub> -positiv [%]	$A_q$ (VEGF <sub>165</sub> )	Anteil eGFP-positiv [%]	$A_q$ (eGFP)
VEGF-250	91,6	142,0	98,6	973,1
V250-CIA10	91,0	156,7	99,7	801,4
V250-CIA30	88,9	150,8	99,9	812,8
V250-GFP10	96,2	333,8	99,9	1927,0
V250-GFP30	96,6	259,3	99,2	1005,9

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Sortierungsansätze zu einer Produktivitätssteigerung geführt haben. Die  $A_q$ -Wert-Steigerungen durch den Kälteinkubationsassay sind jedoch sehr gering und der Unterschied zur Ursprungszelllinie nahezu zu vernachlässigen. Bemerkenswert ist auch, dass die  $A_q$ (eGFP)-Werte geringer sind. Eine direkte Korrelation der Genexpressio-

## 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)



**Abbildung 4.14:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der eGFP-positiven Zellen (rot) im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle (schwarz) für die per eGFP-Sortierung und Kälteinkubationsassay erzeugten Zelllinien sowie ihrer Parentalzelllinie VEGF-250 (in Klammern ist jeweils der Anteil der eGFP-positiven Zellen angegeben).

nen scheint nicht zu bestehen, sonst wäre auch hier eine leichte Erhöhung zu erwarten gewesen. Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse der eGFP-Sortierung, wobei neben einer höheren eGFP-Expression auch eine deutliche Steigerung der VEGF<sub>165</sub>-Expression erreicht werden konnte. Für beide Sortierungsansätze konnten durch Auswahl der 10% am stärksten fluoreszierenden Zellen bessere Ergebnisse erzielt werden, als wenn die am stärksten fluoreszierenden 30% ausgewählt wurden. Von allen Subzelllinien wurden anschließend Zellbanken angelegt.

Um zu überprüfen, ob die Transgenexpression stabil ist, wurden alle fünf Zelllinien über einen Zeitraum von 27 Tagen kultiviert und anschließend alle Messungen wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Die Anteile der VEGF<sub>165</sub>-positiven Zellen sind in erster Näherung stabil. Eine Ausnahme bildet V250-GFP30. Bei diesen ist auch der A<sub>q</sub>(VEGF<sub>165</sub>)-Wert gesunken ist. Ansonsten sind die Anteile nahezu stabil und die A<sub>q</sub>-Werte weisen insgesamt eher einen Trend nach oben auf. Die A<sub>q</sub>-Werte weisen auch deutlicher auf einen Unterschied zwischen den per CIA sortierten und den ursprünglichen Zellen bezüglich der Expression des Zielproteins hin. Die Erzeugung von höher produzierenden Subzelllinien mittels dieser Methode war erfolgreich. In der Originalarbeit von Brezinsky et al. (2009) konnte für eine CHO-Zelllinie (welche transgen ein IgG-Fusionsprotein

**Tabelle 4.3:** Zusammenfassung der Messergebnisse der durchflusszytometrischen VEGF<sub>165</sub>- und eGFP-Bestimmungen der per eGFP-Sortierung und Kälteinkubationsassay erzeugten Zelllinien sowie ihre Parentalzelllinie VEGF-250 nach 27 Tagen Kultivierung.

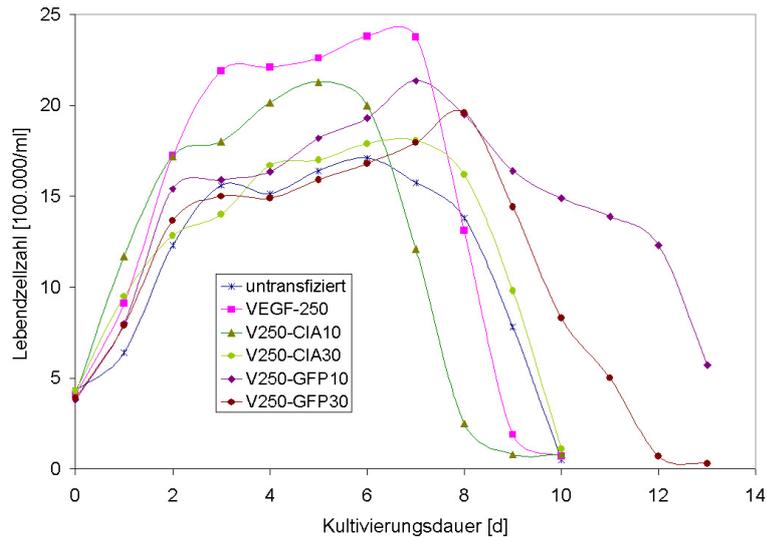
Zelllinie	Anteil VEGF <sub>165</sub> - positiv [%]	A <sub>q</sub> (VEGF <sub>165</sub> )	Anteil eGFP- positiv [%]	A <sub>q</sub> (eGFP)
VEGF-250	98,1	138,528	99,9	832,69
V250-CIA10	94,3	208,143	99,9	790,03
V250-CIA30	82,6	180,765	99,9	602,95
V250-GFP10	96,7	357,291	100,0	1523,35
V250-GFP30	83,4	227,142	99,9	960,08

exprimiert) durch dreifache Sortierung eine Produktivitätssteigerung um den Faktor 10 erreicht werden, wobei sich die Produktivität durch die erste Sortierungsrunde versechsfachte [274]. Ein bedeutender Unterschied lag jedoch darin, dass die Transfektion dort durch Elektroporation erfolgte und die Transfektionseffizienz deutlich unter 50% lag. Nach der ersten Sortierungsrunde wurde folglich eine Population erhalten, die nur noch aus Produzenten besteht und daher auch eine deutlich höhere Produktivität aufweist. Die zweite und dritte Sortierung erfolgte jeweils aus einer reinen Produzentenkultur, wie sie auch hier nach der lentiviralen Transduktion (Effizienz nahezu 100%) vorlag. Dabei konnten Produktivitätssteigerungen um Faktor 1,5 und 1,1 erreicht werden, was mit den hier erhaltenen Faktoren für die Erhöhung des A<sub>q</sub>-Wertes ungefähr übereinstimmt. Die CIA-Methode scheint gut geeignet zu sein, um reine Produzentenkulturen zu erzeugen, nicht jedoch um die Produktivität von diesen bedeutend zu steigern.

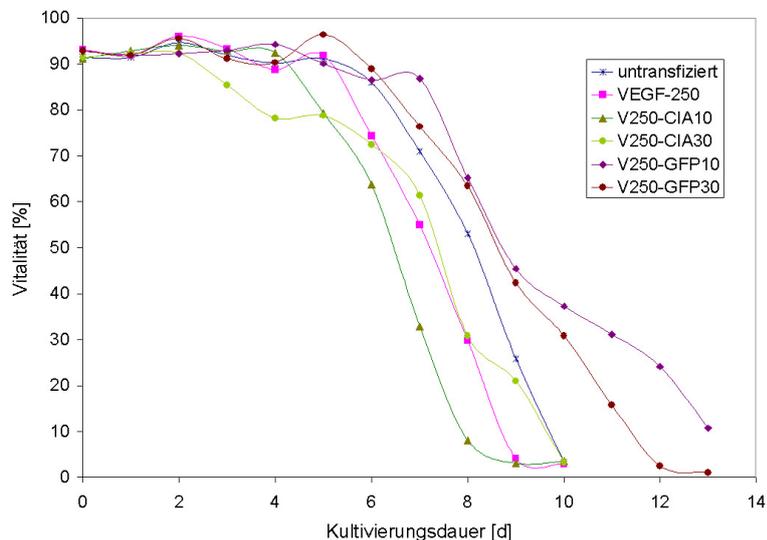
In Bezug auf die Werte für die eGFP-Expression sind zwar alle Zellen komplett positiv, dennoch ist die Expressionsintensität in drei von fünf Fällen gesunken. Dies korreliert nicht mit den Werten für die VEGF<sub>165</sub>-Expression, obwohl beide Proteine in eine mRNA transkribiert werden. Es ist bekannt, dass über eine IRES verbundene Gene nicht in gleichem Verhältnis translatiert werden. Normalerweise ist die Expression des *downstream* der IRES gelegenen Gens deutlich weniger effektiv [275]. In Bezug auf die Stabilität des Expressionsverhältnisses zweier über eine IRES verbundener Gene in CHO-Zellen gibt es jedoch bisher keine Untersuchungen. *In vivo* ist die Translation von einer IRES ausgehend, z.B. während der Mitose oder dem programmierten Zelltod, im Gegensatz zu einer Translation von der 5'-Cap-Struktur ausgehend, bevorzugt [130][276]. Dies legt nahe, dass das Verhältnis auch hier Schwankungen aufweist, welche die Ergebnisse erklären würden.

Um endgültig eine Zelllinie für die Produktion auszuwählen, sollte zudem das Wachstumsverhalten untersucht werden. Dafür wurden die fünf VEGF-Zelllinien, sowie untransfizierte Zellen zum Vergleich, in 15 mL-Schüttelkolbenkulturen kultiviert und mit dem TC10 Automated Cell Counter die Lebendzellzahl und Vitalität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 dargestellt.

Die maximal erreichbare Zelldichte lag für alle VEGF<sub>165</sub>-produzierenden Zellen oberhalb der untransfizierten Zellen. Die Kultivierungseigenschaften von V250-CIA30 weichen nur leicht von denen der untransfizierten Zellen ab. Die Zelllinien VEGF-250 und V250-CIA10 zeichnen



(a) Lebendzellzahlverlauf



(b) Vitalitätsverlauf

**Abbildung 4.15:** Lebendzellzahl- und Vitalitätsverläufe für die aus den zwei Sortierungen erhaltenen Subzelllinien, sowie der beiden Parentalzelllinien.

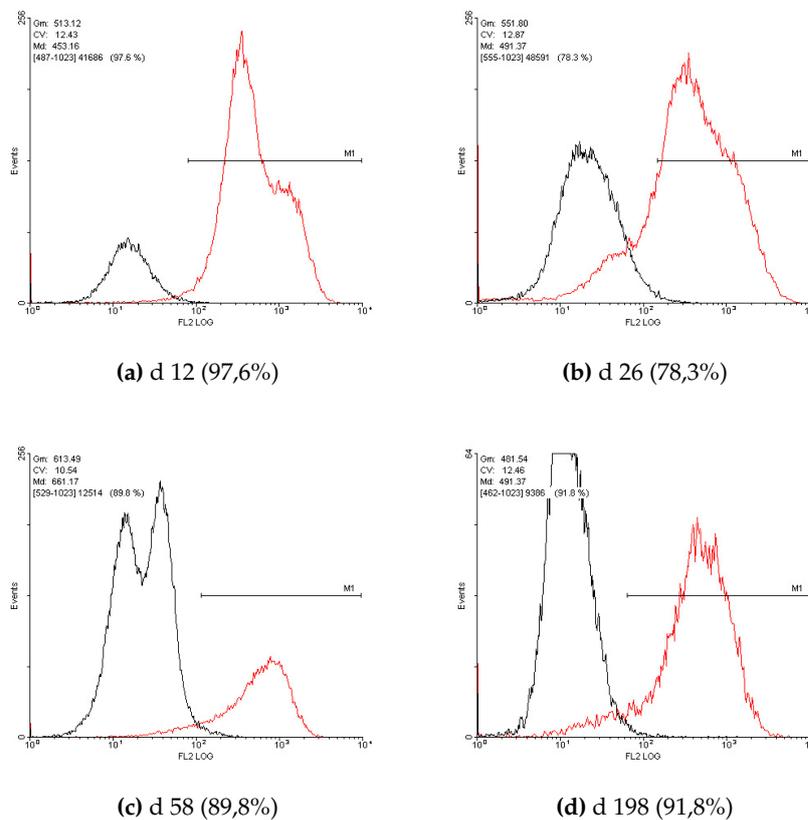
sich besonders durch hohe Zelldichten aus, während bei V250-GFP10 und V250-GFP30 eine deutlich verminderte Sterberate vorlag. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das VEGF<sub>165</sub> selbst einen Effekt auf die Proliferation und/oder die Sterberate der Zellen hat. In der Literatur sind sowohl ein proliferationsfördernder [277] als auch kein Effekt auf die Proliferation von CHO-Zellen zu finden [278] und auch in Bezug auf die Sterberate ist eine Abnahme beobachtet worden [277]. Für Mammakarzinomzellen gibt es Indizien, dass VEGF neben der angiogenen auch eine apoptosehemmende Wirkung hat [279]. Die vermutete Wirkungsweise beruht auf einer Hemmung von proapoptotischen Faktoren wie BAD und Caspase 9 [280], woraus eine verminderte Sterblichkeitsrate resultieren würde. Durch die exogene Zugabe geringer Mengen VEGFs zu Kulturen nicht-produzierender Zellen ließ sich dieser Effekt jedoch nicht reproduzieren [277]. Da die molekularbiologischen und biochemischen Veränderungen durch eine Trans-

duktion sehr komplex sind, lässt sich nicht zweifellos sagen, dass die VEGF-Produktion diese Effekte auslöst.

Für die Produktion des VEGF<sub>165</sub> wird die Subzelllinie V250-GFP10 ausgewählt, da sie neben dem höchsten A<sub>q</sub>(VEGF<sub>165</sub>)-Wert, eine der höchsten Maximalzellichten und zudem die höchsten Vitalitäten ab einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen aufweist.

### 4.2.2 Intrazelluläres VEGF<sub>165</sub>

Für die Zelllinie, die das VEGF<sub>165</sub> nicht sezerniert, wurde nicht versucht eine hochproduzierende Zelllinie zu erstellen, da zur Produktion die sezernierenden Zellen verwendet werden sollten.



**Abbildung 4.16:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der VEGF<sub>165</sub>-positiven Zellen (rot) im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle (schwarz) für die nicht sezernierende VEGF<sub>165</sub>-Zelllinie (in Klammern sind jeweils die Anteile positiver Zellen angegeben).

Die Testung der Langzeitexpressionsstabilität fand in Übereinstimmung zur Durchführung mit den sezernierenden Zellen statt. Da hier jedoch kein Markergen auf dem Vektor enthalten war, wurde nur die Expressionsstabilität in Bezug auf das Zielprotein überprüft. Die Zellen wurden dafür nach 12, 26, 58 und 198 Tagen vermessen (Abbildung 4.16) und mit dem Ergebnis aus Abbildung 4.2 verglichen. Zusätzlich wurden die A<sub>q</sub>-Werte bestimmt, welche mit den anderen

## 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)

Ergebnissen in Tabelle 4.4 zusammengefasst sind.

**Tabelle 4.4:** Zusammenfassung der Messergebnisse der durchflusszytometrischen VEGF<sub>165</sub>-Bestimmungen der nicht-sezernierenden VEGF<sub>165</sub>-Zelllinie während einer Kultivierung über 198 Tage.

Kultivierungsdauer	Anteil VEGF <sub>165</sub> -positiv [%]	A <sub>q</sub> (VEGF <sub>165</sub> )
0 d	97,1	1036,0
12 d	97,6	693,7
26 d	78,3	636,2
58 d	89,8	690,8
198 d	91,8	591,3

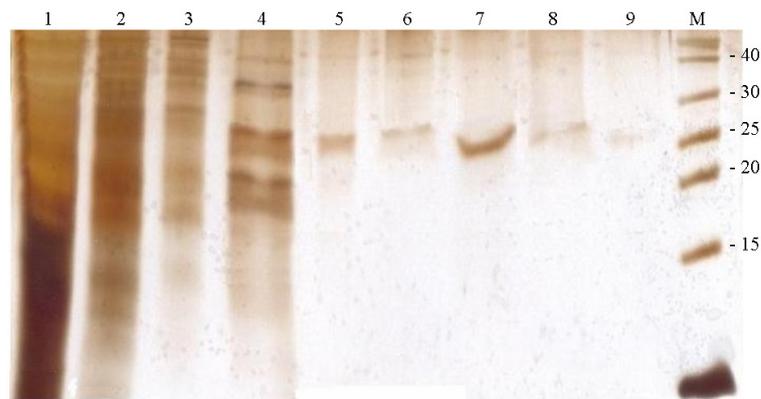
Die Werte für die Anteile der positiven Zellen nehmen bis Tag 26 ab und anschließend wieder zu. Das dies der tatsächliche Verlauf ist, ist nicht nur unwahrscheinlich, sondern widerspricht auch den Ergebnissen für die A<sub>q</sub>-Werte, welcher nach zwölf Tagen abgenommen hat, aber danach nahezu konstant bleibt. Wenn man die Kurven in den Abbildungen 4.2 und 4.16 betrachtet, fällt auf, dass jene für die Messungen ähnliche Verläufe und Schwerpunkte haben, während die für die Kontrollen stärkere Unterschiede aufweisen. Bei den Messungen deren Positivanteile unter 90% liegen, sind sie zu höheren FL2-Werten hin verschoben, woraus die kleineren Ergebniswerte resultieren. Die Kurve für die Negativkontrolle ergibt sich aus unspezifischen Bindungen der Antikörper an die Zellen, welche deutlich stärker von den Rahmenbedingungen abhängen. Aus der Entwicklung der Messkurven und den dazu proportionalen A<sub>q</sub>-Werten kann man folgern, dass die Expression nach einer anfänglichen Abnahme auch über sehr lange Kultivierungszeiträume von bis zu 198 Tagen stabil ist.

### 4.3 Aufreinigung

#### 4.3.1 Intrazelluläres VEGF<sub>165</sub>

Für die Aufreinigung des nicht-sezernierten VEGF<sub>165</sub> müssen die Zellen aufgeschlossen werden, woraus eine zusätzliche starke Verunreinigung des Zielproteins resultiert. Für die Aufreinigung wurden diverse chromatographische Verfahren getestet: Ionenaustausch-, Größenausschluss-, Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts- (IMAC) und eine direkte Immunoaffinitätschromatographie mit auf Epoxy-Discs immobilisiertem anti-VEGF<sub>165</sub>-Antikörper und, da VEGF eine Heparin-bindende Domäne besitzt [281][282], auch Heparin-Affinitätschromatographie. Mit keinem dieser Verfahren, auch nicht als Zweischrittaufreinigung in Kombination mit einem anderen Verfahren, gelang es VEGF<sub>165</sub> komplett aufzureinigen. Als Alternative zu diesen FPLC-basierten Verfahren wurde zusätzlich eine Aufreinigung mittels anti-VEGF-Antikörperbeladener *magnetic beads* getestet. *Magnetic Beads* sind kleine paramagnetische Kügelchen, die primäre Aminogruppen an ihrer Oberfläche tragen, die mit Hilfe von Glutaraldehyd mit einem anti-VEGF<sub>165</sub>-Antikörper kovalent gekoppelt wurden. Die beladenen *magnetic beads* können sich im Versuchsansatz bei Bindungs- und Waschschrinen frei bewegen und zur Trennung von der jeweiligen Lösung mit einem Magneten an der Gefäßwand immobilisiert werden.

Es wurden zwei Ansätze durchgeführt, wobei die Inkubationszeiten der *magnetic beads* im behandelten Zellaufschluss vier und elf Stunden betragen. Dabei wurden nacheinander zwei verschiedene Elutionspuffer getestet. Der Erste enthielt 2 M MgCl<sub>2</sub> bei einem pH-Wert von 7,0, der Zweite 3 M MgCl<sub>2</sub> bei einem pH-Wert von 3,9. Das Protokoll ist im Abschnitt C.6.6 zu finden. Die bei der Aufreinigung erhaltenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert. Das Gel für den Ansatz mit vier Stunden Inkubationszeit ist in Abbildung 4.17 dargestellt. Beim Ansatz mit der elfstündigen Inkubationszeit wurde das gleiche Ergebnis erhalten. Vier Stunden Inkubationszeit sind folglich ausreichend.



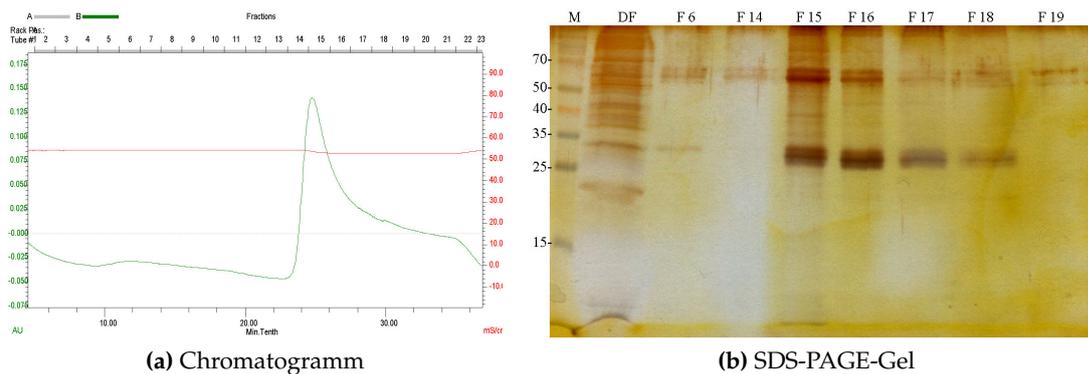
**Abbildung 4.17:** Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (15%) der VEGF<sub>165</sub>-Aufreinigung per *magnetic beads* mit vier Stunden Inkubationszeit. 1: Zellaufschluss nach Bindung; 2: Spülen nach Bindung; 3: 2. Spülen nach Bindung; 4: 1. Elution (Elutionspuffer 1); 5: Spülen nach 1. Elution; 6: 2. Elution (Elutionspuffer 1); 7: Spülen nach 2. Elution; 8: 3. Elution (Elutionspuffer 2); 9: Spülen nach 3. Elution; M: Marker; (die Proben 7-9 wurden per TCA-Fällung fünfzehnfach konzentriert.)

Die Bande bei ca. 25 kDa kann durch Vergleich mit dem Western Blot (Abbildung 4.3) VEGF<sub>165</sub> zugeordnet werden. Das VEGF<sub>165</sub>, welches beim ersten Elutionsschritt eluiert wird (Spur 4), liegt noch verunreinigt vor, die vorhergehenden Spülschritte müssen folglich optimiert werden. Beim zweiten Elutionsschritt (Spur 6) konnte reines VEGF<sub>165</sub> gewonnen werden. Die Menge, die durch den zweiten Elutionspuffer noch zusätzlich von den *magnetic beads* gelöst werden konnte (Spur 8, fünfzehnfach konzentriert), ist sehr gering, woraus folgt, dass Elutionspuffer 1 für diesen Zweck ausreichend ist. Die durch die zweite Elution erhaltene Lösung wurde in PBS umgepuffert, mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 quantifiziert und einem Aktivitätstest unterzogen (siehe Abschnitt 4.4.3). Die Quantifizierung ergab eine Gesamtmenge von 64,5 ng, welche aus dem Aufschluss von  $50 \cdot 10^6$  Zellen gewonnen werden konnte. Bei der Ernte liegt durchschnittlich eine Zelldichte von etwa  $1,6 \cdot 10^6$  Zellen/mL vor, woraus sich eine Ausbeute von 2,1 µg/L ergibt. Diese sehr geringe Ausbeute lässt sich zum Teil damit erklären, dass ein Teil des Produktes beim Waschen und beim ersten Elutionsschritt, wo es noch verunreinigt vorliegt, verloren geht. Zudem müsste geklärt werden, ob für die gesamte Menge des im Aufschluss vorliegenden Produktes ausreichend Bindungsstellen an der stationären Phase vorhanden sind, bzw. ob sich nicht mit einer geringeren Menge Zellaufschluss die gleiche Produktmenge erreichen ließe.

### 4.3.2 Extrazelluläres VEGF<sub>165</sub>

Für die Aufreinigung des extrazellulären VEGF<sub>165</sub> sollte nicht mit antikörpergekoppelten *magnetic beads* gearbeitet werden. Zum Einen ermöglicht dieses System keinen *scale-up* und zum Anderen ist diese Methode durch die Verwendung der anti-VEGF<sub>165</sub>-Antikörper sehr kostenintensiv. Für die Aufreinigung wurden Heparin-Affinitätschromatographie, IMAC und Ionenaustauschchromatographie, sowie Kombinationen dieser Verfahren getestet.

Die besten Ergebnisse für den ersten Aufreinigungsschritt ließen sich mit IMAC erzielen. Hierfür wurde auf die Ergebnisse der Optimierung für das intrazelluläre VEGF<sub>165</sub> zurückgegriffen (siehe Abschnitt D.1) und Nickel als Metallion sowie Natriumphosphat-Puffer mit 250 mM Imidazol (pH = 8,0) als Elutionspuffer verwendet. Zusätzlich wurde der Waschschrift optimiert und mit Bindungspuffer, der 20 mM Imidazol enthält durchgeführt. (Die detaillierte Durchführung der Aufreinigung ist in Abschnitt C.6.1.3 wiedergegeben). Das Chromatogramm und das entsprechende SDS-PAGE-Gel sind in Abbildung 4.18 dargestellt. (Die Probenauftragung wurde hier nicht automatisiert durchgeführt, weshalb der entsprechende Peak im Chromatogramm nicht auftaucht.)

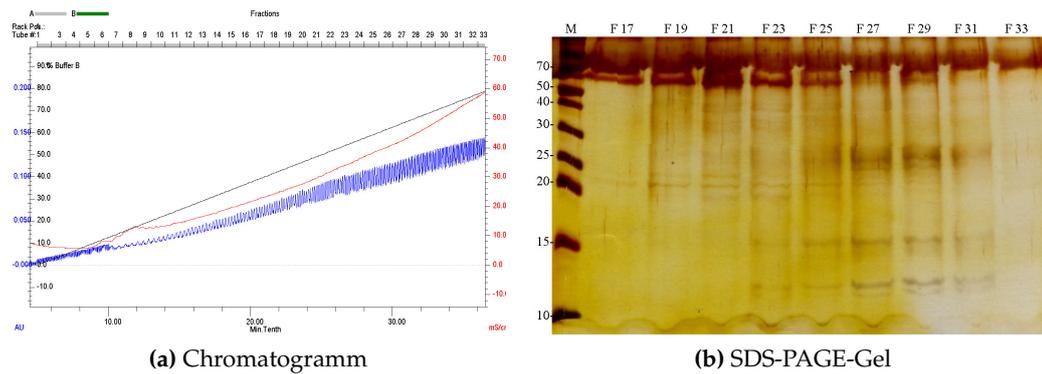


**Abbildung 4.18:** Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (15%) ausgewählter Fraktionen des 1. Schrittes der Aufreinigung des extrazellulären VEGF<sub>165</sub> per IMAC ((a) blau: UV-Absorption bei 280 nm [AU], rot: Leitfähigkeit [mS/cm<sup>2</sup>]); (b) M: Marker, DF: Durchfluss beim Auftragen der Probe; F: Fraktion).

Im SDS-PAGE-Gel in Abbildung 4.18 ist in den Fraktionen ab 15 bei etwas über 25 kDa die VEGF<sub>165</sub>-Bande zu erkennen, wo sie nach dem Western Blot in Abbildung 4.11 zu erwarten gewesen wäre. Zusätzlich ist eine weitere Bande zwischen 50 und 70 kDa zu erkennen, welche eine Verunreinigung darstellt.

Für den zweiten Aufreinigungsschritt zum Entfernen der Verunreinigung wurde das beste Ergebnis mit der Heparin-Affinitätschromatographie erreicht. Nach dem Umpuffern der IMAC-Elutionsfraktionen in Heparin-Bindungspuffer und dem Auftragen auf die Säule wurde das VEGF<sub>165</sub> mit einem NaCl-Gradienten (von 0 auf 1 M) eluiert. Das Chromatogramm (auch hier ohne Probenauftragungspeak) und das entsprechende SDS-PAGE-Gel sind in Abbildung 4.19 dargestellt.

In Abbildung 4.19a sind aufgrund eines *baseline-shifts*, des hohen Hintergrundrauschens und



**Abbildung 4.19:** Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen des 2. Schrittes der Aufreinigung des extrazellulären VEGF<sub>165</sub> per HAC ((a) blau: UV-Absorption bei 280 nm [AU], rot: Leitfähigkeit [ $\text{mS}/\text{cm}^2$ ]); (b) M: Marker, F: Fraktion).

durch offensichtlich geringe Mengen eluierten Proteins keine Peaks zu erkennen. Das SDS-PAGE-Gel zeigt jedoch, dass die Verunreinigung zwischen 50 und 70 kDa zuerst von der Heparin-Säule eluiert wird und in den Fraktionen zwischen 17 und 25 nachgewiesen werden kann. Die VEGF<sub>165</sub>-Bande im Bereich von 25 kDa ist in den Fraktionen 27 bis 29 nachweisbar, wobei hier noch zwei weitere Banden bei 15 und ca. 12 kDa vorliegen. Diese waren schon durch einen Western Blot im Kultivierungsüberstand nachweisbar (siehe Abbildung 4.11). Wenn es sich hierbei um unvollständig translatiertes VEGF<sub>165</sub> oder Fragmente von diesem handelt, welche sowohl den His-Tag als auch die Heparin-bindende-Domäne enthalten, würde dies erklären weshalb sie sowohl im Western Blot nachweisbar sind, als auch warum sie nach zwei Aufreinigungsschritten per IMAC und HAC noch vorliegen. Für eine eindeutige Bestätigung dieser Vermutung müsste ein Western Blot mit einem polyklonalen anti-VEGF<sub>165</sub>-Antikörper durchgeführt werden oder die Banden müssten aus dem Gel isoliert und sequenziert werden. Die Fraktionen 27 bis 29 dieser Aufreinigung wurden vereinigt, in PBS umgepuffert, durch einen Bradford-Assay quantifiziert und anschließend in einem Aktivitätsassay getestet (siehe Abschnitt 4.4.3). Die Quantifizierung ergab eine Gesamtmenge von 37,9  $\mu\text{g}$ . Da für die entsprechende Aufreinigung ursprünglich 240 mL Zellkulturüberstand verwendet wurde, ergibt sich eine Ausbeute von 158  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Verglichen mit der Ausbeute aus der Aufreinigung des intrazellulären VEGF<sub>165</sub> von 2,1  $\mu\text{g}/\text{L}$  konnte eine deutliche Steigerung erreicht werden, welche neben den dort diskutierten Problemen, vermutlich auch in einer höheren Produktivität der sezernierenden Zellen begründet ist.

## 4.4 Aktivitätstestung

Für die Entwicklung eines Assays zur Testung der Bioaktivität des produzierten VEGF<sub>165</sub>, wurde seine proliferationsfördernde Wirkung auf Endothelzellen [9][283] betrachtet. Als Endothelzellen wurden humane Nabelschnurendothelzellen (HUVECs, *human umbilical endothelial cells*) gewählt, da diese am leichtesten verfügbar sind. Die HUVECs zur Etablierung des Assays wurden von Stem Cell Technologies bezogen.

### 4.4.1 Entwicklung des Aktivitätstestes

Für die Entwicklung des Testes wurden die Endothelzellen in Medium mit kommerziell erhältlichem VEGF<sub>165</sub> in üblicher Konzentration und in demselben Medium ohne VEGF<sub>165</sub> kultiviert. Diese Ansätze sollten später als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienen. Als Medium wurde das Endothelial Cell Growth Medium 2 Kit von Promega gewählt, da man verschiedene Faktoren separat hinzufügen muss und so zwei Medien erzeugen kann, welche sich ausschließlich im VEGF<sub>165</sub>-Gehalt unterscheiden. Die vorgesehene VEGF<sub>165</sub>-Konzentration betrug hier 0,5 ng/mL.

Um die Zellproliferation nachzuweisen, wurden verschiedene Assays und Ansätze getestet. Es wurde stets das 96-Loch-Platten-Format verwendet. Eine Übersicht gibt Tabelle 4.5. Die detaillierten Beschreibungen der Assays und ihrer Durchführungen finden sich in den Abschnitten C.1.6, C.1.7, C.1.8 und C.1.9.

**Tabelle 4.5:** Übersicht der getesteten Varianten des HUVEC-Proliferationsassays. Volumen und Aussaatdichte sind angegeben pro Kavität (96-Loch-Platte).

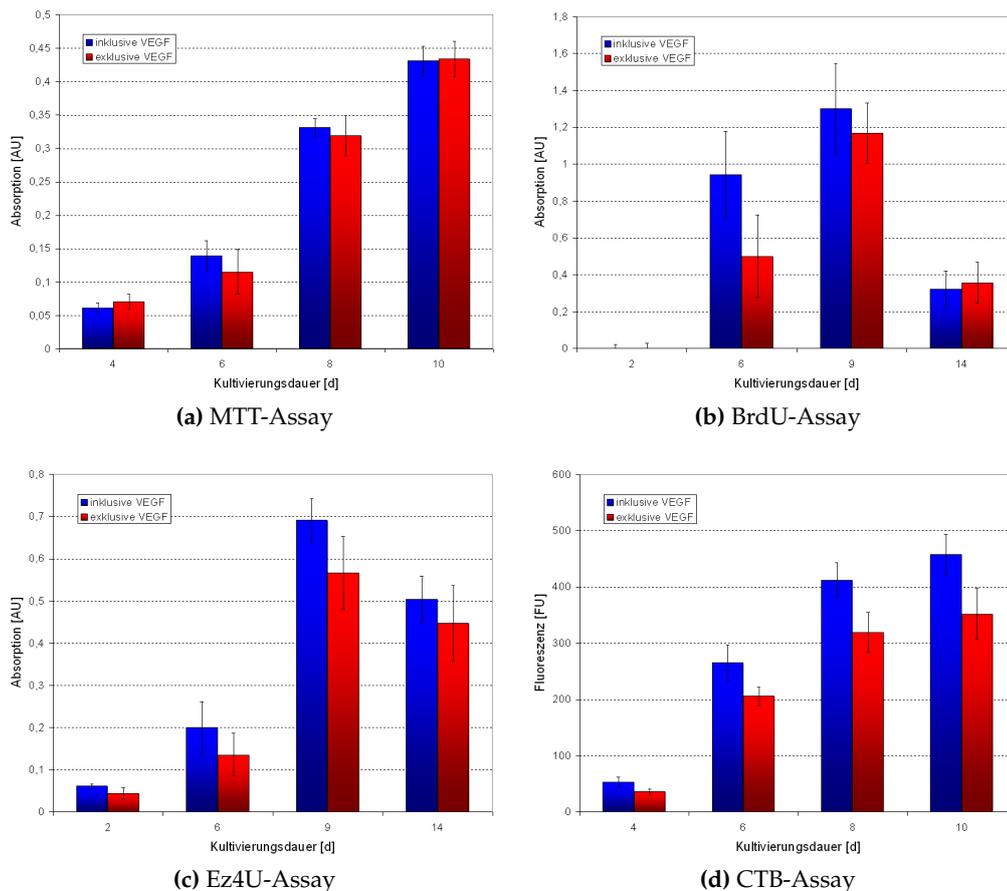
Assay	Kultivierungsdauer	Volumen	Aussaatdichte
MTT	6 - 13 Tage	100 - 310 µL	500 - 2000 Zellen
CellTiter Blue	10 - 11 Tage	300 µL	500 - 2000 Zellen
Ez4U	14 Tage	300 µL	1000 Zellen
BrdU	14 Tage	300 µL	1000 Zellen

Die Tests wurden jeweils in Vierfachbestimmung pro Ansatz durchgeführt. Die für den jeweiligen Test besten Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 dargestellt. Es handelt sich dabei für den MTT- und CTB-Assay jeweils um die Ansätze mit einer Aussaatdichte von 500 Zellen/Kavität. Es zeigt sich, dass für keinen der Ansätze der Unterschied zwischen der Positiv- und Negativkontrolle deutlich ausgeprägt ist.

Bei weiteren Versuchen hat sich gezeigt, dass sich mit erhöhten VEGF<sub>165</sub>-Konzentrationen deutlichere Ergebnisse erzielen lassen. Für die Tests bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit wurde jeweils der Kultivierungszeitraum gewählt, nach welchem der größte Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle erreicht werden konnte. Dies entspricht sechs Tagen beim BrdU- und MTT-, neun Tagen beim Ez4U- und zehn Tagen beim CTB-Assay. Die verwendeten VEGF<sub>165</sub>-Konzentrationen waren 10, 1 und 0,1 ng/mL. In Abbildung 4.21 sind die Ergebnisse dieser Tests dargestellt.

Die deutlichsten Unterschiede und damit die für einen Aktivitätsassay besten Ergebnisse konnten mit dem CTB- und dem MTT-Assay erreicht werden. Um zu entscheiden, welcher der beiden Assays für den Aktivitätstest besser geeignet ist, sollte als nächstes die Reproduzierbarkeit getestet werden. Hierfür wurden die Zellen zusätzlich bei einer Konzentration von 100 ng VEGF<sub>165</sub>/mL kultiviert. Die Ergebnisse für die beiden Tests sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

Die Viabilitäten der Zellen, kultiviert mit einer Konzentration von 100 ng/mL, sind nur ge-



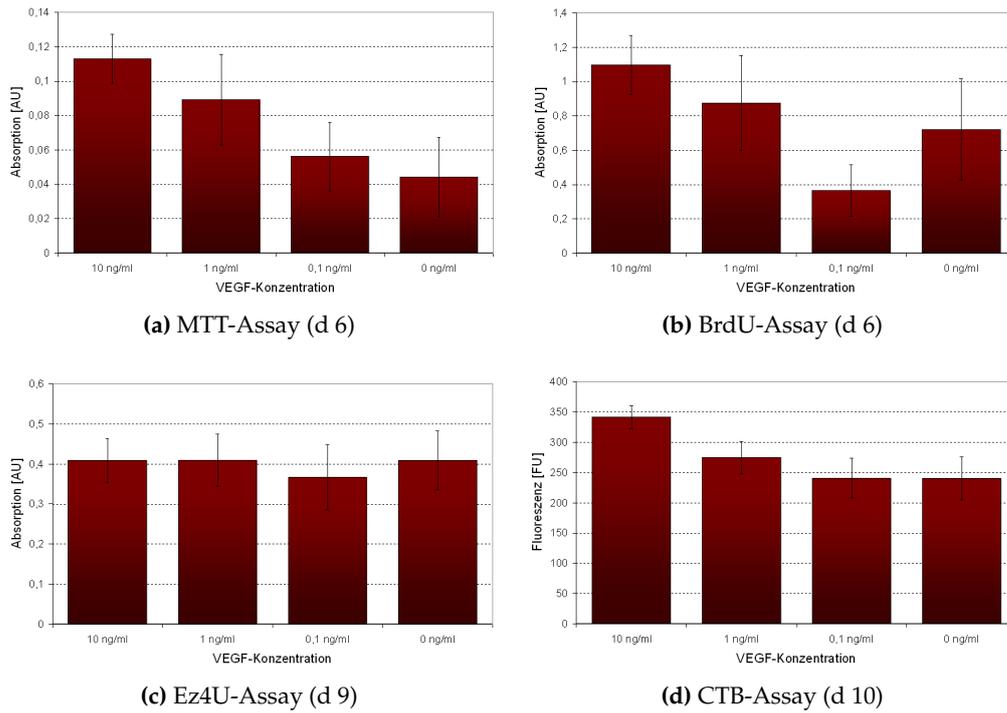
**Abbildung 4.20:** Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte für die verschiedenen Assays mit und ohne Zusatz von 0,5 ng VEGF<sub>165</sub>/mL.

ringförmig höher als die für die Zellen kultiviert mit einer Konzentration von 10 ng/mL. Dies deutet darauf hin, dass die maximale Wachstumsrate erreicht ist und noch höhere VEGF<sub>165</sub>-Konzentrationen keine Steigerungen der Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte bedeuten würden. Der Vergleich der beiden Durchführungen zeigt, dass der CTB-Assay eine deutlich höhere Reproduzierbarkeit aufweist (Abbildung 4.22). Für die Testung des produzierten VEGF<sub>165</sub> wird der CTB-Assay in den hier verwendeten Konzentrationen eingesetzt.

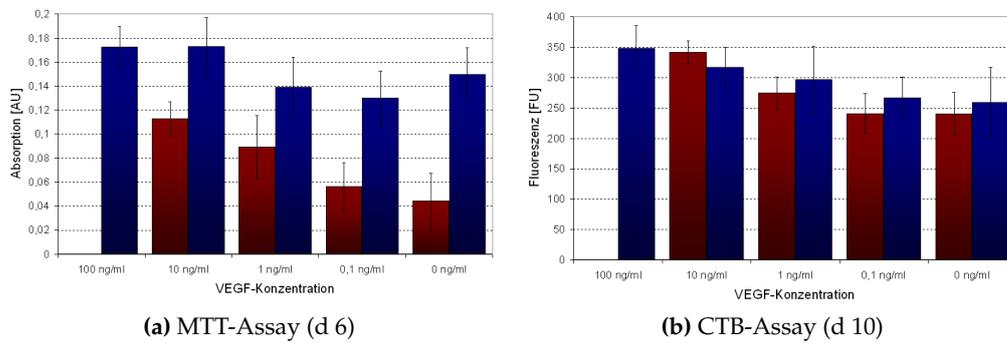
Ein unerwartetes Ergebnis zeigt der CTB-Assay für die Kulturen ohne VEGF<sub>165</sub>. Ihre Fluoreszenzwerte sind genauso hoch oder höher als die der Kulturen mit 0,1 ng/mL und z.T. auch der mit 1 ng/mL (Vergleich Abbildungen 4.26 und 4.27). Wenn VEGF<sub>165</sub> nicht in der Kultur vorliegt, scheint es in Endothelzellen einen Kompensationsmechanismus zu geben, der ihre Proliferation dennoch zu einem gewissen Grad ermöglicht, wie dieser beschaffen ist, ist jedoch sehr schwer abzuschätzen. Ein Ansatz wäre z.B. die Überprüfung der Expressionsstärke von Rezeptoren für VEGF und Faktoren, die ähnlichen Einfluss auf die Proliferation der Endothelzellen haben, in Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von und ohne VEGF.

Es ist auffällig, dass VEGF-Aktivitätstests in der Literatur zwar auch mit steigenden Konzentrationen durchgeführt wurden, jedoch keine Angaben zum Vergleich mit Kulturen ohne VEGF zu finden sind [284][285]. Eventuell ist dieses Ergebnis schon früher erreicht worden und nicht

## 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)



**Abbildung 4.21:** Konzentrationsabhängigkeit der Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte für die vier verschiedenen Assays.



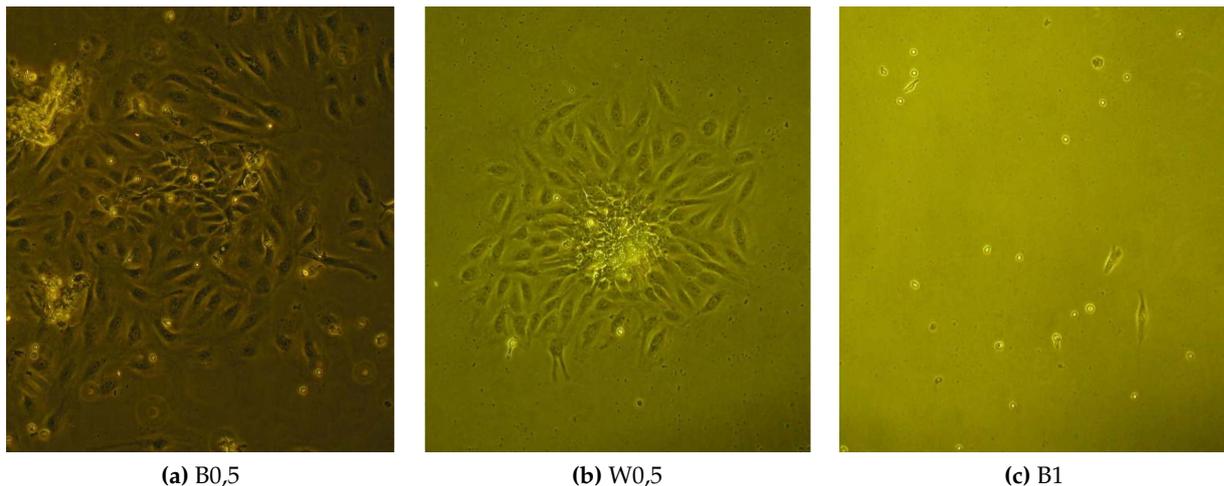
**Abbildung 4.22:** Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte für den CTB- und den MTT-Assay.

zu erklären gewesen.

### 4.4.2 Primärzellisolation

Da die, für die Durchführung des VEGF<sub>165</sub>-Aktivitätsassays benötigten HUVECs, Primärzellen sind, unterliegen sie einer Limitierung bezüglich ihrer maximalen Passagenzahl. Um nicht fortwährend neue Primärzellen kommerziell beziehen zu müssen, wurden diese selbst isoliert. Dafür wurde von der AG Biochemie und Tumorbilogie der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Hochschule Hannover eine Nabelschnur zur Verfügung gestellt.

Die Isolierung erfolgte mittels des in Abschnitt C.1.10 angegebenen Protokolls. Es wurden drei verschiedene Isolationsansätze durchgeführt: Mit 0,5%iger Collagenase Typ I von Worthington (im weiteren W0,5) und mit 1% und 0,5% Collagenase Typ I von Biochrom (im weiteren B1 und B0,5). In Abbildung 4.23 sind mikroskopische Aufnahmen der drei Kulturen am zweiten Tag nach der Isolierung gezeigt. Deutlich sichtbar ist, dass die mit der 1% Lösung isolierte Kultur schlechter wächst, die Collagenase-Konzentration scheint zu hoch gewesen zu sein und die zu isolierenden Zellen wurden geschädigt.



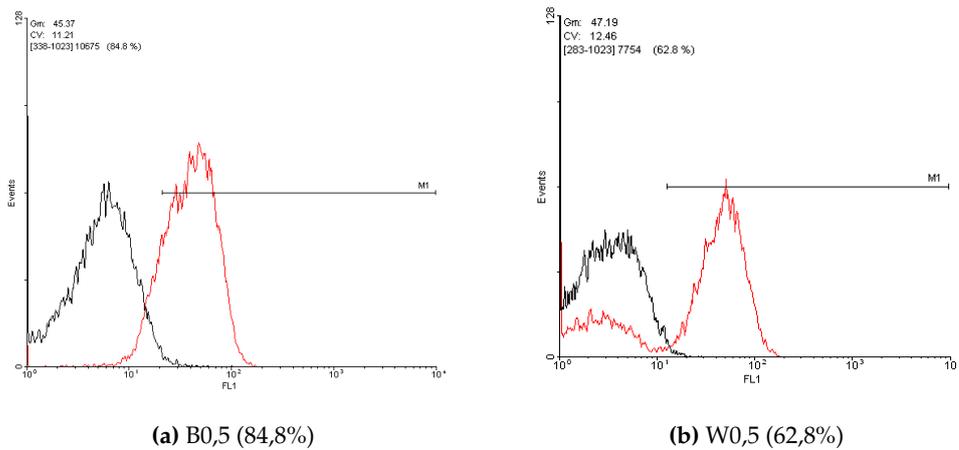
**Abbildung 4.23:** Kulturen der mit den drei verschiedenen Collagenase-Lösungen isolierten Zellen an Tag 2.

Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend der Anteil der Zellen bestimmt, welche den Endothelzellmarker CD31 (auch PECAM-1, *Platelet endothelial cell adhesion molecule*) tragen. Die Durchführung ist in Abschnitt C.4.4 wiedergegeben. Die Wachstumsrate der Kultur B1 war im Vergleich zu den anderen Beiden sehr gering, weshalb sie für den Assay nicht in Betracht gezogen und folglich auch nicht vermessen wurde. Die Ergebnisse in Abbildung 4.24 zeigen, dass der Anteil der CD31-positiven Zellen bei beiden Kultivierungen deutlich unter 100% beträgt, die Kulturen sind beim Isolieren durch andere Zellen (wie z.B. glatte Muskelzellen oder Fibroblasten) verunreinigt worden.

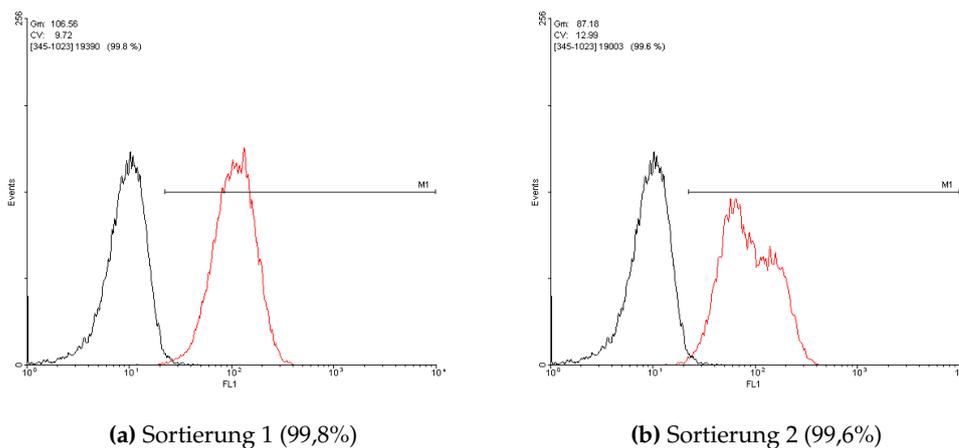
Die Kultur B0,5, welche mit 84,8% den höheren Anteil CD31-positiver Zellen aufweist (gegenüber 62,8%), wurde deshalb in Passage 2 per FACS nach CD31-positiven Zellen sortiert. Die Durchführung ist in Abschnitt C.4.1 wiedergegeben. Die Sortierung wurde zweimal durchgeführt. Es wurden, nach einer Färbung mit einem anti-CD31-FITC-Antikörper, jeweils die am stärksten fluoreszierenden 20% sortiert. Die erhaltenen 3. Passagen wurden zweimal expandiert und in Passage 5 der Anteil der CD31-positiven Zellen erneut gemessen. Die Ergebnisse in Abbildung 4.25 zeigen, dass die Sortierung erfolgreich und reproduzierbar ist und eine reine Endothelzellkultur erhalten werden konnte, von welcher Zellbänke angelegt wurden.

Um die Eignung dieser Zellen für den VEGF<sub>165</sub>-Aktivitätstest zu überprüfen, wurde nach dem in Abschnitt 4.4 erarbeiteten Protokoll ein Assay zum Vergleich mit den kommerziell bezogenen HUVECs (STC) durchgeführt.

## 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)



**Abbildung 4.24:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD31-positiven Zellen der beiden Isolationskulturen B0,5 und W0,5 (rot: anti-CD31-Antikörper, schwarz: Isotypenkontrollantikörper, in Klammern sind die Anteile der CD31-positiven Zellen angegeben).



**Abbildung 4.25:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD31-positiven Zellen der beiden CD31-Sortierungen des HUVEC-Isolierungsansatzes B0,5 (rot: anti-CD31-Antikörper, schwarz: Isotypenkontrollantikörper, in Klammern sind die Anteile der CD31-positiven Zellen angegeben).

Die Ergebnisse in Abbildung 4.26 zeigen, dass die, zu den Fluoreszenzwerten proportionale Proliferation, bei allen drei Kulturen eine direkte Konzentrationsabhängigkeit aufweist (abgesehen von den Ansätzen ohne VEGF<sub>165</sub>). Die Absolutwerte weisen jedoch deutliche Unterschiede auf. Es ist anzunehmen, dass sich die Wachstumsgeschwindigkeit der sortierten Zellen und der kommerziell erworbenen unterscheiden. Da die Wachstumsgeschwindigkeiten der durch die Sortierung erhaltenen Zellkulturen auch untereinander stark voneinander abweichen, obwohl sie aus der selben Isolierung stammen, ist dies vermutlich durch die Sortierung verursacht worden. Die Zellen sind für den erarbeiteten VEGF<sub>165</sub>-Aktivitätsassay verwendbar. Um deutlichere Ergebnisse zu erhalten, wäre es nötig den Test noch einmal spezifisch für die Zellen zu optimieren. Wenn der Unterschied hauptsächlich in der Verdopplungszeit liegen sollte, wäre es wahrscheinlich bereits ausreichend die Kultivierungsdauer an die jeweils verwendeten Zellen

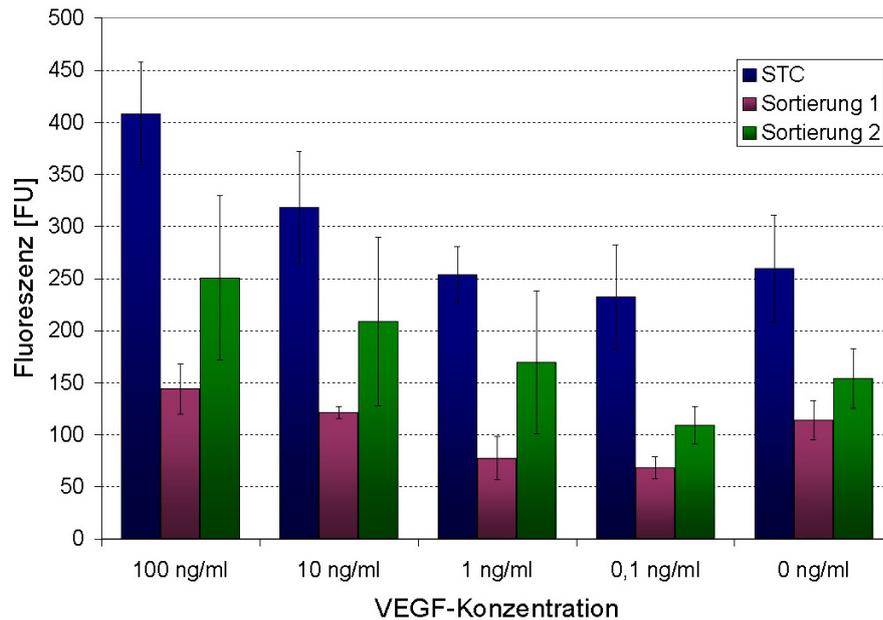


Abbildung 4.26: Fluoreszenzwerte für die drei CTB-Assays mit den unterschiedlichen HUVEC-Zellen.

anzupassen.

#### 4.4.3 Aktivitätstestung des aufgereinigten VEGF<sub>165</sub>

Das aufgereinigte VEGF<sub>165</sub>, sowohl das sezernierte als auch das intrazelluläre, wurde nach Umpufferung in PBS und Quantifizierung per Bradford-Assay bzw. Spektrophotometer dem entwickelten Aktivitätstest unterzogen.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.27 zeigen, dass beide VEGF<sub>165</sub> Aktivität aufweisen<sup>6</sup>. Die Nullwerte für die Kultivierungen mit den produzierten VEGF<sub>165</sub> sind höher als die für die Kultivierung mit dem kommerziellen VEGF<sub>165</sub>. Es liegt nahe, dass hier ein systematischer Fehler gemacht worden ist. So könnte zum Beispiel durch eine inhomogene Zellsuspension vor dem Aussäen eine höhere Anfangszell-dichte vorgelegen haben. Lässt man den Wert für 100 ng/mL außer acht, da hier offensichtlich der Maximalwert erreicht ist, konnten für alle Konzentrationen mit dem extrazellulären VEGF<sub>165</sub> höhere Fluoreszenzwerte erreicht werden. Falls der vermutete systematische Fehler vorliegt, könnten diese darin begründet liegen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das produzierte VEGF<sub>165</sub> tatsächlich aktiver ist als das kommerzielle. Letzteres wurde in Insektenzellen produziert und weist somit vermutlich andere post-translationale Modifizierungen auf, worin der Aktivitätsunterschied begründet liegen könnte. Ein Vergleich mit in CHO-Zellen produziertem VEGF<sub>165</sub> würde hier eindeutige Ergebnisse liefern. Das intrazelluläre VEGF<sub>165</sub> weist für die Konzentrationen von Belang ausschließlich geringere Fluoreszenzwerte auf, was bedeutet, dass seine Aktivität vermindert ist. Dies kann mehrere Ursachen

<sup>6</sup>Da bei der Kultivierung mit 100 ng/mL offensichtlich der Maximalwert erreicht ist (entweder ist Sättigung erreicht in Bezug auf den Fluoreszenzwert oder die entsprechenden Kavitäten in den 96-Loch-Platten sind komplett bewachsen) und die Werte für 0 ng/mL, wie bereits zuvor beobachtet, höher als die für 0,1 ng/mL sind, wurden die Ergebnisse auf keine dieser Konzentrationen normiert.

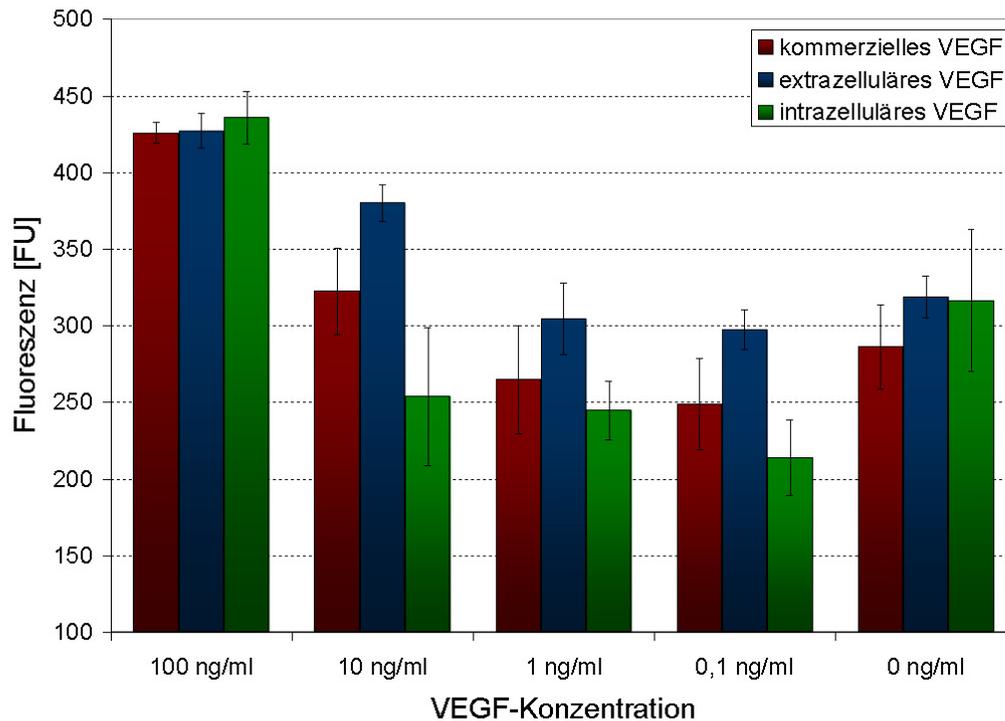


Abbildung 4.27: Fluoreszenzwerte der drei CTB-Assays mit den unterschiedlichen VEGF<sub>165</sub>.

haben. Das VEGF<sub>165</sub> könnte von den Zellen bereits vermindert aktiv synthetisiert worden sein oder es wird durch seine Handhabung beim Zellaufschluss oder während der Aufreinigung geschädigt. Um letzteres zu prüfen, müsste VEGF<sub>165</sub> im Zellaufschluss spezifisch quantifiziert werden und anschließend in entsprechenden Konzentrationen demselben Aktivitätstest unterzogen werden. Um zu Beurteilen ob der Zellaufschluss einen Einfluss hat, könnten verschiedene Methoden des Zellaufschlusses bei der Produktion verwendet werden.

### 4.5 Zusammenfassung

Die lentivirale Transduktion der Zelle mit dem HIV-1-basierten Vektor erzielte gute Effizienzen. Die nachgewiesene Expressionssteigerung durch eine Erhöhung der MOI stimmt mit Literaturergebnissen überein, wo nachgewiesen werden konnte, dass sich diese in einer erhöhten Anzahl integrierter Kopien begründen lässt [261]. Es sollte zukünftig getestet werden, bis zu welchem Grad sich die Expression noch durch eine MOI-Erhöhung steigern lassen würde, bis negative Effekte für die zu transduzierenden Zellen auftreten. Zusätzlich könnte auch noch eine Steigerung der Kopienzahl durch Selektion mit Methotrexat (MTX) erreicht werden. MTX ist ein kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolatreduktase, dessen Gen zusammen mit dem GOI vom integrierten Vektor transkribiert wird.

Schwierig hingegen war die Sezernierung des Zielproteins zu erreichen. Mit dem zunächst verwendeten nativen Signalpeptid gelang es nicht. Ein Wechsel der Zelllinie und der Transfektionsmethode zeigte keinen Einfluss. Schließlich konnte durch ein Screening das Signalpeptid

von IL2 als vielversprechend identifiziert werden, welches dann zur Sezernierung des VEGF<sub>165</sub> führte. Aufgrund der aufgezeigten Komplexität der Problematik ist es unwahrscheinlich, dass sich eine Kasette erstellen lässt, die Sezernierung garantiert. Mit dem hier erfolgreich verwendeten Vektoraufbau konnte z.B. die Sezernierung von TGF- $\beta$  in CHO<sup>SFS</sup>-Zellen nicht erreicht werden [286].

Die Selektion von Hochproduzenten konnte sowohl anhand der GFP-Fluoreszenzintensität als auch mit dem direkten Kälteinkubationsassay erfolgreich durchgeführt werden. Die besseren Ergebnisse ließen sich eindeutig mit der Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität erreichen. Der Kälteinkubationsassay ist trotzdem ein sehr interessanter Ansatz, wenn man beispielsweise mit Zellen arbeitet, welche das Zielprotein nicht vollständig sezernieren. Der nächste Schritt wäre eine Kombination der GFP-Sortierung mit einer Einzelzellklonierung um noch höher produzierende Zellen zu erhalten. Der Vergleich des Kultivierungsverhaltens, der durch die Sortierungen erhaltenen Subzelllinien, ergab höhere Maximalzellichten und/oder geringere Sterblichkeitsraten für die VEGF<sub>165</sub>-produzierenden Zellen. Auch wenn vieles auf einen Einfluss des VEGF<sub>165</sub> hindeutet, konnte die Ursache hierfür nicht ergründet werden. Die anhand der GFP-Sortierung der 10% am stärksten fluoreszierenden Zellen erhaltene Subzelllinie V250-GFP10 wurde aufgrund ihrer Produktivität und Wachstumseigenschaften für die Produktion ausgewählt. Für diese sollte ein *scale-up* in den Bioreaktormaßstab etabliert werden.

Die Expression des Zielgens in den verschiedenen Zelllinien war langfristig relativ stabil. Die Gründe hierfür sind vermutlich der lentivirale Gentransfer und der SFFV-Promoter. Durch den lentiviralen Gentransfer wird eine Integration in aktiv transkribierte Bereiche erreicht und eine Heterochromatisierung größtenteils vermieden. Der SFFV-Promotor scheint nur zu einem gewissen Teil Methylierungen zu unterliegen. Durch welchen Mechanismus oder durch welches Verhältnis unterschiedlicher Mechanismen, die zur Expressionsabnahme führen, die hier beobachtete anfängliche Abnahme der Expression begründet ist, könnte geklärt werden, wenn man Kopienzahl und Promotormethylierung quantifiziert. Das verbliebene Expressionslevel konnte auch über sehr lange Kultivierungszeiträume hindurch stabil aufrechterhalten werden.

Die Aufreinigung des intrazellulären Proteins aus dem Zellaufschluss stellte sich als sehr kompliziert heraus und konnte nur durch eine direkte Immunoaffinitätschromatographie erreicht werden. Aus dem serumfreien Zellkulturüberstand konnte das VEGF<sub>165</sub> mittels einer Kombination aus Ni-IMAC und HAC rein erhalten werden. Beide Aufreinigungsprozesse sind noch optimierbar, wodurch höhere Ausbeuten als die hier erreichten von 2,1  $\mu\text{g/L}$  (intrazellulär) und 158  $\mu\text{g/L}$  (sezerniert) möglich werden sollten.

Für die Aktivitätstestung wurde ein Proliferationsassay etabliert, welcher auf der mitochondrialen Reduktion des Redoxfarbstoffes Resazurin basiert. Die hierfür benötigten HUVE-Zellen konnten aus einer Nabelschnur isoliert und per FACS-Sortierung anhand des Endothelzellmarkers CD31 als reine Kultur erhalten werden. Ihre Wachstumseigenschaften scheinen jedoch nicht mit denen der kommerziell erhältlichen Zellen überein zu stimmen, so dass eine Anpassung des erarbeiteten Testes nötig ist.

Für beide aufgereinigten VEGF<sub>165</sub> konnte mittels des erarbeiteten Assays biologische Aktivität

#### 4 Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor 165 (VEGF<sub>165</sub>)

---

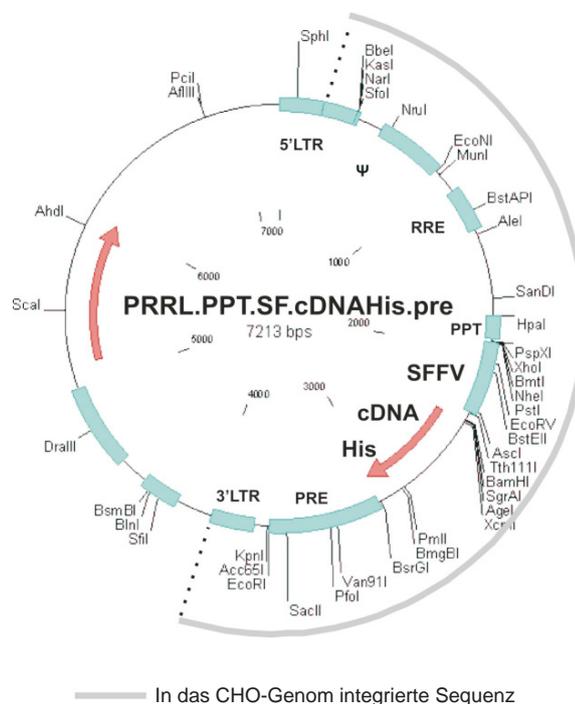
nachgewiesen werden. Für das intrazelluläre VEGF<sub>165</sub> war diese jedoch vermindert, was unterschiedliche Ursachen, wie z.B. den Zellaufschluss, haben kann.

# 5 Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)

## 5.1 Vorarbeiten

Die Produktion von LIF in CHO-Zellen ist ein Prozess, der von Pierre Moretti während seiner Promotion [287] und Janina Bahnemann während ihrer Masterarbeit [288] im Institut für Technische Chemie begonnen wurde und in dieser Arbeit fortgesetzt werden sollte.

Die verwendete Zelllinie wurde im Institut für Experimentelle Hämatologie der Medizinische Hochschule Hannover von der AG Schambach mittels lentiviralem Gentransfer (entsprechend Abschnitt 2.1.2.2) erstellt. Der verwendete Vektor ist in Abbildung 5.1 dargestellt, er enthält keine Selektions- oder Markergene. Das LIF wird mit seinem nativen Signalpeptid und einem C-terminalen His-tag exprimiert.

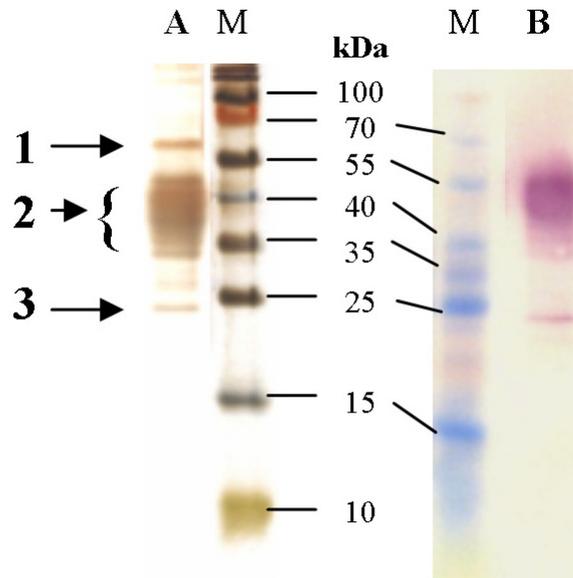


**Abbildung 5.1:** Schematische Karte des Plasmides wie es für die Erstellung der LIF-produzierenden Zelllinie verwendet wurde (aus [287]).

Pierre Moretti konnte in seiner Arbeit die Expression durch PCR und die Sekretion per Western Blot nachweisen. Zudem konnte eine Aufreinigung mittels Ni-IMAC etabliert werden, welche

## 5 Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)

das Zielprotein nahezu komplett aufreingt. Abbildung 5.2 zeigt ein SDS-PAGE-Gel des per IMAC aufgereinigten LIFs im Vergleich mit einem Western Blot. In dieser Arbeit sollte nun ein zweiter Aufreinigungsschritt gefunden werden, mit dem das LIF komplett rein erhalten werden kann.



**Abbildung 5.2:** Per IMAC aufgereinigtes LIF, Detektion per silbergefärbtem SDS-PAGE-Gel (A) und Western Blot (B) (M: Marker). Die Banden 2 und 3 können dem LIF zugeordnet werden, Bande 1 stellt eine Verunreinigung dar (aus [288]).

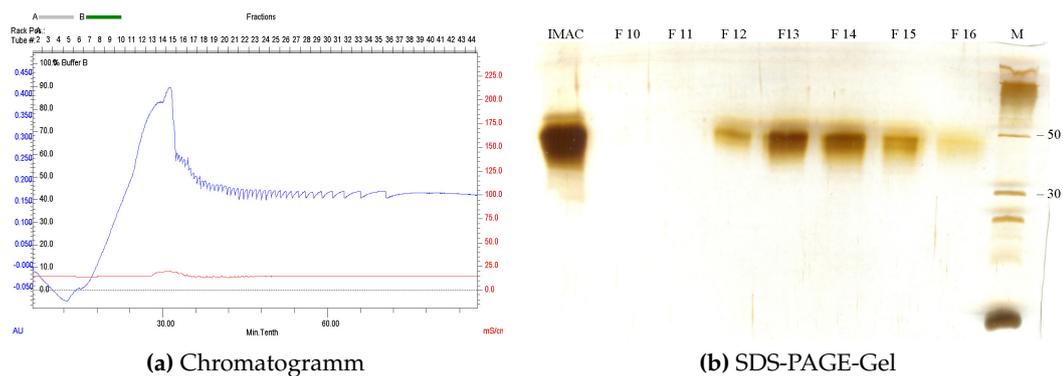
Ein Assay zur Aktivitätstestung unter Verwendung muriner embryonaler Stammzellen, die an Suspensionsbedingungen adaptiert wurden, konnte von Magda Tomala in ihrer Promotion [289] am Institut für Technische Chemie etabliert werden. Dieser Assay sollte zur Testung des komplett aufgereinigten LIF verwendet werden (die Aktivität nach dem ersten Aufreinigungsschritt konnte bereits belegt werden). Zudem sollte ein Vergleich bezüglich der Aktivität und pluripotenzerhaltenden Eigenschaften von LIF welches in Pro- und Eukaryoten produziert wurde durchgeführt werden. Prokaryotisches LIF sollte als *trx*-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und mittels eines von Magda Tomala entwickelten Protokolls [289] aufgereinigt werden.

In der Arbeit von Pierre Moretti wurde zudem eine Einzelzellklonierung zur Gewinnung von Hochproduzenten durchgeführt. Dabei konnten zwei Zelllinien erstellt werden, welche als solche identifiziert, sonst aber nicht weiter charakterisiert wurden. Es wurde festgestellt, dass sich diese Einzelzellklone aufgrund ihres Wachstumsverhaltens (siehe Abschnitt D.2) nicht zur Produktion eignen, weshalb in dieser Arbeit nur die ursprüngliche Zelllinie verwendet wurde.

## 5.2 Aufreinigung

Für den zweiten Aufreinigungsschritt wurden drei Methoden getestet: Heparin-Affinitäts-, Ionenaustausch- und Größenausschluss-Chromatographie. Für die Bereitstellung des Ausgangsmaterials wurden 400 mL Überstand aus Spinnerkultivierungen aufkonzentriert und in 4 FPLC-Läufen nach dem in Abschnitt C.6.1.4 angegebenen Protokoll über eine mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen-beladene IDA75-Membran aufgereinigt. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden vereinigt und in drei Aliquots aufgeteilt. Diese wurden, in die für die entsprechenden Aufreinigungsansätze benötigten Bindungspuffer, umpuffert. Die Ausgangslösung vor dem Umpuffern ist in Abbildung 5.3b in der mit IMAC beschrifteten Spur im silbergefärbten SDS-PAGE-Gel zu sehen.

**Größenausschlusschromatographie** Es wurde eine Proteema-300Å-Säule verwendet (Trennbereich  $10^3$ - $10^6$  Dalton). Es wurde 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7,0) verwendet. Die Durchführung ist in Abschnitt C.6.4.1 zu finden und die Ergebnisse sind in Abbildung 5.3 dargestellt.



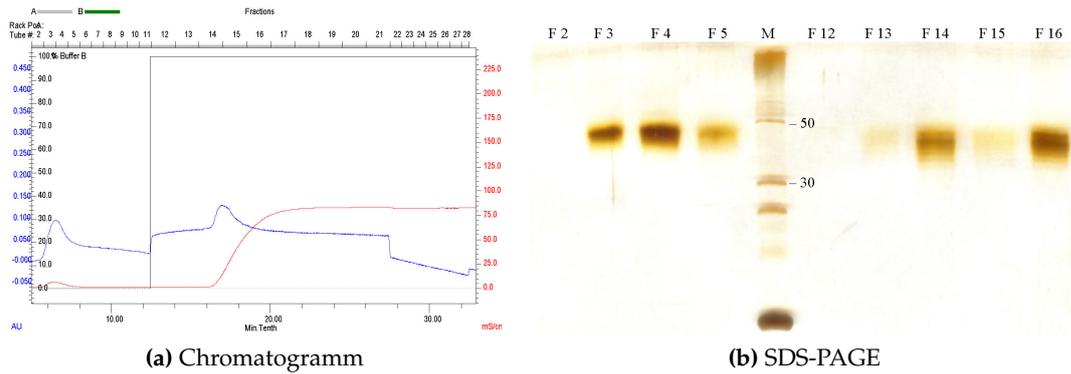
**Abbildung 5.3:** Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (12%) ausgewählter Fraktionen des 2. Schrittes der LIF-Aufreinigung per Größenausschlusschromatographie ((a) blau: UV-Absorption bei 280 nm [AU], rot: Leitfähigkeit [mS/cm<sup>2</sup>]); (b) M: Marker, F: Fraktion, IMAC: vereinigte Elutionsfraktionen des 1. Aufreinigungsschrittes per IMAC).

**Ionenaustauschchromatographie (IEX)** Mittels der Proteinsequenz aus der UniProt-Datenbank<sup>1</sup> wurde mit der *compute pI*-Software des *Swiss Institute of Bioinformatics*<sup>2</sup> der theoretische isoelektrische Punkt von humanem LIF mit 9,3 berechnet. Folglich wurde für die Ionenaustauschchromatographie ein Bindungs-pH-Wert von 8,3 ein Elutions-pH-Wert von 10,3 und eine mit Sulfonsäuregruppen funktionalisierte stationäre Phase (S75-Membranadsorber) gewählt. Auf diese Weise würde die unbekannte Verunreinigung nur dann nicht entfernt werden, wenn ihr isoelektrischer Punkt ebenfalls zwischen 8,3 und 10,3 liegen würde. Die Durchführung ist in Abschnitt C.6.5.1 beschrieben und die Ergebnisse sind in Abbildung 5.4 dargestellt.

<sup>1</sup><http://www.uniprot.org/uniprot/P15018>

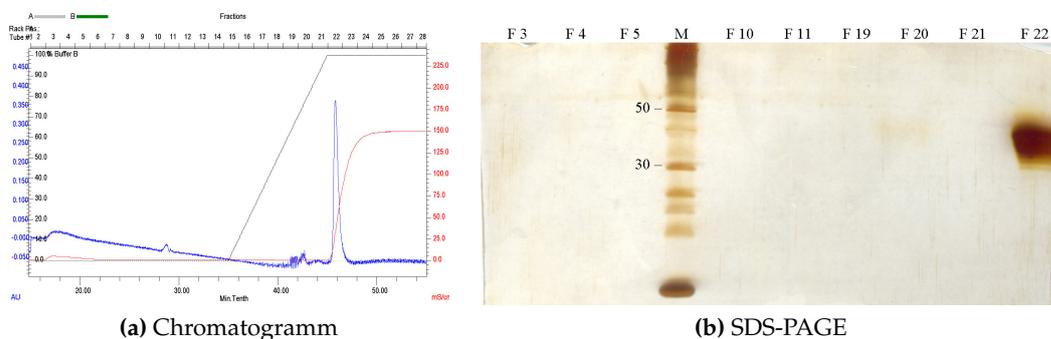
<sup>2</sup>[http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)

## 5 Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)



**Abbildung 5.4:** Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (12%) ausgewählter Fraktionen des 2. Schrittes der LIF-Aufreinigung per Ionenaustauschchromatographie ((a) blau: UV-Absorption bei 280 nm [AU], rot: Leitfähigkeit [ $\text{mS}/\text{cm}^2$ ]); (b) M: Marker, F: Fraktion).

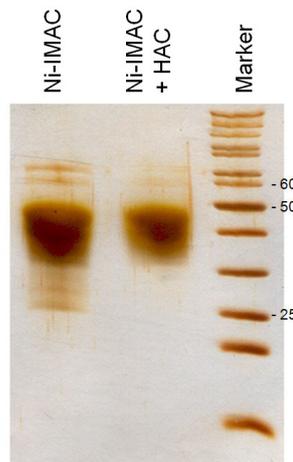
**Heparin-Affinitätschromatographie (HAC)** Da viele Wachstumsfaktoren eine Affinität zu Heparin aufweisen und sich darüber aufreinigen lassen [290][291][292][293], sollte für LIF auch eine Aufreinigung per Heparin-Affinitätschromatographie getestet werden. Hierfür wurde eine 1 mL HiTrap Heparin HP-Säule und 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH=7,0) als Bindungspuffer verwendet, dem zum Eluieren 2 M NaCl zugesetzt wurden. Eluiert wurde über einen kontinuierlichen Gradienten. Die Durchführung ist in Abschnitt C.6.2.1 beschrieben und die Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 dargestellt.



**Abbildung 5.5:** Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (12%) ausgewählter Fraktionen des 2. Schrittes der LIF-Aufreinigung per Heparin-Affinitätschromatographie ((a) blau: UV-Absorption bei 280 nm [AU], rot: Leitfähigkeit [ $\text{mS}/\text{cm}^2$ ]); (b) M: Marker, F: Fraktion).

Die Gele in den Abbildungen 5.3, 5.4 und 5.5 zeigen, dass prinzipiell jede der drei Methoden zum gewünschten Ergebnis führt. Bei der Aufreinigung per IEX (Abbildung 5.4) ist jedoch zu erkennen, dass nicht das gesamte Protein an die stationäre Phase bindet, ein Teil des Produktes befindet sich im Durchlauf (F3-5) und geht verloren. Beim Vergleich von Größenausschluss- und Heparinaffinitätschromatographie ist der Unterschied, dass bei Ersterer das Produkt über viele Fraktionen verteilt langsam eluiert wird, während bei der HAC ein einzelner scharfer Produktpeak vorliegt. Die produktenthaltenden Fraktionen der drei Läufe wurden jeweils vereinigt und in 1 mL PBS umgepuffert. Mit den so erhaltenen Lösungen wurde zur Bestimmung der Ausbeute ein Bradford-Assay (Protokoll siehe C.2.2) durchgeführt. Für die Heparin-Affinitätschromatographie ergab sich eine Ausbeute von 64  $\mu\text{g}$  LIF pro 100 mL Zellkulturüber-

stand. Für die anderen beiden Methoden lagen die Konzentrationen der Proben unterhalb der Nachweisgrenze des Bradford-Assays. Für den zweiten Aufreinigungsschritt wurde aufgrund des besseren Elutionsverhaltens und der höheren Ausbeute die Heparin-Affinitätschromatographie gewählt. Ein direkter Vergleich der Proben nach dem ersten und zweiten Aufreinigungsschritt (jeweils aufkonzentriert) ist in Abbildung 5.6 zu finden.



**Abbildung 5.6:** Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der aufkonzentrierten Elutionsfraktionen nach dem ersten (Ni-IMAC) und zweiten (Ni-IMAC + HAC) Schritt der LIF-Aufreinigung.

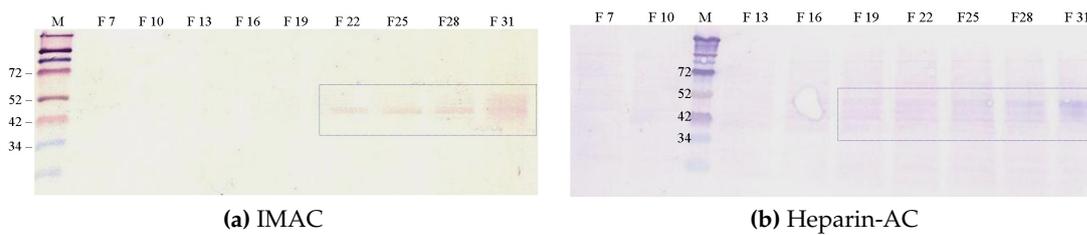
Es ist gelungen die Verunreinigung bei ca. 60 kDa zu entfernen, jedoch wurde auch die Bande bei ca. 25 kDa verloren, welche per Western Blot dem LIF zugeordnet werden konnte (siehe Abbildung 5.2). Es wurde ein Aktivitätsassay durchgeführt, der die Aktivität des auf diese Weise aufgereinigten LIFs bestätigt (die Ergebnisse der Aktivitätstestungen sind in Abschnitt 5.5 dargestellt). Die hier erarbeitete Zweischrittaufreinigung kann zur Produktion verwendet werden.

Da für in Eukaryoten produziertes LIF kein ELISA kommerziell erhältlich ist<sup>3</sup>, ist es nicht möglich die LIF-Menge im Kultivierungsüberstand zu quantifizieren und daraus abzuschätzen, welche Volumina maximal in einem einzelnen Schritt aufgereinigt werden können. Um die Kapazitäten der eingesetzten stationären Phasen in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Zellkulturüberstandes zu bestimmen, wurden zwei Aufreinigungen durchgeführt und per Western Blot bestimmt ab welcher Fraktion LIF im Durchfluss vorliegt. Für die IDA75-Membran wurden 450 mL Überstand auf 50 mL aufkonzentriert und der Durchlauf in 2 mL Fraktionen aufgefangen. Für die HiTrap-Heparin-Säule wurden 300 mL Überstand auf 50 mL aufkonzentriert und in 1,8 mL-Fraktionen gesammelt.

Das Ergebnis in Abbildung 5.7 zeigt LIF ab Fraktion 22 bzw. 19, die Membrankapazität ist folglich nach Auftragung von 396 mL und die der Säule nach 204 mL Kultivierungsüberstand erschöpft. Für den *scale-up* der Aufreinigung werden die entsprechenden Ergebnisse bei der Durchführung berücksichtigt und die Überstände in entsprechenden Aliquots aufgereinigt.

<sup>3</sup>Ebenso wie für VEGF sind ELISA-Kits für LIF erhältlich, welche jedoch Antikörper enthalten, bei welchen in *E.coli* produziertes LIF das Antigen ist. Laut Herstellerangaben würde eine Verwendung mit glykolisiertem LIF eine verminderte Bindungsfähigkeit und dadurch zu geringe Ergebniswerte zur Folge haben.

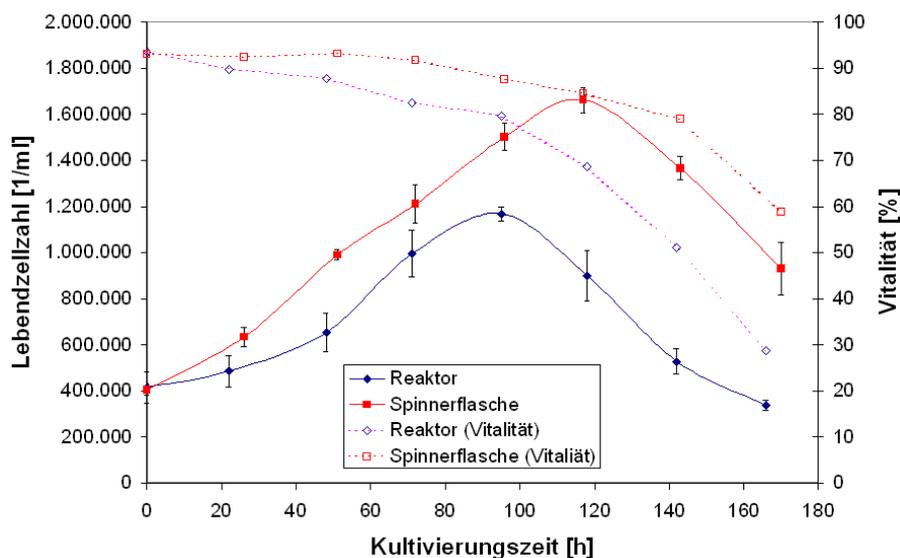
## 5 Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)



**Abbildung 5.7:** Western Blots der Durchläufe von LIF-Aufreinigungen per IMAC und Heparin-Affinitätschromatographie (M: Marker, F: Fraktion).

### 5.3 Produktion im Reaktormaßstab

Es wurde ein 2 L-Reaktor mit einer Biostat Bplus-Steuereinheit betrieben. Angeimpft mit 400.000 Zellen/mL aus Spinnerflaschenkultivierungen wurde bei 37°C, 10,5% O<sub>2</sub>, pH 7,2 und 200 rpm (Drei-Blatt-Segment-Rührer) in einem Volumen von 1500 mL kultiviert. Die Bedingungen basierten auf Ergebnissen von Dr. Marianna Costa [nicht veröffentlicht], welche dieses System für nicht-transfizierte CHO<sup>SFS</sup>-Zellen optimiert hat. Zum Vergleich wurde eine Kultivierung in einer 100 mL-Spinnerflasche unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Zellzahl- und Vitalitätsverläufe sind in Abbildung 5.8 wiedergegeben.



**Abbildung 5.8:** Lebendzellzahlen und Vitalitäten für die Kultivierungen der CHO-LIF-Zelllinie in Bioreaktor und Spinnerflasche.

Zum Vergleich der erreichbaren Ausbeuten wurden jeweils 100 mL Zellkulturüberstand unter den gleichen Bedingungen aufgereinigt und die erhaltene Produktmenge per Bradford-Assay quantifiziert. Sie betrug 63 µg für den Bioreaktor und 72 µg für die Spinnerflasche. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Kultivierungsverläufen. In der Spinnerflasche konnten zu jedem Zeitpunkt eine höhere Zelldichte und Vitalität erreicht werden. Nicht nur liegen dadurch mehr Produzenten vor, durch die höhere Vitalität am Ende der Kultivierung ist auch die Menge der aus den toten Zellen freigesetzten Proteasen verringert, welche unter Umständen einen Teil des

Produktes abgebaut haben könnten. Das Ergebnis zeigt, dass die Kultivierung im Reaktor noch deutlich optimiert werden muss. Offensichtlich ist die Stresseinwirkung hier deutlich höher als bei Spinnerflaschen. Dies führt trotz der besseren pH-Wert- und Sauerstoff-Regulierung zu geringeren Lebendzellzahlen und Vitalitäten. Unter diesen Bedingungen sind mehrerer Spinnerkultivierungen einem Reaktorlauf vorzuziehen.

Die Abweichung des Ausbeuteergebnisses für die Spinnerflaschenkultivierung mit dem aus Abschnitt 5.2 lässt sich dadurch erklären, dass dort Überstände von Kultivierungen eingesetzt wurden, welche schon nach vier oder fünf Tagen beendet worden sind.

## 5.4 Produktion in *Escherichia coli*

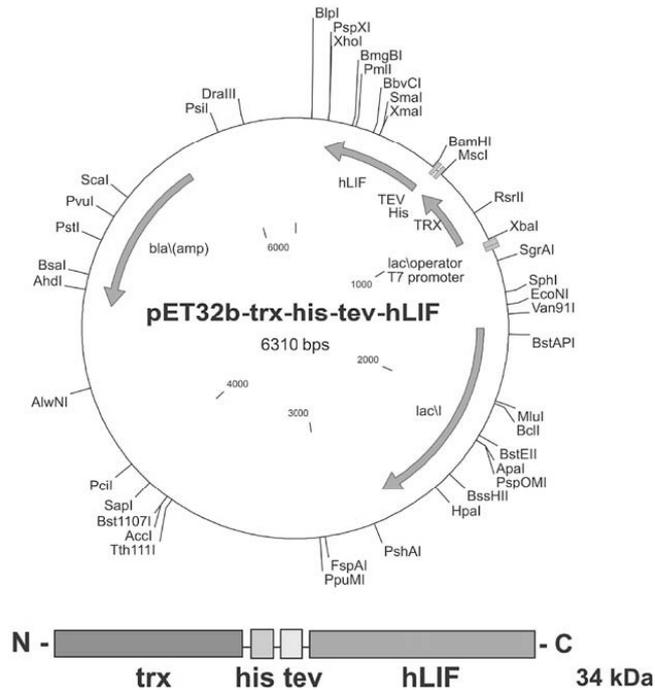
Die Produktion von LIF in *E.coli* basiert auf einem von Magda Tomala in ihrer Promotion [289] erarbeiteten Verfahren.

Eine direkte Expression von LIF in *E.coli* führt ausschließlich zu unlöslichem Protein, welches in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) ausfällt [294]. Dieses müsste dann *in vitro* renaturiert und solubilisiert werden. Aus diesem Grund wurde ein anderer Ansatz gewählt, bei dem LIF als lösliches Fusionsprotein mit Thioredoxin (trx) exprimiert wird. Thioredoxin ist eine Oxireduktase und reguliert den Redoxzustand im bakteriellen Zytoplasma [295] und soll zur korrekten Ausbildung der Disulfidbrücken und Konformation beitragen. Der Vektor, mit dem der Wirtstamm *E.coli* BL21 (DE3) transformiert wurde, sowie das resultierende Fusionsprotein sind in Abbildung 5.9 dargestellt. Das LIF wird N-terminal mit His-getagtem Thioredoxin fusioniert, getrennt durch eine TEV (*Tobacco Etch Virus*)-Protease-Spaltungsstelle. Nach einem IMAC-basierten ersten Aufreinigungsschritt können auf diese Weise sowohl das Thioredoxin als auch der His-Tag abgespalten und in einem zweiten Aufreinigungsschritt vom LIF getrennt werden.

### 5.4.1 Kultivierung und Aufschluss

Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit Ampicilin-Zusatz bei 23°C und 150 rpm in Schüttelkolben. Die 100 mL-Kulturen wurden mit 2 ml Vorkultur angeimpft und bei einer OD von 0,8 erfolgte die Induktion mit IPTG. Acht Stunden nach der Induktion (bei einer OD von 2,2) wurden die Bakterien geerntet und mittels Zentrifugation von der Kulturbrühe getrennt. Das aus 50 mL-Kulturbrühe erhaltene Pellet wurde in IMAC-Bindungspuffer auf eine OD von 10 resuspendiert und per Ultraschall aufgeschlossen. (Die detaillierten Protokolle befinden sich in Abschnitt C.3.3.)

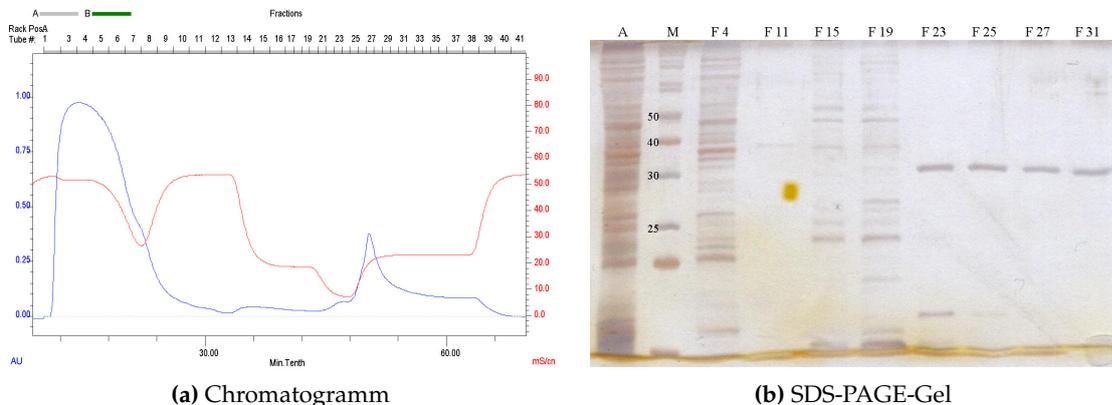
## 5 Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)



**Abbildung 5.9:** Schematische Karte des Vektors, welcher für die Transformation der *E.coli* BL21 (DE3) verwendet wurde; unten: Schematische Darstellung des resultierenden Fusionsproteins (N: Aminoterminus des Polypeptids; *trx*: Thioredoxin; *his*: His-Tag; *tev*: Spaltungsstelle der TEV-Protease; hLIF: humaner Leukimia Inhibitory Factor; C: Carboxyterminus) (aus [296]).

### 5.4.2 Aufreinigung

Für den ersten Schritt der FPLC-Aufreinigung wurden mit  $\text{Ni}^{2+}$ -beladene IDA75-Membranadsorber verwendet. Nach der Auftragung des Proteins wurde zunächst mit 100 mM NaCl und dann mit 100 mM Imidzol gewaschen bevor mit 100 mM NaCl und 250 mM Imidazol eluiert wurde (alles in 50 mM Tris (pH = 7,5), Protokoll siehe C.6.1.5). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.10 dargestellt.

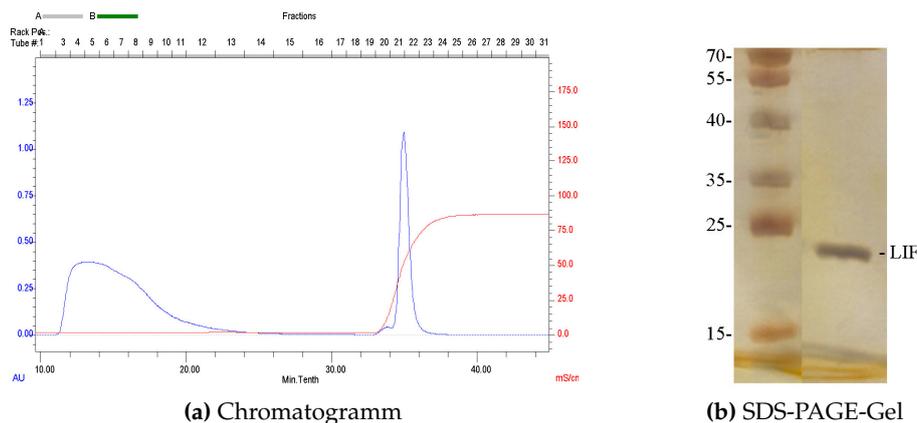


**Abbildung 5.10:** Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen der Aufreinigung des *trx*-*his*-*tev*-hLIF-Fusionsproteins per IMAC ((a) blau: UV-Absorption bei 280 nm [AU], rot: Leitfähigkeit [ $\text{mS}/\text{cm}^2$ ]); (b) A: Aufschluss, M: Marker, F: Fraktion).

Die Fraktionen von 25 bis 33, welche das Fusionsprotein ohne nennenswerte Verunreinigung-

gen enthalten, wurden vereinigt und mittels Densitometrie quantifiziert (Durchführung siehe Abschnitt C.2.4), da bei Quantifizierungsverfahren wie dem Bradford-Assay oder per UV-Absorption bei 280 nm das in den Elutionsfraktionen enthaltene Imidazol ein falschpositives Signal geben würde. Für die Spaltung wurde eine TEV-Protease verwendet, die von Magda Tomala im Rahmen ihrer Promotion in *E.coli* produziert worden ist (siehe [289]). Der Verdau wurde über Nacht bei 4°C mit einem Enzym- zu Substratgewichtsverhältnis von 1:10 durchgeführt.

Die erhaltene Lösung wurde an der FPLC mittels eines S75-Membranadsorbers getrennt. Hierbei werden die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte von Thioredoxin (pI ~ 5,7) und LIF (pI ~ 9,3) ausgenutzt. Das LIF wurde bei einem pH von 7,0 an den Kationenaustauscher gebunden und mit 1 M NaCl eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt, steril filtriert, mittels eines Bradford-Assays quantifiziert und nach Zugabe von 0,5% BSA zum Stabilisieren bei -80°C gelagert. Die Ergebnisse der erfolgreichen Aktivitätstestung sind in Abschnitt 5.5 dargestellt.



**Abbildung 5.11:** Chromatogramm des zweiten Aufreinigungsschrittes per IEX und SDS-PAGE-Gel (15%) der vereinigten Elutionsfraktionen ((a) blau: UV-Absorption bei 280 nm [AU], rot: Leitfähigkeit [mS/cm<sup>2</sup>]).

Die per Bradford-Assay bestimmte Proteinmenge betrug 156 µg (entspricht 3120 µg/L) und lag damit bei 78% der Ausbeute von 4000 µg/L Kulturbrühe, die von Magda Tomala in ihrer Dissertation erreicht werden konnte. Diese Abweichung kann mehrere Gründe haben. Zum einen ist nicht genau beschrieben, welche OD die Kulturbrühe, mit der diese Ausbeute erzielt wurde, hatte. Angegeben ist "zwischen 2,0 und 2,5", hier war die OD 2,2 und die Abweichung zu 2,5 beträgt somit 12%. Zum anderen beschreibt Magda Tomala in ihrer Arbeit, dass die unbeständigste Größe bei der Produktion die Menge des exprimierten löslichen Proteins war, die dadurch auch den größten Einfluss auf die Ausbeute hatte. Diese Schwankungen könnten auch das hier erzielte Ergebnis erklären.

### 5.5 Aktivitätstestung von eukaryotischem und prokaryotischem LIF

#### 5.5.1 Effekte auf murine embryonale Stammzellen

Dieser Aktivitätstest basiert auf einem Aktivitätstest den Magda Tomala während ihrer Promotion [289] etabliert hat.

Es wurde die murine embryonale Stammzelllinie Brachyury verwendet, welche an Suspensionskultur adaptiert worden ist und als Zellsphären wächst. Dem Kultivierungsmedium wurde LIF in einer Konzentration von 10 ng/mL zugesetzt. Als Negativkontrolle wurde ohne LIF kultiviert und als Positivkontrolle wurde das kommerziell erhältliche ESGRO-LIF von Milipore verwendet, welches in *E.coli* produziert worden ist.

Für den Aktivitätstest werden die mESC über einen Zeitraum von vier Tagen kultiviert und täglich die Zellzahl und Vitalität mit Trypanblau bestimmt. Für die Durchführung dieses Testes wurden vier verschiedene Varianten gewählt, welche in Tabelle 5.1 aufgeführt sind. Es zeigte sich, dass die Variante in 35 mm-Petrischalen, bei der für jede Probe eine einzelne Kultivierung angesetzt wird, die robustesten Ergebnisse liefert. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass die in Sphären wachsenden mESC sehr heterogen in der Kultur verteilt vorliegen und wenn man nur einen Teil der Kultur als Probe abnimmt, aus dieser heterogenen Verteilung nur sehr eingeschränkte Reproduzierbarkeit resultiert. Dieser Ansatz wurde für die Durchführung der nachfolgenden Aktivitätstests ausgewählt. Die Protokolle zur Kultivierung und Zellzahlbestimmung der mESCs befinden sich in Abschnitt C.1.3.

**Tabelle 5.1:** Kultivierungsvarianten der LIF-Aktivitätstestung mit mESCs.

Kultivierungsgefäß	Anzahl und Volumen der Kultur(en)	Probenvolumen
Petrischale (50 mm)	1 x 5 mL	1 mL
Petrischale (50 mm)	1 x 10 mL	1 mL
Petrischale (35 mm)	4 x 2 mL	2 mL
Schüttelkolben (110 rpm)	1 x 10 mL	2 mL

Zum Vergleich der Aktivitäten der LIFs wurden die Zellen nicht nur bis zum Zellzahlmaximum (Tag 4) sondern, um eine genauere Aussage zu ermöglichen, über 6 Tage kultiviert. Diese Ergebnisse und die einer zusätzlich an Tag 4 durchgeführten durchflusszytometrischen Apoptosemessung (Protokoll siehe Abschnitt C.4.6) sind in den Abbildungen 5.12 und 5.13 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen klar, dass sowohl das in CHO-Zellen als auch das in *E.coli* produzierte LIF eine Aktivität äquivalent zu der des ESGRO LIFs aufweisen. Ein Unterschied bezüglich der Quelle konnte damit nicht nachgewiesen werden. Da es möglich ist, dass dieses Ergebnis erhalten wurde, weil LIF im Überschuss vorlag, wurden die durchgeführten Kultivierungen noch einmal wiederholt und dem Medium dabei verminderte LIF-Mengen von 100 pg/mL bzw. 1 pg/mL zugesetzt. Die entsprechenden Kultivierungsverläufe sind in Abbildung 5.14

## 5.5 Aktivitätstestung von eukaryotischem und prokaryotischem LIF

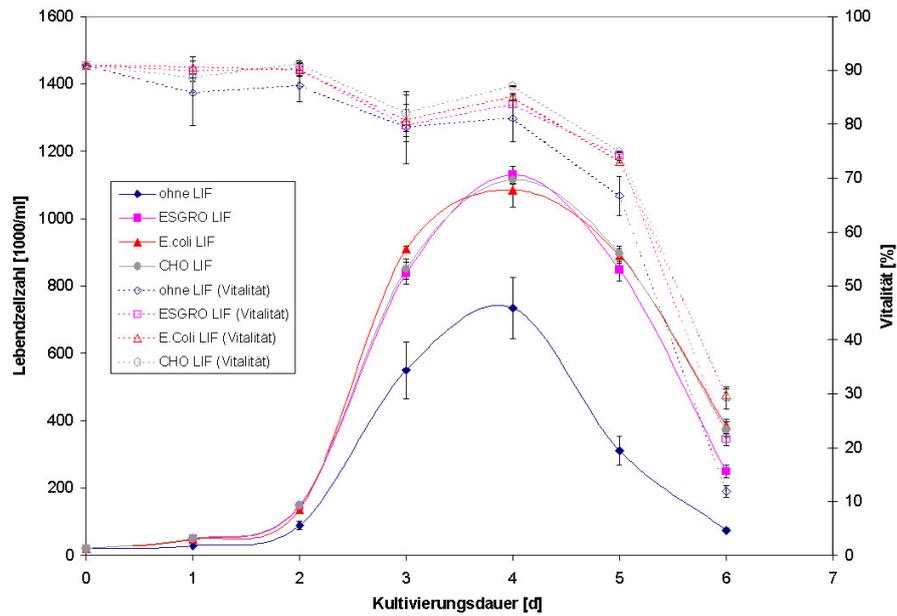


Abbildung 5.12: Lebendzellzahlen und Vitalitäten für die mESC-Kultivierungen mit den zu vergleichenden LIFs.

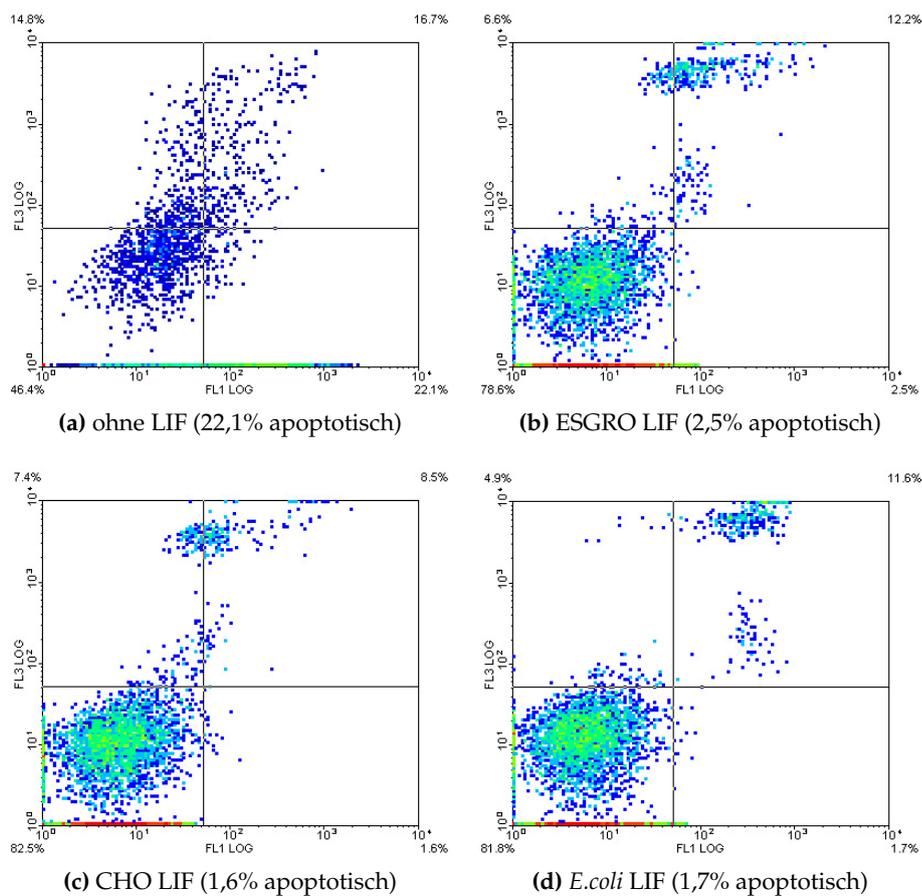
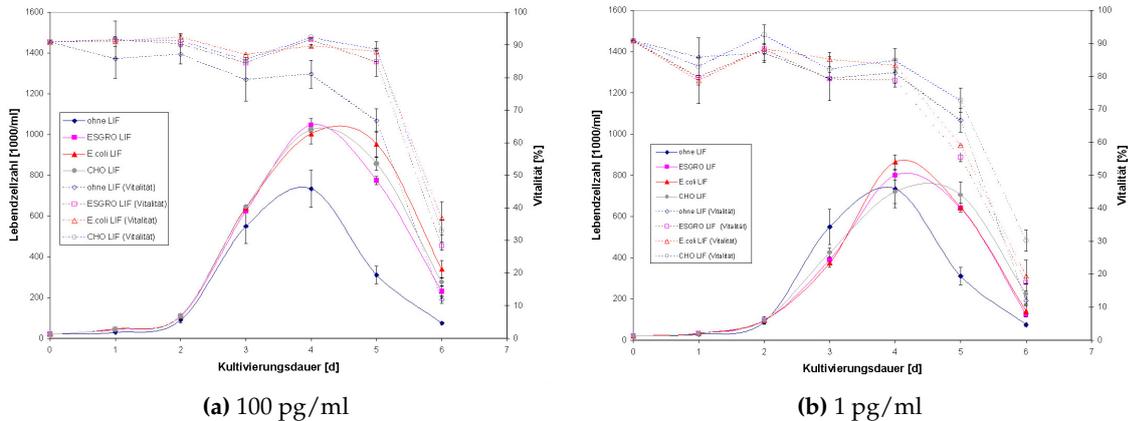


Abbildung 5.13: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Apoptosemessung der mESCs nach vier Tagen Kultivierung.

## 5 Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)

dargestellt.



**Abbildung 5.14:** Lebendzellzahlen und Vitalitäten für die mESC-Kultivierungen mit den zu vergleichenden LIFs in verminderten Konzentrationen.

Die Ergebnisse der Kultivierungen mit den verminderten LIF-Konzentrationen korrelieren mit denen der 10 ng/mL-Kultivierung. Sie zeigen keine Unterschiede bezüglich der Quellen der LIFs. Für die 100 pg/mL-Kultivierung kann ebenfalls ein positiver Effekt der produzierten LIFs auf die Proliferation festgestellt werden, welcher dem des ESGRO LIFs entspricht. Für 1 pg LIF/mL kann kein signifikanter Unterschied zur Kultivierung ohne LIF festgestellt werden.

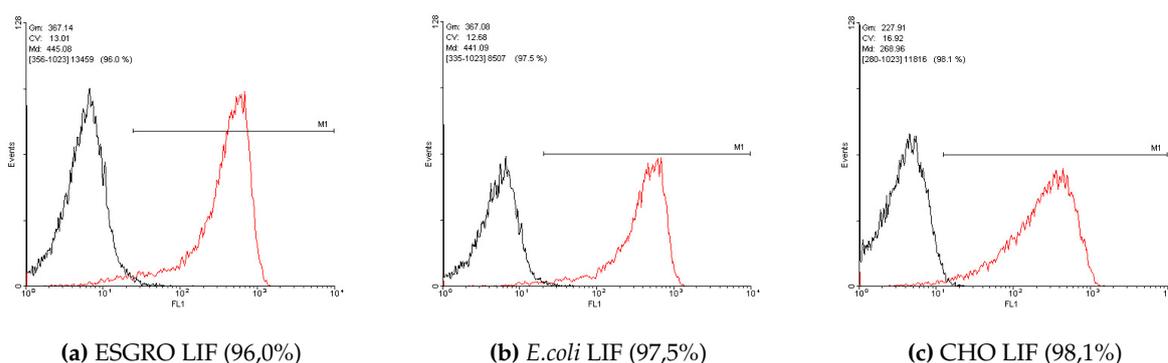
Zusätzlich zum Nachweis der biologischen Aktivität per Zellzahlbestimmung, sollte auch die Fähigkeit zur Erhaltung der Pluripotenz nachgewiesen und verglichen werden. Hierfür wurde die Expression des Zelloberflächenmoleküls und Pluripotenzmarkers SSEA-1 (*stage specific embryonic antigen 1*) durchflusszytometrisch mittels eines anti-SSEA-1-PE Antikörpers nachgewiesen (Protokoll siehe Abschnitt C.4.5). Für die Kultivierung, welche 10 ng LIF/mL enthält, wurde einmal pro Woche (nach 0, 4, 11, 18 und 25 Tagen) und für die Kulturen mit 100 und 1 pg LIF/mL einmal nach 14 Tagen, der Anteil der SSEA-1-positiven Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 und den Abbildungen 5.15 und 5.16 dargestellt.

**Tabelle 5.2:** Durchflusszytometrisch bestimmte Anteile der SSEA-1-positiven mESC-Zellen kultiviert mit 10 ng LIF/mL nach 0, 4, 11, 18 und 25 Tagen in Kultur.

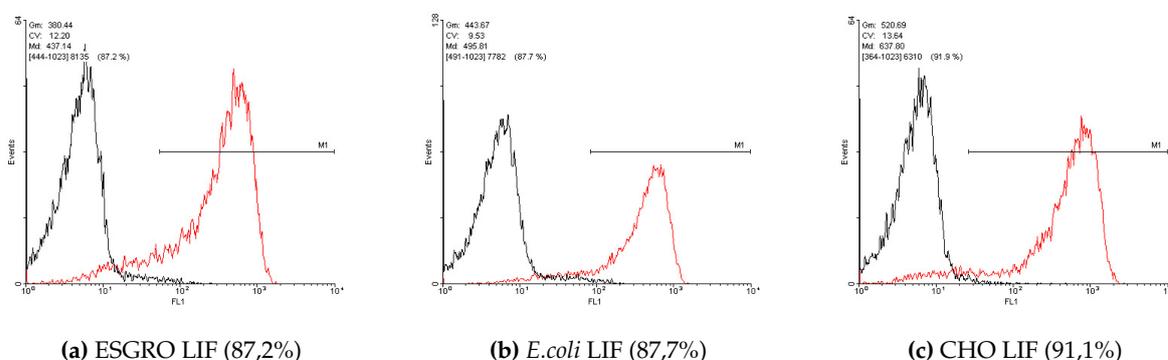
	d 0	d 4	d 11	d 18	d 25
ohne LIF	98,5%	97,8%	32,4%	22,1%	-
ESGRO LIF	98,5%	98,6%	99,4%	99,4%	97,3%
<i>E.coli</i> LIF	98,5%	98,6%	99,3%	98,9%	98,3%
CHO LIF	98,5%	98,6%	99,1%	99,6%	98,9%

Tabelle 5.2 zeigt, dass die SSEA-1-Expression auf einem Level von über 97% bleibt, wenn 10 ng LIF/mL verwendet werden, aber stark abnimmt für die Negativkontrolle. Bei Verwendung von 100 pg LIF/mL (Abbildung 5.15) konnten nach 14 Tagen Anteile SSEA-1-positiver Zellen knapp unterhalb den Werten für 10 ng LIF/mL erreicht werden. Für die Kultivierungen mit der Konzentration von 1 pg LIF/mL (Abbildung 5.16) wurden Anteile von um 90% SSEA-1-positiver

## 5.5 Aktivitätstestung von eukaryotischem und prokaryotischem LIF



**Abbildung 5.15:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der SSEA-1-positiven mESC-Zellen nach 14 Tagen Kultivierung mit 100 pg LIF/mL (In Klammern sind jeweils die Anteile SSEA-1-positiver Zellen angegeben).



**Abbildung 5.16:** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der SSEA-1-positiven mESC-Zellen nach 14 Tagen Kultivierung mit 1 pg LIF/mL (In Klammern sind jeweils die Anteile SSEA-1-positiver Zellen angegeben).

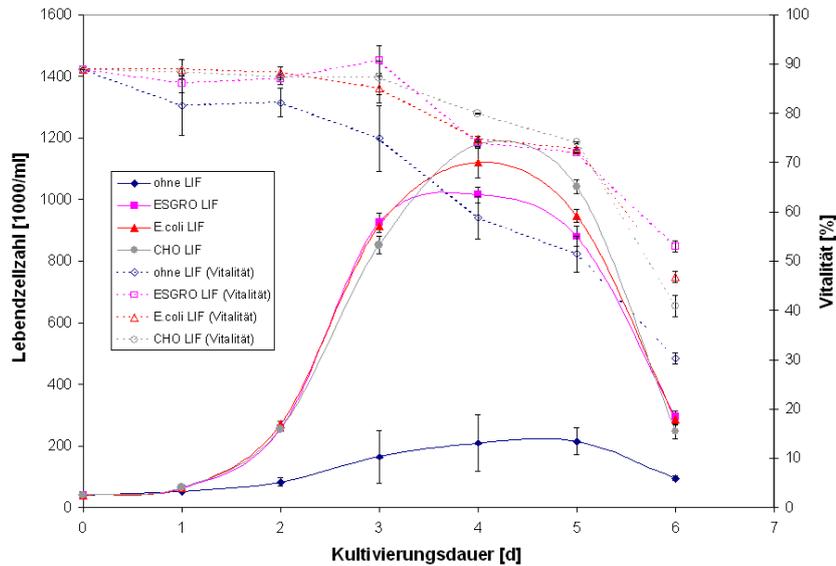
Zellen erreicht, auch wenn durch diese LIF-Menge in Bezug auf die Zellzahl und Vitalität kein Unterschied zur Kultivierung ohne LIF nachweisbar war. Dennoch ist bei keinem dieser Ergebnisse ein Unterschied zwischen den LIFs in Bezug auf ihre Quelle belegbar.

### 5.5.2 Effekte auf murine induzierte pluripotente Stammzellen

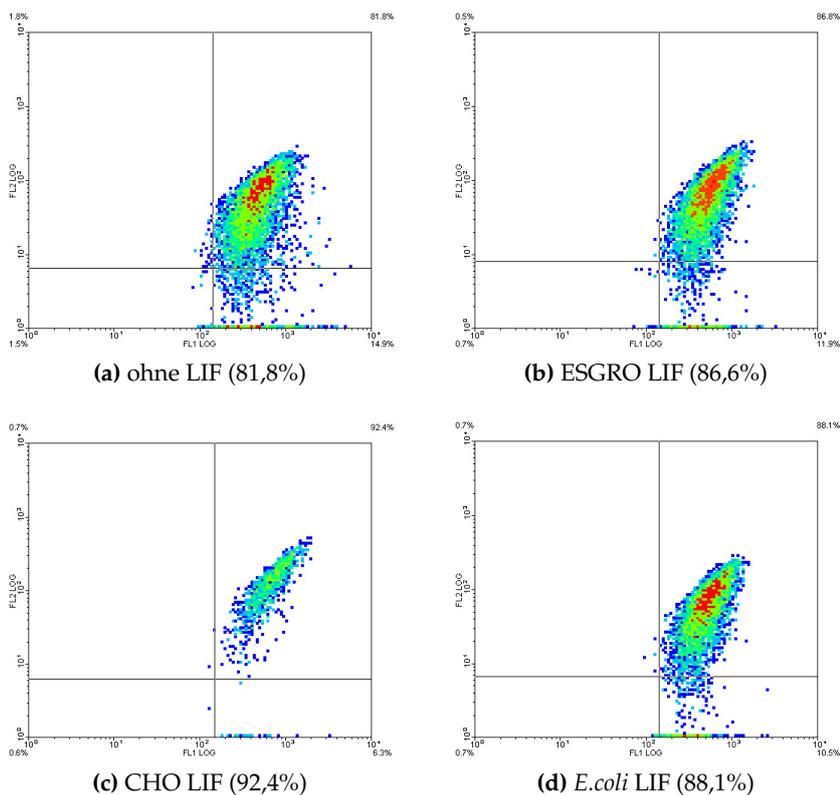
Neben der Testung mit murinen embryonalen Stammzellen wurden die Effekte der produzierten LIFs auch mit murinen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) getestet. Die verwendete iPS-Zelllinie YM100 wurde aus reprogrammierten OG2-Fibroblasten generiert [297] und enthält ein *gfp*-Reportergen unter der Kontrolle eines endogenen Oct4-Promoters. Auch diese Zellen wachsen als Sphären in Suspension und die Kultivierung und Durchführung der Aktivitätstestung entsprach der mit den mESCs. Die Zellzahl- und Vitalitätsergebnisse sind Abbildung 5.17 dargestellt.

Die erhaltenen Wachstumskurven belegen auch hier die Aktivitäten der produzierten LIFs, jedoch sind keine Unterschiede bezüglich dieser feststellbar.

## 5 Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)

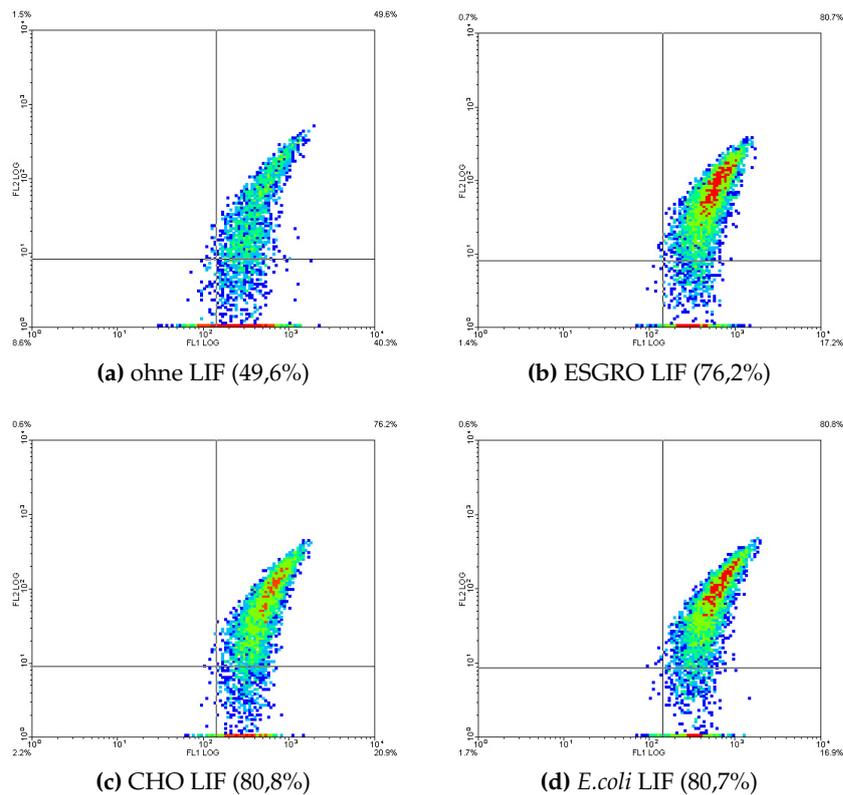


**Abbildung 5.17:** Lebendzellzahlen und Vitalitäten für die iPS-Kultivierungen mit den zu vergleichenden LIFs bei einer Konzentration von 10 ng/mL.



**Abbildung 5.18:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen SSEA-1- (FL2) und GFP-Messungen (FL-1) der iPS-Zellen an Tag 4 (in Klammern ist jeweils der Anteil der doppelt positiven Zellen angegeben)

Für die Bestimmung der pluripotenzerhaltenen Eigenschaften wurde hier neben der SSEA-1-Expression auch die Expression von GFP bestimmt, welche unter der Kontrolle eines Oct4-Promoters steht. Oct4 ist ein Protein, welches entscheidend in die Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen involviert ist. Für SSEA-1 wird als Negativkontrolle



**Abbildung 5.19:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen SSEA-1- (FL2) und GFP-Messungen (FL-1) der iPS-Zellen an Tag 21 (in Klammern ist jeweils der Anteil der doppelt positiven Zellen angegeben)

ein Isotypenkontrollantikörper verwendet. Da dies bei der GFP-Messung nicht möglich ist, werden die Ergebnisse mit denen zu Beginn der Kultivierung verglichen (d.h. der Wert auf der FL1 LOG-Achse, bei welchem 99% der ursprünglichen Kultur positiv waren, wird hier als Grenzwert verwendet). Die Ergebnisse der Messungen an Tag 4 und Tag 21 sind in den Abbildungen 5.18 und 5.19 dargestellt.

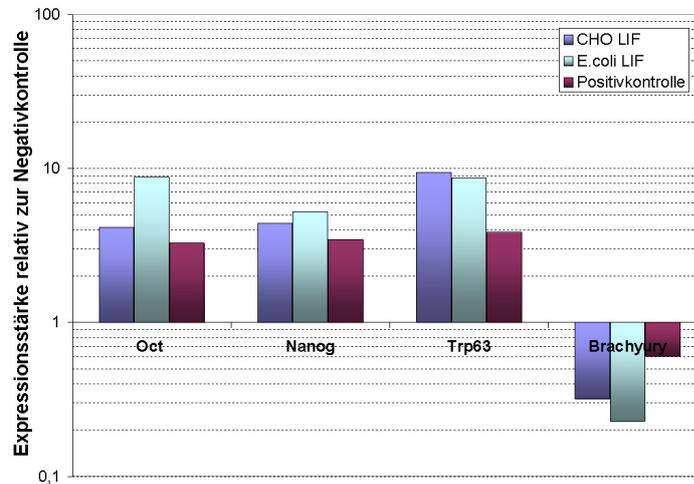
Die Ergebnisse zeigen eine leichte Abnahme der SSEA-1-Expression und stabile Werte für die von GFP, aber keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Quelle der verwendeten LIFs.

### 5.5.3 Effekte auf adhärente murine embryonale Stammzellen

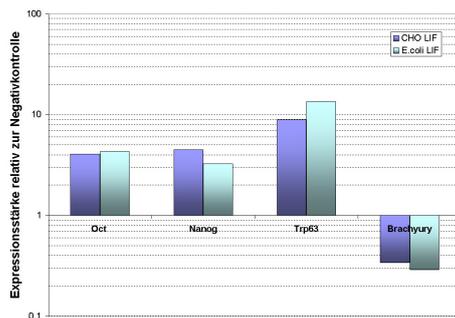
In der AG Cantz (JRG Stem Cell Biology) an der Medizinischen Hochschule Hannover wurden die Effekte der verschiedenen LIFs zusätzlich an adhärent wachsenden murinen embryonalen Stammzellen getestet. Diese wurden in 6-Loch-Platten auf C3H-bestrahlten murinen embryonalen Fibroblasten als Feederzellen mit LIF-Konzentrationen von 40, 10 und 2,5 ng/mL kultiviert. Als Positivkontrolle wurde bei der 10 ng/ml-Kultur LIF verwendet, das vom Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin (Münster) in *E.coli* produziert und entsprechend getestet worden ist. Das Medium wurde jeweils alle zwei Tage gewechselt und die Zellen zweimal wöchentlich passagiert. Nach 24 Tagen wurden die Zellen geerntet und eine qRT-PCR durchgeführt. Dabei wurde  $\beta$ -Actin als HKG verwendet und die Expressionslevel der Pluripotenz-

## 5 Der Leukämie inhibierende Faktor (LIF)

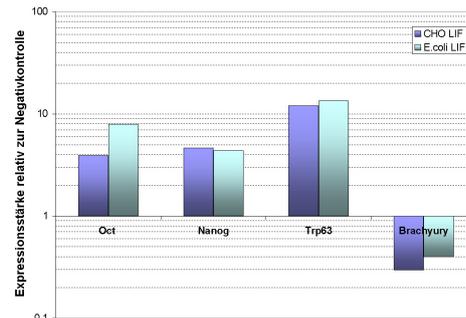
marker Oct4 und Nanog, sowie von Markern für jedes der drei Keimblätter (Trp63 für ektodermale, AFP für endodermale und Brachyury für mesodermale Differenzierung) wurden quantifiziert.



(a) 10 ng/ml



(b) 2,5 ng/ml



(c) 40 ng/ml

**Abbildung 5.20:** Relative Expressionsstärken der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog, des ektodermalen Markers Trp63 und des mesodermalen Markers Brachyury für Kultivierungen der adhärennten mESC mit den drei verschiedenen LIFs nach 25 Tagen Kultivierungsdauer (die Werte für den endodermalen Marker AFP können nicht dargestellt werden, da keine Kopien nachweisbar waren).

In Abbildung 5.20 kann man erkennen, dass relativ zur Negativkontrolle die Pluripotenzmarker hochreguliert und der mesodermale Marker runterreguliert sind. Dies spricht für eine spontane Differenzierung der Negativkontrolle in das mesodermale Keimblatt. Zwischen den verwendeten LIFs konnten jedoch für keine der verwendeten Konzentrationen bedeutende Unterschiede festgestellt werden.

Insgesamt konnte in keinem der durchgeführten Experimente ein Unterschied zwischen den eukaryotischem und prokaryotischem LIF festgestellt werden. Die Aktivität der produzierten LIFs stimmt in Bezug auf die proliferationsfördernden und pluripotenzhaltenden Eigenschaften mit denen von kommerziell erhältlichem LIF überein. Die post-translationalen Modifikationen des Proteins üben folglich keinen Einfluss auf eine dieser Funktionen auf. Die Frage, welches der beiden Produktionssysteme in Zukunft bevorzugt werden sollte, hängt damit nur

vom Produktionsprozess ab. Betrachtet man diese, so sind als hauptsächliche Unterschiede die Kultivierungsdauer und -kosten, die Ausbeute und die zusätzlich nötige TEV-Protease für die *E.coli*-Produktion zu nennen. In Bezug auf die Aufreinigung ähneln sich die Prozesse. Es sind beides Zweischrittaufreinigungen mit einer IMAC als erstem Schritt. Der *E.coli*-Prozess weist als größten Nachteil die Notwendigkeit der zusätzlichen Produktion der TEV-Protease auf. Diese kann zwar auch kommerziell bezogen werden, jedoch würde dies den *E.coli*-Prozess deutlich teurer machen als den CHO-Prozess. Vorteile der Produktion in *E.coli* hingegen sind die deutlich kürzere Dauer, die einfachere Handhabung und die größere Reproduzierbarkeit des Kultivierungsprozesses, sowie die Ausbeute, welche bei den in dieser Arbeit erreichten Werten für die *E.coli*-Produktion mehr als viermal so hoch war (3120 gegenüber 720 µg/L). Aus diesen Gründen wird eine zukünftige Produktion in *E.coli* empfohlen.

## 5.6 Zusammenfassung

Die in der Arbeit von Pierre Moretti begonnene Produktion von LIF in CHO-Zellen konnte in dieser Arbeit größtenteils abgeschlossen werden. Für die Aufreinigung wurde ein zweiter Schritt gefunden, durch welchen das Zielprotein komplett rein und aktiv, mit einer Ausbeute von bis zu 720 µg/L erhalten werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach dem hier etablierten Verfahren insgesamt etwa 1,8 mg reines CHO-LIF produziert. Es wurde ein *scale-up* der Kultivierung in den Reaktormaßstab (2 L Volumen) durchgeführt. Aufgrund ungenügender Übertragbarkeit der Optimalbedingungen für nicht-transfizierte Zellen konnten dabei keine besseren Ausbeuteergebnisse als bei der Kultivierung in Spinnerflaschen erzielt werden. Die von Pierre Moretti per Einzelzellklonierung erstellten Subzelllinien konnten aufgrund ihrer schlechten Wachstumseigenschaften nicht für die Produktion verwendet werden. Durch eine Wiederholung der Klonierung könnten möglicherweise Einzelzellklone erhalten werden, deren Wachstumseigenschaften denen der Parentalzelllinie entspricht. Zudem konnte LIF als *trx*-Fusionsprotein in *E.coli* produziert werden. Zur Evaluierung des Einflusses der post-translationalen Modifikationen auf die Bioaktivität wurden sowohl murine embryonale als auch induzierte pluripotente Stammzellen mit den verschiedenen LIFs kultiviert und dabei die proliferationsfördernden und pluripotenzhaltenden Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse dieser Tests zeigten, dass die post-translationalen Modifikationen für die Bioaktivität des LIFs nicht nötig sind und ein Vergleich der Produktionsprozesses ergab Vorteile für die zukünftige Produktion in *E. coli*.



## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war es die Proteine LIF, VEGF<sub>165</sub> und Dll1Fc rekombinant in CHO-Zellen zu exprimieren, hochproduzierende Subzelllinien zu generieren, ein Aufreinigungsverfahren und eine Methode zur Aktivitätstestung zu etablieren und zu optimieren und die entwickelten Verfahren dann zur Produktion im Labormaßstab einzusetzen.

Für das Dll1Fc konnten sowohl durch Lipofektion als auch per Calciumphosphatpräzipitation produzierende Zelllinien erstellt werden. Hochproduzenten konnten sowohl mittels Einzelzellklonierungen, als auch per FACS-Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität gewonnen werden. Für die Aufreinigung konnten Protein G- und A-Affinitätschromatographie erfolgreich eingesetzt werden und die Aktivität des über Protein G aufgereinigten Proteins konnte mittels eines Luciferase-Assays nachgewiesen werden. Für die Produktion eignen sich die erstellten Zelllinien jedoch nicht, da die Expression des Zielproteins instabil ist. Es muss eine neue Zelllinie erstellt und erneut eine Hochproduzentenselektion durchgeführt werden. Die etablierten Aufreinigungs- und Testungsverfahren können übernommen werden.

Bei der Erstellung der Zelllinien für VEGF<sub>165</sub> konnte erfolgreich lentiviraler Gentransfer eingesetzt werden. Die Sezernierung des VEGF<sub>165</sub> wurde mittels des IL2-Signalpeptides erreicht, da hier, im Gegensatz zu den anderen beiden Zielproteinen, das native Signalpeptid nicht zur Sezernierung führte. Für die Erzeugung hochproduzierender Subzelllinien stellte sich die indirekte Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität als erfolgreicher heraus, als ein direkter Ansatz mit einem fluoreszenzgekoppelten anti-VEGF-Antikörper. Alle erhaltenen Zelllinien zeigten nach einer anfänglichen Abnahme relativ stabile Langzeitexpressionslevel. Die Aufreinigung aus dem Zellaufschluss war nur mittels einer direkten Affinitätschromatographie möglich. Für das sezernierte VEGF<sub>165</sub> konnte eine Zweischrittaufreinigung mittels IMAC und HAC etabliert werden. Für die Testung der Aktivität wurden ein Proliferationsassay mit HUVECs und ein Verfahren zur Gewinnung dieser Zellen etabliert. Die Testung der Aktivität der aufgereinigten VEGF<sub>165</sub> zeigte eingeschränkte Aktivität für das aus dem Zellaufschluss aufgereinigte und mit einem kommerziellen Protein vergleichbare Aktivität für das sezernierte VEGF<sub>165</sub>. Noch zu etablieren ist ein *scale-up* der Kultivierung in den Reaktormaßstab für die Subzelllinie V250-GFP10, welche aufgrund ihrer Produktivität und Wachstumseigenschaften für die Produktion ausgewählt worden ist.

Die Produktion von LIF ist ein Prozess, der in den Arbeiten von Pierre Moretti [287] und Janina Bahnemann [288] begonnen wurde und hier nahezu abgeschlossen werden konnte. Die Aufreinigung wurde um einen zweiten Schritt per HAC ergänzt, wodurch das Protein komplett rein erhalten werden konnte. Ein *scale-up* in den Reaktormaßstab konnte durchgeführt

werden, benötigt aber noch spezifische Optimierungen in Bezug auf die Kultivierungsbedingungen. Insgesamt konnte etwa 1,8 mg LIF aus CHO-Zellen produziert werden um anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt zu werden. Zusätzlich wurde LIF als trx-Fusionsprotein in *E.coli* produziert und die pluripotenzerhaltenden und proliferationsfördernden Eigenschaften beider LIFs in mehreren Assays mit embryonalen und induzierten Stammzellen getestet. Ein Effekt der Glykosilierung auf die Bioaktivität konnte jedoch nicht gefunden werden und für die zukünftige Produktion wird das prokaryotische System empfohlen.

Für die zukünftige Erstellung von CHO-basierten Produktionssystemen haben sich in dieser Arbeit einige Prozesse als sehr vielversprechend herausgestellt. Es hat sich gezeigt, dass der Aufbau des Vektors und das System für den Gentransfer von zentraler Bedeutung für die erfolgreiche Etablierung solcher Produktionsplattformen sind.

Für den Gentransfer konnte die Überlegenheit des lentiviralen Ansatzes über die hier verwendeten chemischen Methoden der Lipofektion und der Calciumphosphatpräzipitation gezeigt werden. Die Transfektionseffizienzen der chemischen Methoden waren deutlich geringer, bzw. gelang in einigen Fällen die Transfektion nicht. Mittels lentiviraler Transduktion konnten Effizienzen von nahezu 100% erreicht werden. In Bezug auf das Expressionslevel konnte eine Abhängigkeit von der MOI nachgewiesen werden. Diese beruht wahrscheinlich auf einer erhöhten Anzahl integrierter Vektorkopien. Für die zukünftige Erstellung von Zelllinien könnte durch eine Optimierung der MOI wahrscheinlich auch das Expressionslevel noch weiter gesteigert werden. Zudem ist bei den durch lentivirale Transduktion erzeugten Zelllinien die Expression deutlich stabiler, was vermutlich in einem Zusammenhang mit der gezielten Integration des Vektors in das Genom steht, wodurch die Heterochromatisierung weitestgehend vermieden werden kann.

In Bezug auf den Aufbau des Vektors haben sich zwei Elemente als besonders bedeutend herausgestellt: das Signalpeptid und der Promotor. Nach den erzielten Ergebnissen ist es unwahrscheinlich, dass es möglich sein wird, ein universell verwendbares Signalpeptid zu finden. Auch bei etablierten Säugerproduktionsplattformen kann Sezernierung verschiedener Proteine nur durch eine Variation des Signalpeptides erreicht werden [7]. So wird auch in Zukunft für unterschiedliche Zielproteine eine individuelle Anpassung nötig sein. In Bezug auf den Promotor konnte mit dem bei LIF und VEGF<sub>165</sub> verwendeten SFFV-Promotor bessere Ergebnisse erzielt werden als mit dem CMV-Promotor bei Dll1Fc. Die Instabilität der Dll1Fc-Expression ist vermutlich zum Teil auf die Stilllegung des Promotors zurückzuführen, die beim CMV-Promotor bekanntermaßen ausgeprägt ist [251]. Durch die Kombination des SFFV-Promotors mit lentiviralem Gentransfer, konnten deutlich geringere Reduktionen des Expressionslevels erreicht werden, das nach einer anfänglichen Abnahme über sehr lange Kultivierungszeiträume stabil blieb. Für zukünftige Ansätze könnten zusätzlich UCOEs (*ubiquitous chromatin opening elements*) in den Vektor integriert werden, durch welche die Stilllegung integrierter lentiviraler Transgene noch weiter reduziert werden kann [298][299]. Es wäre empfehlenswert die genauen Ursachen für die Expressionsabnahme zu analysieren um zielgerichtete Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. Dafür müssten die Kopienzahl, die Methylierungen des Promotors und

---

das Expressionslevel über einen längeren Kultivierungszeitraum hindurch quantifiziert werden.

In Bezug auf die verwendeten Selektionsgene *sh ble* und *dhfr* bietet das *dhfr*-System den Vorteil, dass die selektiven Bedingungen (Kultivierung ohne Thymidin und Hypoxanthin) keine Belastung für die Zelle darstellen und es durch die Verwendung von MTX trotzdem noch die Möglichkeit gäbe eine Amplifikation des integrierten Vektors zu erzwingen. Dieser Ansatz konnte in dieser Arbeit aufgrund Zeitmangels nicht mehr verfolgt werden, sollte aber bei zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden. Die Integration des Markergens *gfp* hat sich als sehr hilfreich für die Selektion von Hochproduzenten erwiesen. Die Kombination mit dem Selektionsgen und die zusätzliche Verknüpfung mit dem GOI über eine IRES (wie im zweiten VEGF-Vektor realisiert) ist ein sehr vielversprechender Ansatz korrespondierende Expressionslevel zu erreichen. Hiermit sollte weitergearbeitet und die Korrelation per qRT-PCR überprüft werden.

Bei der Erzeugung hochproduzierender Subzelllinien bietet sich für die Zukunft eine Kombination der Einzelzellklonierung mit einer FACS-Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität an. Unter Verwendung eines Vektors, der das GOI über eine IRES mit dem *gfp*-Gen verknüpft, sollte man so ausschließlich hochproduzierende Einzelzellklone erhalten und die Effizienz der Einzelzellklonierung deutlich erhöhen können.

Ein *scale-up* der Kultivierung in den Reaktormaßstab von 2 L wurde in dieser Arbeit nur für die CHO-LIF-Zellen durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass sich die Kultivierungsbedingungen, die für die untransfizierte Parentalzelllinie als optimal ermittelt wurden, nicht auf die LIF-produzierenden Zellen übertragen lassen. Da bei der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der verschiedenen VEGF<sub>165</sub>- und Dll1Fc-produzierenden Zellen z.T. deutliche Unterschiede zur parentalen CHO<sup>SFS</sup>-Zelllinie festgestellt werden konnten, ist auch für diese wahrscheinlich keine Übertragbarkeit der Bedingungen gegeben. Es ist vermutlich nötig die Optimalbedingungen für jede Zelllinie einzeln zu ermitteln. Bezüglich der erreichten Zelldichten finden sich in der Literatur für die hier verwendeten CHO<sup>SFS</sup>-Zellen keine Vergleichsdaten. Wenn man Produktionsprozesse in stabil transfizierten, *dhfr*-negativen CHO-Zellen in serumfreier Suspensionskultur betrachtet, findet man Maximalzelldichten von  $1,8 \cdot 10^6$  Zellen/mL (CHO-DUKX-B11) [300] über  $3,0 \cdot 10^6$  Zellen/mL (CHO-DG44) [284] bis zu  $5,5 \cdot 10^6$  Zellen/mL (CHO-DG44) [301]. In Bezug auf die Zelldichte sollte evaluiert werden, in wie weit eine Optimierung der Prozessbedingungen noch eine Steigerung zulässt oder ob auf eine andere Zelllinie gewechselt werden sollte. Wenn als neue Zelllinie eine andere *dhfr*-negative CHO-Zelllinie gewählt werden würde, so sollten sich auch die gemachten Überlegungen bezüglich des Vektoraufbaus und des Gentransfersystems übertragen lassen.

In Bezug auf die Aufreinigung ist eine Verallgemeinerung der Ergebnisse schwierig, da hierbei die jeweiligen physikochemischen Eigenschaften des entsprechenden Moleküls eine bedeutende Rolle spielen. Für die Etablierung der Aufreinigungen von LIF und VEGF<sub>165</sub> stellte der His-Tag eine deutliche Vereinfachung dar, ermöglichte jedoch keine Einzelschrittaufreinigung. Für den in der zweiten VEGF-Zelllinie zusätzlich verwendeten HA-Tag existiert eine spezifische Affinitätschromatographie. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Affinitätsmatrix per

Verdrängung eluiert werden muss. Hierfür wird ein synthetisches Peptid, dessen Sequenz der des HA-Tags entspricht, im Überschuss eingesetzt. Dadurch ist dieses Verfahren sehr kostenintensiv. Sollte sich so jedoch Übertragbarkeit des Aufreinigungsprozesses innerhalb der CHO-Plattform realisieren lassen, wäre es dennoch der vorzuziehende Ansatz, da dadurch die äußerst zeitintensive Etablierung des Aufreinigungsverfahrens entfallen würde. Durch die Addition eines Tags besteht bei rekombinanten Proteinen immer die Gefahr verringerter biologischer Aktivität. Auch wenn dies bei den hier produzierten Proteinen nicht festgestellt werden konnte, so sollte zukünftig auf einen der Tags verzichtet werden, da eine Notwendigkeit für die gleichzeitige Verwendung von zwei Tags nicht gegeben ist.

# A Übersicht über die im Rahmen der Arbeit erstellten Zelllinien

**Tabelle A.1:** Übersicht über die mit dem Dll1Fc-Vektor (Abbildung 3.1) erstellten Zelllinien und Subzelllinien

Name	Parentalzelllinie	Ursprung
DF3	CHO <sup>SFS</sup>	3:1-Ansatz der Lipofektion mit dem FuGene6-Kit
DF6	CHO <sup>SFS</sup>	6:1-Ansatz der Lipofektion mit dem FuGene6-Kit
DFa	CHO <sup>SFS</sup>	0,2 µg-Ansatz der Calciumphosphatpräzipitation
DFb	CHO <sup>SFS</sup>	0,4 µg-Ansatz der Calciumphosphatpräzipitation
DFc	CHO <sup>SFS</sup>	0,8 µg-Ansatz Calciumphosphatpräzipitation
IIIF11	DF6	Einzelzellklonierung per Verdünnung
VIIC3	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
VIIC5	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
VIID7	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
VIID9	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
VIIF11	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
VIIIG8	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
XC9	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
XF7	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
XG5	DF6	Einzelzellklonierung per FACS
DFc-05	DFc	FACS-Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität (am höchsten fluoreszierende 5%)
DFc-10	DFc	FACS-Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität (am höchsten fluoreszierende 10%)

## A Übersicht über die im Rahmen der Arbeit erstellten Zelllinien

---

**Tabelle A.2:** Übersicht über die mit dem zweiten VEGF-Vektor (Abbildung 4.8) erstellten Zelllinien und Subzelllinien

Name	Parentalzelllinie	Ursprung
VEGF-100	CHO <sup>SFS</sup>	Von der AG Schambach mit 100 µL infektiösem Überstand lentiviral transduziert
VEGF-250	CHO <sup>SFS</sup>	Von der AG Schambach mit 250 µL infektiösem Überstand lentiviral transduziert
V250-GFP10	VEGF-250	FACS-Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität (am höchsten fluoreszierende 10%)
V250-GFP30	VEGF-250	FACS-Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität (am höchsten fluoreszierende 30%)
V250-CIA10	VEGF-250	FACS-Sortierung nach Kälteinkubationsassay (am höchsten fluoreszierende 10%)
V250-CIA30	VEGF-250	FACS-Sortierung nach Kälteinkubationsassay (am höchsten fluoreszierende 30%)

Zudem wurde von der AG Schambach mit dem ersten VEGF-Vektor (Abbildung 4.1) eine Zelllinie per lentiviraler Transduktion erstellt aus der keine Subzelllinien erzeugt wurden.

# B Materialien

## B.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
CultiFlask 50 Tubes	Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Einmalhandschuhe Semperguard	Semperit AG Holding, Wien, Österreich
Einmalpipetten	
1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Erlenmeyerkolben 125 und 250 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Filterpapiere, Filz pads	Bio-Rad, München
Kryoröhrchen 1,6 ml	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Petrischalen	
60 und 94 mm Durchmesser	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipettenspitzen Typ A, B, D	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
PVDF Membran	Bio-Rad, München
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen	
(Falcon Tubes) 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Spritzen 10 ml, 20 mL, 50 ml	Terumo Europe NV, Leuven, Belgien
Spritzenvorsatzfilter	
Minisart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Vivaspin 2, 6 und 20 ml	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Vivaflow 50	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Zellkulturflaschen	
T175-, T75-, T25-Flaschen	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Zellkulturplatten	
96-, 24-, 6-Lochplatten	Nunc ThermoFischer, Langenselbold
Zellsiebe 40 µm Ausschlussgröße	BD Biosciences, Heidelberg

## B.2 Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Biostat Bplus Steuereinheit	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

## B Materialien

---

Cleanbench MSC Advantage	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Beckmann-Coulter, Florida, USA
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
FACS Vantage SE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Feinwaage MC 1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
FPLC BioLogic AVR7-3	Bio-Rad, München
Fraktionssammler Model 2128	Bio-Rad, München
HI 221 Calibration Check	
Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
HiTrap Protein A HP Säule	GE Healthcare, Fairfield, Connecticut, USA
HiTrap Protein G HP Säule	GE Healthcare, Fairfield, Connecticut, USA
iCycler	Bio-Rad, München
Inkubatorschrank	Thermo Electron Corporation, Erlangen
iQ5 Multicolor Real Time	
PCR Detection System	Bio-Rad, München
Lichtmikroskop Olympus BH-2	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Magnetrührer RCTb	IKA Werke GmbH, Staufen
Megafuge 1.0 RS	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
O <sub>2</sub> -Sensor OXYFERM	Hamilton, Bonaduz, CH
pH-Elektrode Checker	Hanna Instruments Ltd, Leighton Buzzard, UK
Proteoma 300Å- Säule	Polymer Standard Services, Mainz
Px2 Thermal Cycler	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Reinstwasseranlage Arium 611 uf uv	Sartorius, Göttingen
Spinnerflaschen	Techne AG, Jahnsdorf
S-Membran Sartobind S75	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad, München
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultraschallsonde	B. Braun Biotech International GmbH
Vortex-Mixer VM-300	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Zentrifuge Multifuge 3s	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg

## B.3 Chemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	ABgene, Hamburg
Aminosäuren, nicht essentielle	Gibco, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Ammoniumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Ampicillin	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
APS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Bismethylenacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Bromphenolblau	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Cobaltsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie PhastGel Blue R	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Coomassie Brilliantblau R-250	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Formaldehydlösung (36,5%)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Glucose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Glutaraldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Glycerin	Fluka Chemie AG, Buchs
Glycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Hefeextrakt	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
HEPES	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Imidazol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, CH

## B Materialien

---

Kupfersulfat	Merck KgaA, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe
MTT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumacetat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumazid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumborat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumcarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, Buchs, CH
Natriumhydroxid	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Natronlauge	Honeywell Riedel-de Haën, Seelze
Natriumpyruvat	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Nickelsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Phosphorsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Pyridin	Honeywell Specialty Chemicals GmbH, Seelze
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden
Salzsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Saponin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
SDS	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Silbernitrat	Honeywell Specialty Chemicals GmbH, Seelze
Sso Advanced SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
TEMED	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Trans- $\beta$ -Nitrostyrol	Merck KgaA, Darmstadt
Tris (Base)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Tris-HCl	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Trypton	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Tween 20	Sigma, Buchs, CH
Zitronensäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München

## B.4 Biomoleküle, Kits und Fertigmedien

Produkt	Hersteller
Annexin-V FITC-Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
BSA	Sigma, Buchs, CH
Cell Proliferation ELISA BrdU	Roche GmbH, Basel, CH
CellTiter Blue Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
Collagenase Typ 1	Biochrom AG, Berlin
Collagenase Typ 1	Worthington Biochemical Corp., New Jersey, USA
DMEM <i>high glucose</i>	Gibco, Karlsruhe
Endothelial Cell Growth Medium 2 Kit	PromoCell GmbH, Heidelberg
Ez4U Cell Proliferation Assay	Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co. KG, Wien, A
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Page Ruler #0661 unstained protein ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Page Ruler #0671 prestained protein ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Page Ruler #1841 prestained protein ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Venlo, NL
ProCHO4	Lonza, Köln
ProCHO5	Lonza, Köln
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Venlo, NL

### B.4.1 Antikörper

Produkt	Hersteller
donkey-anti-shepp-IgG-FITC	Dianova, Hamburg
goat-anti-mouse-IgG-(H+L)-alkaline phosphatase-conjugate	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
goat-anti-mouse-PE	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
mouse-anti-His-Tag	Santa Cruz Biotechnology, USA
mouse-anti-human-CD31-FITC	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
mouse-anti-human-CD34-PECy5	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
mouse-anti-human-CD73-PE	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
mouse-anti-human-CD90-FITC	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
mouse-IgG1-FITC, Isotype Control	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
mouse-IgG1-PECy5, Isotype Control	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
mouse-IgG1-PE, Isotype Control	BD Biosciences Pharmingen, New Jersey, USA
sheep-anti-rat-Dll1	R&D Systems, Minneapolis, USA

### B.4.2 Primer

- *vegf*
  - Forward: GGCCTGGAGTGTGTGCCAC
  - Reverse: CCGCTCTGAGCAAGGCCAC
  - Produktlänge: 177
- *yaf2*
  - Forward: CGCCGAGGCCTTCAAGTGCA
  - Reverse: CTGCGTGACCTGCTGTGCGA
  - Produktlänge: 100
- *elf3i*
  - Forward: GCAGGCCACGAGAGCGGAG
  - Reverse: AGCTGTGTTGTCCTTAGATGCAGTG
  - Produktlänge: 150
- *gapdg*
  - Forward: AACCTGGACCACCCACCCC
  - Reverse: TGTTGGGGGCCGAGTTGGGA
  - Produktlänge: 69

## B.5 Puffer und Lösungen

Die Puffer für die chromatographischen Aufreinigungsverfahren sind der Übersichtlichkeit halber direkt bei den jeweiligen Methoden in Kapitel C.6 angegeben.

### Allgemein

PBS-Puffer:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5

PBST-Puffer:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 % Tween 20, pH 7,5

SSC-Puffer:

3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, auf pH 7,0 einstellen

### Western Blot

#### Transfer-Puffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Ethanol, pH 8,3

#### TBS-Puffer:

25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4

#### TBST-Puffer:

25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20, pH 7,4

#### Block-Puffer:

25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2% BSA, 0,5% Tween 20, pH 7,4

#### AP-Puffer:

100 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5

#### Farbentwicklungslösung:

25 mL AP-Puffer und 250 µL Farbreagenz A und B

### Bradford-Assay

#### Bradford-Reagenz:

25 mg Coomassie Blue G-250, 12,5 mL Ethanol (95%), 25 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%), 250 mL dH<sub>2</sub>O

### Agarosegel-Elektrophorese

#### TAE-Puffer:

40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Eisessig, pH 8,5

### SDS-PAGE

#### 2x Laemmli:

250 mM Tris-HCl, 20 % Glycerin, 5 % SDS, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau, pH 6,8

#### Trenngel (12%):

3 mL Rotiphorese Gel 40, 2,5 mL 1,5 M Tris (pH 8,8), 1,78 mL dH<sub>2</sub>O, 1 ml 1% SDS, 20 µL TEMED, 20 µL APS

#### Sammelgel (6%):

750 µL Rotiphorese Gel 40, 1,25 ml 1,5 M Tris (pH 6,8), 2,46 mL dH<sub>2</sub>O, 520 µL 1% SDS, 10 µL TEMED, 10 µL APS

#### Fixierer/Entfärber für die Silberfärbung:

45% dH<sub>2</sub>O, 45% Ethanol, 10% Essigsäure

#### Farmers Reducer:

1 Spatelspitze K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 1 Spatelspitze Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in 100 mL dH<sub>2</sub>O

## B Materialien

---

Silber-Lösung:

1 Spatelspitze  $\text{AgNO}_3$  in 100 mL  $\text{dH}_2\text{O}$

Formaldehyd-Lösung:

300  $\mu\text{L}$  Formaldehyd in 100 mL 2,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung

### MTT-Test

MTT-Lösung:

DMEM, 10% FCS, 1% P/S, 10% MTT

SDS-Lösung:

10% SDS in  $\text{dH}_2\text{O}$

### Durchflusszytometrische intrazelluläre Färbung

Block-Puffer:

2% FCS in PBS

Permeabilisierungslösung:

0,1% Saponin in 2% FCS in PBS

Fixierungs-Lösung:

4% Paraformaldehyd, 0,1% Saponin, 2% FCS in PBS

## B.6 Medien

ESC/iPS-Medium:

82% DMEM, 15% FCS, 1% Pen/Strep, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (100x), 0,000007%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1% L-Glutamin (100x), 10 ng/ml LIF

SOB-Medium:

5 g/L Hefe-Extrakt, 0,5 g/L NaCl, 10 ml/L 250 mM KCl-Lösung, (für Platten: 1,5% Agar) autoklavieren und anschließend 5 ml/L sterile 2M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung zugeben

CHO-Medium:

5 mL Glycin aus Stammlösung (50 mg in 20 mL PBS), 300  $\mu\text{L}$  Hypoxanthin aus Stammlösung (27,22 mg in 1,2 mL 1 M NaOH), 200  $\mu\text{L}$  Thymidin aus Stammlösung (9,69 mg in 1,6 mL 1 M NaOH), 10 mL Glutamin (100x), 5 mL P/S  
mit 500 mL ProCHO4 oder 5 auf 500 ml auffüllen

HEK293T-Kultivierungsmedium:

83% DMEM, 15% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glutamin (100x)

HEK293T-Transfektionsmedium:

87% DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Natriumpyruvat, 1% L-Glutamin (100x), 25 mM Chloroquin

## B.7 Software

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Ascent Software for Fluoroskan Ascent	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
BioLogic DuoFlow	Bio-Rad, München
Cell <sup>B</sup>	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
CellQuest	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
ChemSketch 12.0	ACD Labs, USA
Gel Pro-Analyzer 6.0	Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA
iQ5 Optical Systems Software	Bio-Rad, München
MFCS/DA v. 2.1. Eth	Sartorius-BBI-Systems GmbH, Melsungen
Microplate Manager 5.2.1.	Bio-Rad, München
Microsoft Office Excel XP	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop 1000 V3.7.1	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pdfTex 1.40.11	freie Software
SkaniIt	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
TeXnic Center 1.0	freie Software
Vektor NTI	Invitrogen, Carlsbad, USA
WinMDI 2.8	Joseph Trotter, USA

### B.8 Bakterienstämme und Zelllinien

#### B.8.1 Bakterienstämme

Stamm	Bezogen von
E.coli XL1 blue	Agilent Technologies, Böblingen
E.coli BL21 (DE3)	Novagen, Darmstadt

#### B.8.2 Zelllinien

##### Zelllinie CHO<sup>SFS</sup>

Ein speziell für serumfreie Suspensionskultur (SFS) entwickelter Subklon der Zelllinie CHO/dhfr<sup>r</sup> DUKX B11.

Bezogen von: Cell Culture Service, Hamburg

##### Zelllinie HEK293T

Aus primären humanen embryonalen Nierenzellen durch eine Transformation mit Adenoviren vom Typ 5 erhaltene Zelllinie.

Bezogen von: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

##### HUVEC-Primärzellen

Durch Collagenase-Verdau aus einer humanen Nabelschnur isolierte Endothelzellen.

Bezogen von: Stem Cell Technologies, Grenoble, F

##### murine embryonale Stammzelllinie Brachyury (E14.1, 129/Ola)

Die murine ES-Zelllinie E14.1, isoliert aus dem Mausstamm 129/Ola, erlaubt aufgrund eines eGFP-Transgens im brachyury-Lokus das Nachverfolgen der Mesoderm-Induktion im Verlauf der Differenzierung [302].

##### Murine iPS-Zelllinie YM100 (Klon M13)

Die iPS-Zelllinie YM100 wurde generiert aus reprogrammierten murinen OG2- Fibroblasten [297] und enthält ein GFP-Reporterprotein unter der Kontrolle des endogenen Oct-4 Promoters.

Beide Stammzelllinien wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrich Martin (Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie (HTTG), Medizinische Hochschule Hannover).

# C Methoden

## C.1 Zellkulturmethoden

### C.1.1 Kultivierung von CHO-Zellen

Die CHO<sup>SFS</sup>-Zellen werden in Lochplatten oder T-Flaschen statisch kultiviert, bei dynamischen Kultivierungen werden für Schüttelkolben 110 rpm und bei Spinnerflaschen 80 rpm verwendet. Alle diese Kultivierungen werden im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Nach maximal fünf Tagen werden die Zellen subkultiviert bzw. expandiert. Hierfür werden sie bei 180 g für fünf Minuten zentrifugiert und das erhaltene Pellet anschließend in frischem vorgewärmten Medium bei einer Zelldichte von 400.000 Zellen/mL resuspendiert.

#### C.1.1.1 Kultivierung im Bioreaktor

Die Kultivierung erfolgt in einem 2L-Glasreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1500 mL. Für die Prozesssteuerung wird eine Biostat Bplus-Steuereinheit verwendet. Nach der Autoklavierung des Rektors wird dieser über eine Animpfflasche mit 1000 mL Medium befüllt, welches auf 37°C temperiert und mit Luft gesättigt wird um den 100% Kalibrationspunkt für den O<sub>2</sub>-Sensor zu erhalten. Anschließend wird die Luft mit Stickstoff verdrängt um den 0% Kalibrationspunkt zu erhalten. Der Kultivierung wird durchgeführt bei 50% O<sub>2</sub> (entspricht 10,5% Absolutsaauerstoff). Der pH-Wert mittels eines pH-Meters per Feedback-Kontrolle mit 1 M NaOH und 1 M HCl auf 7,2 reguliert und konstant gehalten. Mit  $600 \cdot 10^6$  Zellen (400.000 Zellen/mL) aus Spinnerkultivierungen wird der Reaktor angeimpft und mittels eines Drei-Blatt-Segment-Rührers bei 200 rpm gerührt. Die Probenentnahme erfolgt mit einer Spritze über eine Bakterienfalle.

#### C.1.1.2 Kryokonservierung

Dem jeweiligen Kultivierungsmedium werden 10% DMSO zugesetzt um das Kryomedium zu erhalten. Die Zellen werden gezählt, für fünf Minuten bei 180 g abzentrifugiert und in der gewünschten Konzentration im gekühlten Kryomedium resuspendiert. Nach dem Aliquotieren in Kryoröhrchen werden die Zellen für 24 Stunden in einer Gefrierbox mit 100% Isopropanol

bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff für die Langzeitlagerung überführt.

### C.1.1.3 Revitalisierung

Das Kryoröhrchen wird durch Schwenken im  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad erwärmt bis nur noch Kern gefroren ist. Anschließend wird der Inhalt des Kryoröhrchens in ein 15 mL-Tube überführt und 2 mL auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmtes Medium zugegeben. Nach einer Wartezeit von einer Minute wird unter leichtem Schütteln tropfenweise warmes Medium zugegeben bis 10 mL Gesamtvolumen erreicht sind. Das Tube wird für fünf Minuten bei 180 g zentrifugiert und nach Abnahme des Mediums das Pellet in dem gewünschten Volumen Medium bei einer Zelldichte von 400.000 Zellen/mL resuspendiert.

### C.1.2 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Die Kultivierung erfolgt im Inkubationsschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und maximaler Luftfeuchtigkeit in T-Flaschen oder 6-Loch-Platten mit DMEM mit 15% FCS.

Zum Passagieren wurde nach dem Absaugen des Mediums, mit PBS gewaschen und 1 mL Trypsin/25  $\text{cm}^2$  Flaschenfläche zugegeben. Nach 3 Minuten Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde die Flasche geschüttelt, unter dem Mikroskop kontrolliert ob sich alle Zellen abgelöst haben und ein Volumen Kultivierungsmedium zugegeben. Nun können die Zellen gezählt, bei 400g für 3 Minuten abzentrifugiert und mit einer Dichte von 80.000 Zellen/ $\text{cm}^2$  in frischem Medium neu ausgesät werden.

Die Kryokonservierung und Revitalisierung erfolgen mit der hier angegebenen Aussaatdichte und Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit wie bei den CHO-Zellen.

### C.1.3 Kultivierung von mES- und miPS-Zellen

Die Kultivierung der mES- und iPS-Zellen erfolgt in DMEM-Medium (mit den entsprechenden Zusätzen) in Petrischalen bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und maximaler Luftfeuchtigkeit. Spätestens nach vier Tagen werden die Zellen subkultiviert oder expandiert. Dabei müssen die Zellsphären mittels Trypsin getrennt werden. Hierfür wird die Zellsuspension abgenommen und folgendermaßen behandelt:

- Für drei Minuten bei 140 g zentrifugieren.
- Pellet in PBS resuspendieren.
- Für drei Minuten bei 140 g zentrifugieren.
- Pellet in 500  $\mu\text{L}$  Trypsin resuspendieren.
- Tube eine Minute im  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad schütteln.

- 500  $\mu$ L FCS zugeben.
- Zellen durch auf- und abpipettieren vereinzeln.
- Zellzahl bestimmen.
- Für drei Minuten bei 140 g zentrifugieren.
- In entsprechendem Volumen Medium resuspendieren. Die Aussaat erfolgt bei den ESCs mit einer Dichte von 20.000 Zellen/mL und bei den iPSCs mit 40.000 Zellen/mL.

### C.1.4 Kultivierung von HUVE-Zellen

Die Kultivierung erfolgt im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit in T-Flaschen oder Loch-Platten mit Endothelzellmedium aus dem Endothelial Cell Growth Medium 2 Kit (PromoCell, Heidelberg).

Zum Passagieren wurde nach dem Absaugen des Mediums, mit PBS gewaschen und 1 mL Accutase/25 cm<sup>2</sup> Flaschenfläche zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Flasche geschüttelt, unter dem Mikroskop kontrolliert ob sich alle Zellen abgelöst haben und ein Volumen PBS + 10% FCS zugegeben. Nun können die Zellen gezählt, bei 200g für 5 Minuten abzentrifugiert und mit einer Dichte von 4.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in frischem Medium neu ausgesät werden.

Die Kryokonservierung und Revitalisierung erfolgen mit der hier angegebenen Aussaatdichte und Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit wie bei den CHO-Zellen.

### C.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die manuelle Bestimmung der Zellzahl und Vitalität erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer am Mikroskop. Die entsprechende Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen 5% Trypanblau-Lösung (bzw. 0,5% für ES- und iPS-Zellen) vermischt und für 60 s inkubiert. Der blaue Farbstoff konnte in die toten Zellen ohne Zellmembran hinein diffundieren, wodurch sie anschließend unter dem Mikroskop optisch unterscheidbar wurden. Die toten und lebenden Zellen in den Großquadranten der Zellkammer wurden separat ausgezählt und anschließend mit dem Faktor 5000 multipliziert um die Zellzahl pro mL zu erhalten. Die Vitalität ist anschließend berechenbar als Quotient aus Lebend- und Gesamtzellzahl.

Für die automatische Zellzahlbestimmung wurde der TC-10 Automated Cell Counter von Bio-Rad verwendet. Die Probenvorbereitung war äquivalent zu jener bei der manuellen Bestimmung. Er wurde ausschließlich für CHO-Zellen eingesetzt.

### C.1.6 MTT-Test

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ein Tetrazoliumsalz, welches in lebenden Zellen zu violetter Formazan reduziert wird [303]. Eine Solubilisierungslösung (hier SDS-Lösung) wird anschließend zugegeben um das unlösliche Formazan aufzulösen und eine violette Lösung zu erzeugen, dessen Absorption proportional zur Zellviabilität ist.

**Durchführung** Der Assay wird durchgeführt in 96-Loch-Platten in welchen die Zellen in der gewünschten Dichte (hier zwischen 500 und 2000) ausgesät und für die benötigte Dauer kultiviert werden. Dann wird das Medium aus den Kavitäten der 96-Loch-Platte vorsichtig abgesaugt und jeweils 110 µL DMEM-Medium inkl. 10% MTT-Lösung zugegeben. Zusätzlich wird in leeren Kavitäten vierfach eine Nullwertmessung angesetzt. Nach vier Stunden Inkubation bei 37°C werden jeweils 100 µL SDS-Lösung zugegeben und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgt abschließend bei 570 nm gegen 630 nm als duale Endpunktmessung im Plattenleser.

### C.1.7 BrdU-Inkorporationsassay

Bei BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) handelt es sich um ein synthetisches Analogon von Thymidin. In proliferierenden Zellen muss die DNA repliziert werden bevor Teilung stattfinden kann. Wenn BrdU in der Kultur vorliegt wird dieses an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut und kann mittels spezifischer monoklonaler anti-BrdU-Antikörper in einem ELISA-Prozess quantifiziert werden [304].

**Durchführung** Der Assay wird durchgeführt in 96-Loch-Platten in welchen die Zellen in der gewünschten Dichte (hier zwischen 500 und 2000) ausgesät und für die benötigte Dauer kultiviert werden. Am Tag der Durchführung wird die *BrdU labeling solution* so mit Medium verdünnt, dass eine Endkonzentration von 10 µM BrdU vorliegt. Nach der Zugabe wurden die Zellen für drei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wird das Medium abgesaugt und in jede Kavität 200 µL *FixDenat solution* gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die *FixDenat solution* gründlich aber vorsichtig geleert und je 100 µL *anti-BrdU-POD working solution* zugegeben. Nach 90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde auch diese Lösung gründlich aber vorsichtig geleert und jede Kavität dreifach mit je 200 µL *washing solution* gewaschen. Abschließend wurde jeweils 100 µL *substrate solution* zugegeben und die auftretende Farbentwicklung nach 20 Minuten durch Zugabe von je 25 µL 1M Schwefelsäure gestoppt. Die Messung erfolgte am Spektrophotometer bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm.

### C.1.8 Ez4U-Proliferationsassay

Dieser Test basiert auf dem XTT-Assay. XTT (Natrium-3,3'-(1-phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium-bis-(4-methoxy-6-nitro)benzensulfonsäure) wandelt sich in Anwesenheit des Elektronenüberträgers PMS (N-Methyl-dibenzopyrazinmethylsulfat) in ein orangefarbenes lösliches Formazan um. Im Gegensatz zum MTT-Test ist hier also kein eigener Schritt zum Lösen des Formazans nötig [15].

**Durchführung** Der Assay wird durchgeführt in 96-Loch-Platten in welchen die Zellen in der gewünschten Dichte (hier zwischen 500 und 2000) ausgesät und für die benötigte Dauer kultiviert werden. Das Ez4U-Substrat wird in der Aktivatorlösung gelöst, auf 37°C erwärmt und in jede Kavität werden 10% des Volumens gegeben. Nach zwei- bis fünfständiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wird die Absorption bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm am Spektrophotometer ausgemessen.

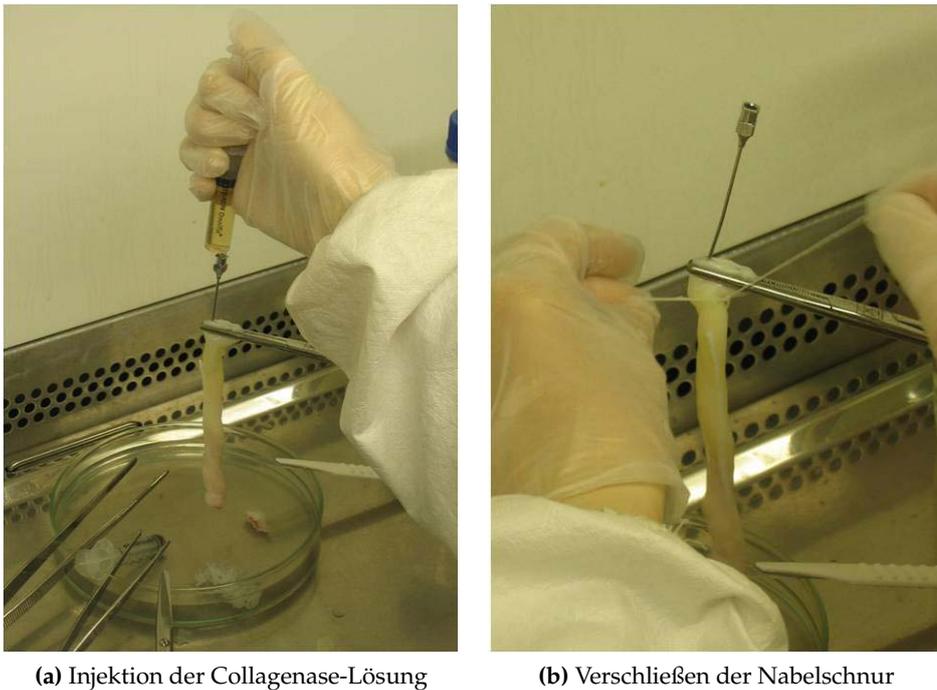
### C.1.9 Cell Titer Blue-Assay

Der für diesen Assay verwendete Farbstoff ist das blaue nicht-fluoreszierende Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide). Er wird in Mitochondrien reduziert zum pinken stark fluoreszierenden Resorufin. Der Grad der Fluoreszenz ist also ein Maß für die metabolische Aktivität lebender Zellen.

**Durchführung** Der Assay wird durchgeführt in 96-Loch-Platten in welchen die Zellen in der gewünschten Dichte (hier zwischen 500 und 2000) ausgesät werden. Nach der entsprechenden Kultivierungsdauer wird in jede Kavität auf 10% Gesamtvolumen Cell Titer Blue-Reagenz gegeben und für 3 oder 4 Stunden bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nun kann die Fluoreszenz bei 560 (Anregung) und 590 nm (Emission) bestimmt werden.

### C.1.10 Primärzellisolation von Nabelschnurendothelzellen

Die Nabelschnur wird in Cordpuffer gelagert und die Enden mit einem geraden Schnitt entfernt. Zunächst wird die Vene mit einer runden Kanüle versehen und mittels einer Spritze mehrfach mit Cordpuffer gespült. Das untere Ende wird verschlossen und mittels einer Spritze wird die Nabelschnur mit der entsprechenden Collagenase-Lösung gefüllt. Nach dem Verschließen der Nabelschnur wird diese für 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei wird durch die Collagenase die intrazelluläre Matrix abgebaut. Die Collagenase-Lösung wird in einen 50 mL-Tube überführt und die Schnur mit 20 mL Cordpuffer gespült, welcher ebenfalls in das 50 mL-Tube überführt wird. Die Zellsuspension wird für fünf Minuten bei 500 g abzentrifugiert, das Pellet in 3 mL Medium resuspendiert und in eine 25er T-Flasche überführt. Am darauffolgenden



**Abbildung C.1:** Fotos von der Primärzellisolation aus einer Nabelschnur.

Tag wird kontrolliert ob die Zellen angewachsen sind und falls dies der Fall ist, das Medium gewechselt.

### C.1.11 Lipofektion mit dem FuGene6-Kit

Die theoretischen Grundlagen der Lipofektion werden in Kapitel 2.1.1.2 erörtert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 300.000/mL in je 2 mL Medium in 6-Loch-Platten ausgesät. Es werden drei Transfektionsansätze angefertigt mit Reagenz:DNA-Verhältnissen von 6:1, 3:1 und 3:2, sowie drei Kontrollansätze die nur Reagenz enthalten. Zunächst wird das Transfektionsreagenz mit ProCHO5-Medium verdünnt, dazu werden zweimal je 97  $\mu\text{L}$  (3:1), 98,5  $\mu\text{L}$  (3:2) und 94  $\mu\text{L}$  (6:1) Medium vorgelgt. Das Transfektionsreagenz wird nun direkt in das Medium pipettiert, 1,5  $\mu\text{L}$  in die ersten, 3  $\mu\text{L}$  in die zweiten und 6  $\mu\text{L}$  in die dritten Ansätze. Nach kurzem Vortexen werden die Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In jeweils einen der drei Doppelansätze wird nun je 1  $\mu\text{g}$  DNA gegeben. Nach kurzen Mischen wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wird nun tropfenweise zu den Zellkulturen gegeben, welche dabei leicht geschüttelt werden um gleichmäßige Verteilung sicherzustellen. Spätestens nach zwei Tagen sollte das Medium durch frisches ersetzt werden.

### C.1.12 Lipofektion mit dem TurboFect-Transfektionsreagenz

Es werden 500.000 Zellen pro Kavität einer 24-Loch-Platte in 1 mL Medium vorgelegt. Die benötigte Menge DNA wird in je 100  $\mu$ L ProCHO-Medium gegeben und dann werden 2  $\mu$ L Transfektionsreagenz zugegeben. Das Gemisch wird für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wird nun tropfenweise zu den Zellkulturen gegeben, welche dabei leicht geschüttelt werden um gleichmäßige Verteilung sicherzustellen. Spätestens nach zwei Tagen sollte das Medium durch frisches ersetzt werden.

### C.1.13 Calciumphosphatpräzipitation von CHO-Zellen

#### C.1.13.1 Protokoll I, adaptiert nach AG Schambach

Es werden 1,4  $\mu$ g Plasmid mit Wasser auf 114  $\mu$ L aufgefüllt und 16  $\mu$ L 2,5M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugeben. Separat werden 130  $\mu$ L 2xHBS vorgelegt und die DNA/ $\text{CaCl}_2$ -Mischung zur 2xHBS-Lösung tropfenweise zugeben. Dabei muss die 2xHBS-Lösung mit Luft durchströmt werden, so dass ein konstanter Strom separater Blasen entsteht. Die Lösung wird anschließend 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 800  $\mu$ L altes Medium vorsichtig abgenommen und 800  $\mu$ L neues Medium zugegeben. Nachfolgend wird die DNA/ $\text{CaCl}_2$ -Mischung zu den Zellen in der gewünschten Menge zugegeben. Nach einer Inkubation von 12 Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  wird das Medium entsprechend dem Standardprotokoll gewechselt.

#### C.1.13.2 Protokoll II, adaptiert nach AG Flemington

Sechs Stunden vor der Transfektion wird das Medium gewechselt.

Es werden 18  $\mu$ L 2x HBS-Lösung vorgelegt und die Plasmid-/Carrier-DNA-Mischung und 1,1  $\mu$ g 2,5M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Mischung tropfenweise auf die Zellen geben und vorsichtig gemischt. Nach 18 Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  wird das Medium gewechselt.

### C.1.14 Calciumphosphatpräzipitation von HEK293T-Zellen

Die Zellen werden einen Tag vor der Durchführung in T25-Flaschen in 1 mL Medium ausgesät. Für die Transfektionsmischung wurden 1,6  $\mu$ g Plasmid mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 140  $\mu$ L aufgefüllt und 18  $\mu$ L 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugegeben. Anschließend wurden 158  $\mu$ g 2xHBS-Lösung in einem 15 mL Tube vorgelegt und die DNA/ $\text{CaCl}_2$ -Mischung zur 2xHBS-Lösung tropfenweise zugeben. Dabei muss die 2xHBS-Lösung mit Luft durchströmt werden, so dass ein konstanter Strom separater Blasen entsteht. Die Lösung wird anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird das alte Medium abgesaugt und 1 mL Transfektionsmedium zugegeben. Nachfolgend wird die DNA/ $\text{CaCl}_2$ -Mischung zu den Zellen in der gewünschten Menge zugegeben.

Nach einer Inkubation von 12 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wird das Medium entsprechend dem Standardprotokoll gewechselt.

### C.1.15 Einzelzellklonierung per Verdünnungsmethode

Dieses Verfahren basiert auf einer in [305] entwickelten Methode.

Die eigentlichen Ansätze werden mit einer Zelle pro 3 Kavitäten angefertigt um sicher zu sein, dass nicht mehrere Zellen pro Ansatz vorliegen. Zusätzlich werden als Kontrolle noch jeweils eine Platte mit 10 Zellen und eine mit 1 Zelle pro Kavität angefertigt.

**Vorbereitung der 96-Loch-Platten** In alle Kavitäten der 96-Loch-Platten, welche am Rand liegen werden 200 µL PBS gegeben, da hier verstärkt Verdunstung auftritt können sie nicht genutzt werden. In alle anderen Kavitäten wird jeweils 100 µL konditioniertes Medium (Medium in dem ein Tag lang kultiviert wurde, steril filtriert) mit 200 µg/mL Zeocin vorgelegt.

#### Durchführung der Verdünnung

- Die Ausgangskonzentration betrug  $2,4 \cdot 10^5$  Zellen/mL.
- 2,4 mL der Ausgangslösung werden zu 7,6 mL frischem Medium gegeben um eine Konzentration von 10.000 Zellen/mL zu erhalten.
- 110 µL mit 10.000 Zellen/mL werden zu 9,89 mL frischem Medium und 22 µL Zeocin gegeben um eine Konzentration von 100 Zellen/mL zu erhalten.
- In eine 96-well-Platte werden in jede Kavität 100 µL der 100 Zellen/mL-Suspension gegeben um eine Konzentration von 10 Zellen/Kavität zu erhalten.
- 1,8 mL mit 100 Zellen/mL werden zu 16,2 mL frischem Medium und 32 µL Zeocin gegeben um eine Konzentration von 10 Zellen/mL zu erhalten.
- In eine 96-well-Platte werden in jede Kavität 100 µL der 10 Zellen/mL-Suspension gegeben um eine Konzentration von 1 Zelle/Kavität zu erhalten.
- 11 mL mit 10 Zellen/mL werden zu 22 mL frischem Medium und 44 µL Zeocin gegeben um eine Konzentration von 3,33 Zellen/mL zu erhalten.
- In fünf 96-well-Platten werden in jede Kavität 100 µL der 3,33 Zellen/mL-Suspension gegeben um eine Konzentration von 1 Zelle/3 Kavitäten zu erhalten.

### C.1.16 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die Zellsuspension wird für vier Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird mit PBS gewaschen und anschließend im gewünschten Puffer resuspendiert, dem auf 1/1000

Volumen Triton X zugegeben wurde. Die Sonifizierung wird unter Eiskühlung für acht mal 30 Sekunden mit je 30 Sekunden Pause mit den folgenden Einstellungen durchgeführt: Cycle: 0,5, Amplitude: 100%. Der erhaltene Aufschluss wird für fünfzehn Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und durch einen 0,2 µm-Filter filtriert. Das Pellet wird verworfen.

### C.2 Proteinbiochemische Methoden

#### C.2.1 TCA-Fällung

Die zu fällende Probe wird mit 100% Trichloressigsäure (TCA) auf eine TCA-Endvolumen von 10% gebracht und anschließend für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Das gefällte Protein wird für mindestens fünfzehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und nach dem Verwerfen des Überstandes in 20 µl 1,5M Tris-Puffer resuspendiert.

#### C.2.2 Bradford-Assay

Mit dem Bradford-Assay [306] lassen sich Proteinkonzentrationen im µg/mL Bereich photometrisch bestimmen. Der verwendete Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue hat ungebunden ein Absorptionsmaximum von 470 nm. In saurer Lösung bildet er mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe wodurch sich sein Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt [307]. Die Zunahme dieser Absorption ist ein Maß für die Proteinkonzentration der entsprechenden Lösung.

Durchgeführt wird der Assay in 96-Loch-Platten-Format mit BSA als Referenzprotein im Konzentrationsbereich von 0 bis 2000 µg/mL. Es werden in Drei- oder Vierfachbestimmung jeweils 10 µL der Test- bzw. Referenzlösungen vorgelegt und 300 µL Bradford-Reagenz zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation werden die Platten vorsichtig 30 Sekunden geschüttelt und anschließend im Spektralphotometer bei 595 nm mit der Software SkanIt ausgemessen.

#### C.2.3 BCA-Assay

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA, nach engl. *bicinchoninic acid* [308]) beruht auf der Biuret-Reaktion, bei welcher Proteine mit zweiwertigen Kupferionen Komplexe bilden. Die Peptidbindungen der Proteine reduzieren dies anschließend zu  $\text{Cu}^+$ . Der  $\text{Cu}^+$ -Gehalt der Lösung ist also proportional zur Proteinkonzentration. Durch Komplexierung des einwertigen Kupfers durch die Bicinchoninsäure kommt es zur Bildung eines pinkfarbenen Komplexes mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm.

**Durchführung** Durchgeführt wird der Assay in 96-Loch-Platten-Format mit BSA als Referenzprotein im Konzentrationsbereich von 0 bis 2000 µg/mL. Es werden in Vierfachbestimmung jeweils 25 µL der Test- bzw. Referenzlösungen vorgelegt und 200 µL Reagenz zugegeben, welches zuvor frisch aus den Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 angesetzt worden ist. Nach gründlichem Mischen werden die Platten für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm bestimmt.

### C.2.4 Densitometrie

In imidazolhaltigen Lösungen kann der Proteingehalt nicht über eine UV-Messung bei 280 nm oder eine der klassischen Quantifizierungsmethoden erfolgen. Hier wird die Densitometrie angewandt, da im SDS-PAGE-Gel die Proteine von der störenden Lösung befreit vorliegen. Neben den zu quantifizierenden Proben wird hierbei eine BSA-Standardreihe mit Konzentrationen zwischen 100 und 500 µg/mL aufgetragen. Das Coomassie-gefärbte-Gel wird digitalisiert und mittels der Software Gel Pro-Analyzer 6.0 wird die Intensität der Banden bestimmt und eine Quantifizierung durch Vergleich mit der Kalibrationsreihe ermöglicht.

### C.2.5 SDS-PAGE

Das *sodium dodecyl sulfate* (SDS,  $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ ) assoziiert mit den Polypeptidketten von Proteinen, wodurch es zu negativer Aufladung durch die Sulfat-Gruppen kommt. Dies hat zur Folge, dass die ursprüngliche Ladung des Proteins maskiert wird und sich ein relativ konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse ergibt. Zusätzlich werden durch SDS,  $\beta$ -Mercaptoethanol und Erhitzung auf 95°C Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur, sowie Disulfid- und wasserstoffbrückenbindungen gebrochen so dass alle Proteine in einer ellipsoiden Form vorliegen. Die Polypeptidketten zeigen daher ein einheitliches Wanderungsverhalten im elektrischen Feld, so dass sie bei der Gelelektrophorese gemäß ihrer Molmasse aufgetrennt werden. Polyacrylamid bildet inerte und besonders stabile Gele aus. Die Polymerisation des Acrylamids ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) erfolgt als Copolymerisation mit dem Vernetzer Bisacrylamid ( $(\text{CH}_2(\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2)_2$ ). Als Polymerisationsstarter dient APS (Ammoniumperoxodisulfat, kurz Ammoniumpersulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) mit TEMED ( $(\text{H}_3\text{C})_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) als Katalysator. Die Polymerisation erfolgt unter Luftausschluss, da Sauerstoff zum Kettenabbruch führen würde. Um schärfere Banden zu erhalten werden meist diskontinuierliche Elektrophoresen durchgeführt, wobei über das engporige Trenngel ein weitporiges Sammelgel gegossen wird. Die Gele können entweder direkt entwickelt oder anschließend geblottet werden.

**Durchführung** Es werden 12%ige oder 15%ige Trenngele und 6%ige Sammelgele verwendet. Zuerst wird das Trenngel gegossen und zum Polymerisieren mit Wasser überschichtet, welches anschließend wieder entfernt wird. Vor dem Auftragen werden die Proben, versetzt mit Probenauftragspuffer (2x Laemmli) für 5 min bei 95 °C denaturiert. Beim Sammelgel wird eine Spannung von 80 V, beim Trenngel eine von 160 V angelegt und das Gel laufen gelassen bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht.

#### C.2.5.1 Silberfärbung

Zum Färben mit Silber werden die Gele zunächst für 30 Minuten in einer Fixierlösung inkubiert welche Eisessig und Ethanol enthält und durch welche die Proteine ausfallen und nicht weiter innerhalb des Geles wandern bzw. diffundieren können. Nach Waschen mit Wasser wird das

Gel für 180 Sekunden in Reduzierlösung inkubiert und anschließend abermals mit Wasser gewaschen. Aus der dann für 30 Minuten zugegebenen Silbernitratlösung lagern sich  $\text{Ag}^+$ -Ionen an die Proteine an. Diese werden abschließend durch die Zugabe von alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode ist mit 0,1 bis 1 ng pro Bande deutlich geringer als bei der Coomassiefärbung.

### C.2.5.2 Coomassie-Färbung

Zum Färben mit Coomasie werden die Gele zunächst für 60 min in der Coomassie-Lösung inkubiert, welches sich an die basischen Seitenketten der Proteine anlagert und diese damit unspezifisch färbt. Anschließend wird ins Gel eingelagerte Farbstoff durch Waschen mit einer Entfärberlösung entfernt. Dieser Vorgang wird wiederholt bis sich das gewünschte Banden zu Hintergrund-Verhältnis eingestellt hat.

### C.2.6 Western Blot

Beim Western Blotting werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf einer geeigneten Trägermembran (hier eine PVDF-Membran) immobilisiert um anschließend immunologisch nachweisbar zu sein [309][310]. Dabei wird ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, welcher durch Katalysierung einer Farbstoffbildungsreaktion die Detektion ermöglicht.

**Durchführung** Die PVDF-Membran wird zunächst mit 96% Ethonal gewaschen und anschließend zusammen mit dem SDS-Gel, den Filter- und den Filzpapieren in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Ethanol, pH=8,3) äquilibriert. Die Blotkammer wird mit Transferpuffer gefüllt.

Der Proteintransfer wird bei  $2\text{mA}/\text{cm}^2$  Gelfläche für 60 min unter Eiskühlung durchgeführt. Die Entwicklung der Membran erfolgt anschließend folgendermaßen:

- 5 min in  $\text{dH}_2\text{O}$  waschen.
- 1 h in Blockpuffer (TBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7,4) mit 2% BSA und 0,5% Tween 20) inkubieren.
- 2 h mit der primären Antikörperlösung inkubieren.
- 3 mal 5 min waschen mit Blockpuffer.
- 1 h in der sekundären Antikörperlösung (goat-anti-mouseIgG-(H+L)-alkaline-phosphatase-conjugate) 1:3000 in TBS mit 0,5% Tween 20) inkubieren.
- 3 mal 5 min waschen mit TBST.
- 2 mal 10 min waschen mit TBS.

- 5 min waschen mit AP Puffer (aus AP Conjugate Substrate Kit von BioRad).

Die Bandenentwicklung wird ausgelöst durch Zugabe der Farbreaktionslösung (25 mL AP Puffer und je 250 µL Farbreagenz A und B (fertige Lösungen aus B-CIP und NBT aus dem AP Conjugate Substrate Kit von BioRad). Wenn die benötigte Bandenintensität erreicht ist wird die Färbung mit dH<sub>2</sub>O gestoppt und die Membran an der Luft getrocknet.

### C.2.7 Vorbereitung der Zellkulturüberstände für die FPLC

Die Überstände werden für 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert und die Pellets verworfen. Die dabei erhaltenen Überstände werden steril filtriert durch einen 0,2 µm-Filter. Mittels einer Vivaflow 50-Membran mit einer der Proteingröße angepassten Ausschlussgrenze werden die Überstände auf das benötigte Volumen aufkonzentriert. Wenn das benötigte Volumen unterhalb des Totvolumens der Vivaflow 50-Einheit von 14 mL liegt, wird zum weiteren Konzentrieren ein Vivaspin 20-Zentrifugalkonzentrator eingesetzt. Je nach weiterem Vorgehen wird anschließend der pH-Wert der erhaltenen Lösung auf den des Bindungspuffers eingestellt oder sie wird mit dem entsprechenden Bindungspuffer verdünnt.

### C.3 Mikrobiologische Methoden

#### C.3.1 Bakterientransformation

Es wurden *E.coli* XL1 blue verwendet und nach dem folgenden Protokoll transformiert:

- 20 ng Vektor mit 150  $\mu$ L kompetenten Zellen mischen.
- 15 min auf Eis inkubieren.
- 2 min Hitzeschock: 2 min bei 42°C unter Schütteln (300 rpm) inkubieren.
- 2 min auf Eis inkubieren.
- 900  $\mu$ L SOC-Medium zugeben.
- 60 min bei 37°C unter Schütteln (300 rpm) inkubieren.
- 3 min bei 3000 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen.
- Pellet in SOB-Medium resuspendieren.
- Auf SOB-Platten mit Ampecilin ausplattieren.
- Bei 37°C über Nacht wachsen lassen.

Neben den transformierten Bakterien werden als Negativkontrolle auch untransformierte ausplattiert. Wenn die entsprechenden Platten leer bleiben, kann man die angewachsenen transformierten Bakterien zum Animpfen einer Flüssigkultur verwenden.

#### C.3.2 Kultivierung von *E.coli* zur Vektoramplifikation

Die auf den Ampecilin-versetzten Platten gewachsenen Kolonien werden verwendet um 100 mL-Schüttelkolbenkulturen anzusetzen. Hierfür werden SOB-Medium und Doppelschikanekolben verwendet und es wird für 18 Stunden bei 130 rpm und 37°C kultiviert. Aus den durch Zentrifugation geernteten Bakterien werden anschließend die Plasmide aufgereinigt (siehe Abschnitt C.5.5).

#### C.3.3 Kultivierung und Aufschluss von *E.coli* zur Expression des **trx-his-tev-hLIF-Fusionsproteins**

Mit den Kryokulturen werden 20 mL-Schüttelkolben-Vorkulturen in LB-Medium mit Ampecilin angesetzt, welche über Nacht bei 37°C und 130 rpm in Schikanekolben kultiviert werden. Die 100 mL-Hauptkultur wird mit 2 mL Vorkultur angeimpft und unter Vorkulturbedingungen kultiviert bis eine OD von 0,8 erreicht ist. Dann wird die Expression durch zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und die Kultivierungsbedingungen auf 23°C und 150 rpm geändert. Acht

Stunden nach der Induktion (bei einer OD zwischen 2,0 und 2,5) werden die Kulturen durch zentrifugation (4000 g) geerntet. Die Pellets werden bei -20°C gelagert.

Vor dem Aufschluss werden die Pellets auf eine OD von 10 in Bindungspuffer resuspendiert. In Aliquots von maximal 10 mL werden diese nun per Ultraschall (Pulsdauer 1s, 100 W, 3x 60 sec, je 60 sec Pause, Eiskühlung) aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren (max. rpm, 15 min, 4°C) werden die Lysate durch einen 0,2 µm-Filter filtriert und können nun auf die FPLC aufgetragen werden.

### C.4 Durchflusszytometrische Methoden

Mit einem Durchflusszytometer können gleichzeitig die Streulicht- und verschiedene Fluoreszenzeigenschaften von Zellen bestimmt werden. Die Streulichtmessungen lassen dabei Rückschlüsse auf Zelleigenschaften wie Größe und Granularität zu, während die Fluoreszenzkanäle für die Färbung der Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern verwendet werden können. Durch die Kombination mit einem Zellsortierer (FACS) können so auch gezielt bestimmte Subpopulationen der Zellkulturen isoliert werden.

#### C.4.1 Sortierung per FACS

Es wird das FACS Vantage SE mit der CellQuest Software von Becton Dickinson verwendet.

##### C.4.1.1 Sortierung CD31-positiver Zellen

Zum Einstellen des Gerätes und der Gates wird eine Probe von (i.d.R.) 10.000 Zellen vermessen, welche noch nicht sortiert werden, aber ebenso wie die zu sortierenden Zellen mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert wurden.

Das erste Gate wird im *Front Scatter* (FS) gegen *Side Scatter* (SS)-Modus gesetzt, hier werden alle Partikel welche zu klein sind um Zellen zu sein (also sowohl kleine FS- als auch SS-Werte aufweisen) ausgeschlossen. Mit dem zweiten Gate sollen Aggregate ausgeschlossen werden. Bei einer Auftragung der Fläche gegen die Peakhöhe der FS- oder SS-Werte wird ein Positivgate entlang der Winkelhalbierenden gesetzt. Um tote Zellen auszuschließen wird der jeweiligen Kultur PI zugesetzt und die PI-positive Subpopulation im FL3-Kanal per Gate ausgeschlossen. Zudem wird das Gerät im Counter-Modus betrieben. (Dies bedeutet, dass wenn zwei aufeinanderfolgende Events in ihren Fluoreszenzeigenschaften stark voneinander abweichen werden sie beide ausgeschlossen.) Die Zellen werden in PBS mit 2% FCS (zum Blocken) resuspendiert und mit 1 µg anti-CD31-FITC-Antikörper (pro 10<sup>6</sup> Zellen) versetzt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert (die geringe Temperatur soll die Ausbildung unspezifischer Bindungen vermindern). Anschließend werden die 20% der Zellen isoliert, deren Fluoreszenz im FL1-Kanal am höchsten ist.

##### C.4.1.2 Sortierung anhand der GFP-Fluoreszenzintensität

Die Einstellungen des Gerätes bezüglich des Ausschlusses der toten Zellen, Partikel und Aggregate entsprechen dem Protokoll für die CD31-Sortierung. Es werden die 10% bzw. 30% Zellen sortiert, deren Fluoreszenz im FL1-Kanal am höchsten ist.

### C.4.2 Einzelzellklonierung per FACS

Die Grundeinstellungen um Partikel, Aggregate und tote Zellen auszuschließen entsprechen denen der Sortierung per FACS.

In alle Kavitäten der 96-Loch-Platten, welche am Rand liegen werden 200 µL PBS gegeben, da hier verstärkt Verdunstung auftritt können sie nicht genutzt werden. In alle anderen Kavitäten (die 60 Inneren) wird jeweils 100 µL konditioniertes Medium (Medium in dem ein Tag lang kultiviert wurde, steril filtriert) mit 200 µg/mL Zeocin vorgelegt. In jede dieser wird per FACS eine einzelne Zelle abgelegt.

### C.4.3 Intrazelluläre Färbung des Zielproteins

Es werden jeweils  $1 \cdot 10^6$  Zellen abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wird in 500 µL Fixierlösung (4% Paraformaldehyd, 0,1% Saponin in 2% FCS) resuspendiert und die Zellsuspension nach dem folgenden Protokoll behandelt, bevor die Probe am Durchflusszytometer vermessen wird:

- 30 min bei 4°C inkubieren.
- Zweimal mit 0,1% Saponin in 2% FCS waschen.
- Zellzahl einstellen auf  $1 \cdot 10^5$  pro 100 µL Aliquot.
- Zu einem Aliquot 20 µL der primären AK-Lösung geben.
- 30 min bei 4°C inkubieren.
- Zweimal mit Saponin waschen.
- Pellet in 100 µL der sekundären AK-Lösung resuspendieren.
- 30 min bei 4°C inkubieren.
- Zweimal mit Saponin waschen.
- Pellet in 500 µL Saponin resuspendieren.
- Probe am Durchflusszytometer messen.

Als Negativkontrolle werden untransfizierte CHO<sup>SFS</sup>-Zellen nach dem selben Protokoll gefärbt. Bei der Auswertung werden diejenigen Zellen als positiv gewertet, deren Fluoreszenzsignal höher war als das von 99% der Zellen der Negativkontrolle.

### C.4.4 Messung der Expressionsstärke des Endothelzellmarkers CD31

Das Medium wird von den Zellen abgesaugt und diese mit PBS gewaschen. Anschließend wird vorgewärmte Accutase-Lösung auf die Zellen gegeben und diese drei bis fünf Minuten bei 37°C

inkubiert. Zum Ablösen der Accutase wird das doppelte Volumen an PBS mit 10% FCS zugegeben. Die erhaltene Zellsuspension wird für drei Minuten bei 400 g zentrifugiert und das Pellet in einem definierten Volumen PBS aufgenommen. Nach der Zellzahlbestimmung werden 100.000 Zellen pro Ansatz abgenommen, abzentrifugiert und in 100 µL PBS + 2% FCS resuspendiert. Hierzu werden 20 µL der Antikörperlösung (1,3 µL (= 0,1 µg) anti-CD31-FITC auf 20 µL bzw. 2,0 µL (= 0,1 µg) Isotypenkontrollantikörper (BD 555748) auf 20 µL) gegeben und anschließend für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von 400 µL PBS + 2% FCS kann die Probe am Durchflusszytometer vermessen werden.

### C.4.5 Messung der Expressionsstärke des Pluripotenzmarkers SSEA-1

SSEA-1 (*stage specific embryonic antigen 1*, auch CD15) ist ein Kohlenhydratadhäsionsmolekül, welches Phagozytose und Chemotaxie vermittelt. Es ist ein Markerprotein für murine pluripotente Stammzellen, bei welchen es wichtige Funktionen bezüglich der Adhäsion und Migration der Zellen innehat.

**Durchführung** Es werden pro Ansatz 10.000 Zellen verwendet, welche in 100 µL Blockpuffer resuspendiert und mit 20 µL Antikörperlösung (10 µL PE-mouse-anti-SSEA-1 + 10 µL Blockpuffer, bzw. 3 µL isotypenkontrollantikörper + 17 µL Blockpuffer) versetzt werden. Nach 20 min Inkubation (im Dunklen) werden 400 µL Blockpuffer und 1 µL Propidiumiodidlösung zugegeben und die Proben sofort im Durchflusszytometer vermessen.

### C.4.6 Apoptoseassay

Für die Apoptosebestimmung wird FITC-markiertes Annexin-V kombiniert mit PI verwendet. Annexin-V bindet Zellen welche auf ihrer Oberfläche Phosphatidylserin exprimieren, welches ein Marker für frühe Apoptose ist [311] [312]. PI wird jedoch nur von den Zellen aufgenommen, welche nekrotisch oder spätapoptotisch, also in der Durchflusszytometeranalyse doppelt positiv und somit von den nur FITC-positiven frühapoptotischen Zellen zu unterscheiden sind.

Es wird der Annexin-V FITC-Kit von Invitrogen verwendet.  $2 \cdot 10^5$  Zellen/Messansatz werden abgenommen mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µL Annexin-V Bindungspuffer resuspendiert. Es werden 5 µL Annexin-V-FITC- und 10 µL PI-Lösung zu jedem Ansatz gegeben und für 15 Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend werden die Ansätze mit je 400 µL Bindungspuffer aufgefüllt und am durchflusszytometer vermessen.

## C.5 Molekularbiologische Methoden

### C.5.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung und Reinigung von RNA wird der RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen verwendet. In der Regel werden  $10^6$  CHO-Zellen für die Isolierung eingesetzt. Diese werden pelletiert und in 350  $\mu\text{L}$  RLTplus Puffer durch gründliches Vortexen lysiert. Das Lysat wird homogenisiert durch Zentrifugation durch eine *QIAshredder spin column* (2 min bei maximaler Geschwindigkeit). Das homogenisierte Lysat wird anschließend in eine *gDNA Eliminator spin column* gegeben und für 30 sec bei 10.000 g zentrifugiert. Nach der Zugabe von einem Volumen 70% Ethanol zum Durchfluss wird das Gemisch in eine *RNeasy spin column* gegeben, für 15 sec bei 10.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die Membran zu waschen werden zunächst 700  $\mu\text{L}$  RW1 Puffer und dann zweimal 500  $\mu\text{L}$  RPE Puffer für 15 sec (zweites Mal RPE Puffer: 2 min) bei 10.000 g hindurch zentrifugiert. Abschließend werden 50  $\mu\text{L}$  RNase-freies Wasser zum Eluieren auf die Membran gegeben, für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Vorgang mit dem Durchfluss noch einmal wiederholt. Die Quantifizierung erfolgt mit dem NanoDrop Spektrometer.

### C.5.2 cDNA-Synthese für die PCR

18  $\mu\text{L}$  RNA-Lösung (mit maximal 20  $\mu\text{g}$  RNA) werden in einem 0,5 mL-Regiergefäß vorgelegt und 3  $\mu\text{L}$  Oligo-Primer zugegeben. Falls noch nicht erreicht wird das Volumen mit Wasser auf 21  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Die Mischung wird für fünf Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend für eine Minute auf Eis gekühlt. Nun werden nacheinander 8  $\mu\text{L}$  5x Puffer, 4  $\mu\text{L}$  dNTPs, 6  $\mu\text{L}$  Wasser und 2  $\mu\text{L}$  reverse Transkriptase (MLV-Transkriptase (Promega)) zugegeben und die Mischung für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

### C.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ist eine Technik, welche die Amplifikation einer bestimmten Region eines DNA-Stranges ermöglicht [313]. Hierfür werden neben der DNA-Vorlage zwei Primer benötigt, welche komplementär zu den 3'-Enden des sense- und anti-sense-Stranges des entsprechenden Abschnittes sind, sowie eine Polymerase, deren Temperaturoptimum im Bereich von 70°C liegt (z.B. Taq-Polymerase), Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und entsprechende Puffer, welche u.a.  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{K}^+$  enthalten müssen, benötigt. Eine PCR besteht typischerweise aus einer Serie von 20-40 wiederholten Temperaturänderungen, den sog. Zyklen, die wiederum aus drei diskreten Temperaturschritten bestehen. Zuerst wird auf ca. 94-96°C erwärmt um die DNA zu schmelzen (Denaturierungsschritt), anschließend wird bei einer Temperatur zwischen 50 und 70°C die Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA ermöglicht (Anlagerungsschritt). Abschließend wird die Temperatur auf

## C Methoden

---

das Optimum für die jeweils verwendete Polymerase erhöht, so dass diese einen neuen, komplementären DNA-Strang aus den vorliegenden dNTPs synthetisiert. Um den Erfolg der PCR zu beurteilen werden die Produkte per Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

**Durchführung** Als Ausgangsmaterial für die PCR wird hier cDNA eingesetzt. Es wird pro Ansatz folgende Mischung verwendet:

10 µL	5x Puffer
4 µL	dNTPs
1 µL	revers Primer
1 µL	hin Primer
1 µL	cDNA
0,25 µL	Polymerase
32,75 µL	Wasser

Die PCR wird durchgeführt mit dem iCycler von Bio-Rad. Dafür werden die Ansätze zuerst für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend werden 35 Zyklen des folgenden Programms durchgeführt: für 30 sec bei 95°C denaturieren, 30 sec bei 57°C für die Anlagerung der Primer und 30 sec bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase. Der Schritt bei 57°C kann für die jeweiligen Primer optimiert werden, indem man eine Temperaturgradienten-PCR durchführt, bei welcher verschiedene Temperaturen zwischen 50 und 70°C gewählt werden. Abschließend werden die Proben bis zu ihrer Analyse auf 4°C gekühlt.

### C.5.4 Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegele werden verwendet um durch Anlegen eines elektrischen Feldes die negativ geladenen Nukleinsäuren in der Agarosematrix nach ihrer Größe aufzutrennen. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller und weiter als große.

**Durchführung** Agarose wird 1,5%ig (w/w) in 150 mL TAE-Puffer durch Erwärmen gelöst (für 70 sec bei 800 W in der Mikrowelle) und nach Abkühlen auf ca. 45°C 60 µL Ethidiumbromidlösung zugegeben. Die Proben werden 1:1 mit Probenauftragspuffer verdünnt und in das Gel aufgetragen. Im Laufpuffer TAE wird anschließend für 45 min eine Spannung von 100 V angelegt und das Gel abschließend unter UV-Bestrahlung gescannt, welche die Detektion der Ethidiumbromid-interkalierten Nukleinsäuren erlaubt.

### C.5.5 Plasmidpräparation

Die Präparation wurde mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen folgendermaßen durchgeführt (soweit nicht anders angegeben wird eine Zentrifuge mit einem 45°-Festwinkelrotor verwendet.):

1. 25 mL Kulturbrühe werden für 15 min bei 6.000 g und 4°C abzentrifugiert.
2. Das erhaltenen Pellet wird in 4 mL P2 Puffer resuspendiert.
3. 4 mL Puffer P2 zugegeben, gut mischen, für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
4. 4 mL Puffer P3 zugegeben, gut mischen, für 45 min auf Eis inkubieren.
5. Für 45 min bei 16.100 g und 4°C zentrifugieren. Überstand abnehmen.
6. Überstand nochmals für 25 min bei 16.100 g und 4°C zentrifugieren.
7. Equibrilieren einer *QIAGEN-tip 100* mittels Auftragung von 4 mL QBT Puffer, welcher ohne Zentrifugation durchfließen gelassen wird.
8. Durchfluss auf die *QIAGEN-tip 100* auftragen und ebenfalls ohne Zentrifugation durchfließen lassen.
9. Waschen der *QIAGEN-tip 100* mit zweimal 10 mL QC Puffer.
10. Eluieren der DNA mit 5 mL QF Puffer.
11. Fällern der DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen 70% Isopropanol zum Durchfluss aus dem vorherigen Schritt.
12. Direkt anschließende Zentrifugation für 80 min bei 3.300 g und 4°C in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor.
13. Waschen des Pellets mit 2 mL 70% Ethanol (abzentrifugiert bei 15.000 g für 10 min).
14. Lufttrocknung des Pellets für 10 min und anschließende Resuspendierung in 500 µL 10 mM Tris-Puffer (pH=8,5).

Die Quantifizierung der DNA-Menge wurde mit dem NanoDrop Spektrophotometer durchgeführt.

### C.5.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Mit der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR, engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*) kann ein DNA Molekül sowohl amplifiziert als auch zugleich quantifiziert werden [314]. Die qRT-PCR wird hier mit Reverser Transkription gekoppelt um so indirekt mRNA-Mengen zu quantifizieren und eine Aussage über die Expressionstärke bestimmter Gene zu erhalten. Die Quantifizierung kann dabei sowohl als absolute Kopienzahl als auch relative zu einem anderen Gen erfolgen. Prinzipiell wird eine PCR ausgeführt, bei welcher die amplifizierte DNA während des Reaktionsablaufes in Echtzeit detektiert wird. Hierfür gibt es zwei Ansätze: entweder wird ein nicht-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff verwendet, welcher in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert oder eine sequenzspezifische DNA-Sonde, bestehend aus Oligonukleotiden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind und nur mit bestimmten DNA-Abschnitten hybridisieren. In dieser Arbeit wird der erstgenannte Ansatz

verwendet und als Farbstoff SYBR Green verwendet, welcher nur fluoresziert nach Interkalation in die dsDNA. Bei der Durchführung wird nach jedem Zyklus die Fluoreszenzintensität bestimmt und durch Vergleich mit einer Standardverdünnung die dsDNA-Konzentration bestimmt. Als Bezug zur Normalisierung werden sog. *house keeping genes* verwendet. Dies sind Gene deren Expressionslevel möglichst beständig sind, wodurch sie als konstanter Referenzwert verwendet werden können (relative Quantifizierung). In der ersten Phase der qRT-PCR ist die Menge der Vorlage noch sehr gering, weshalb die Amplifikatmenge noch zu stark von der Wahrscheinlichkeit abhängt, dass sich Templat, primer und Polymerase treffen, während in der letzten Phase der qRT-PCR die Produktmenge ein Plateau erreicht, welches mehr von der anfänglichen Menge an Primer als an der der DNA-Vorlage abhängt. Nur in der Phase dazwischen liegt ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg vor. Der Anfang der exponentiellen Phase wird mit dem Ct-Wert markiert (*cycle threshold*), welcher den Zyklus beschreibt in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant höher als die Hintergrundfluoreszenz ist. Die Berechnung der relativen Menge erfolgt hier nach einer auf der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode basierenden Auswertung, welche die Verwendung mehrerer HKGs gleichzeitig zulässt [315]. Hierbei wird die relative Expressionsstärke eines GOI bei zwei verschiedenen Proben mittels mehrerer HKGs nach dem folgenden Ansatz berechnet:

Zunächst wird aus den einzelnen Messwerten der Mehrfachbestimmungen der Ct-Werte eines Gens in einer Probe der arithmetische Mittelwert  $Ct_{mean}$  bestimmt.

Dann wird aus der genspezifischen Amplifikationseffizienz  $AE$ , dem für das Gen minimalen Ct-Wert über alle Proben  $Ct_{min}$  und  $Ct_{mean}$  die für das jeweilige Gen und die Probe spezifische Quantity  $Q$  nach der folgenden Formel bestimmt:

$$Q = AE^{Ct_{min} - Ct_{mean}}$$

Nun wird aus den Q-Werten aller HKG einer Probe das geometrische Mittel gebildet um den Normalisierungsfaktor NF einer Probe zu erhalten. Dieser wiederum wird verwendet als Divisor für den Q-Wert des jeweiligen GOI um das normalisierte Expressionslevel  $EL_{norm}$  des jeweiligen GOI in der entsprechenden Probe zu erhalten:

$$EL_{norm}(GOI) = \frac{Q(GOI)}{NF}$$

Um jetzt das relative Expressionslevel eines GOIs in zwei Proben zu bestimmen, muss aus diesen der Quotient gebildet werden:

$$relative\ Expressionslevel\ GOI = \frac{EL_{norm}(GOI, Probe\ x)}{EL_{norm}(GOI, Probe\ y)}$$

**Durchführung** Es wurden pro Gen und Probe Doppelbestimmungen angesetzt, welche jeweils dreifach gemessen worden sind, also jeweils sechs Messwerte erhalten. Der Versuchansatz bestand jeweils aus:

- 1  $\mu\text{L}$  cDNA
- 12,5  $\mu\text{L}$  Sso Advanced SYBR Green Supermix
- 0,5  $\mu\text{L}$  revers Primer
- 0,5  $\mu\text{L}$  hin Primer
- 10,5  $\mu\text{L}$  Wasser

Der enthaltene Fluoreszenzfarbstoff ist iQ SYBR Green und es wird die iQ5 qRT-PCR Station (bestehend aus dem iCycler und dem iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System) von Bio-Rad verwendet. Die enthaltene iQ5 Optical Systems Software bestimmt automatisch die Ct-Werte aus welchen dann mittels der oben angegebenen Auswertung die relativen Expressionslevel berechnet werden können.

### C.6 Chromatographische Methoden

#### C.6.1 Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie

Bei der IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatographie*) ist eine Metall-chelatierende Gruppe (in diesem Fall Nitrilotriessigsäure) auf dem Säulenmaterial immobilisiert. Daran wird ein Ion eines Übergangsmetall so gebunden, dass dieses mehrere seiner Koordinationsbindungen für Interaktionen mit der basischen Aminosäure Histidin zur Verfügung stellen und so zur Aufreinigung His-getagter Proteine genutzt werden kann. Für die Selektivität der Bindung ist jeweils die vom Metallion abhängige Geometrie der Koordinationsbindungen entscheidend. Eluiert wird per Verdrängung durch Pufferlösungen, welche Imidazol enthalten, das Bestandteil der Seitenkette von Histidin ist.

##### C.6.1.1 Screening nach zu verwendender Metallsalzlösung für die präparative Aufreinigung mit 8-strip-columns

- Verwendete Puffer:
  - Equibrilierungspuffer: 100 mM NaAc, 500 mM NaCl, pH=4,5
  - Bindungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH=8
  - Elutionspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=8
- Verwendete Metallsalzlösungen:
  - Ni<sup>2+</sup>: 0,1 M Nickelsulfat (NiSO<sub>4</sub>·6 H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer
  - Co<sup>2+</sup>: 0,1 M Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer
  - Cu<sup>2+</sup>: 0,1 M Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer
  - Zn<sup>2+</sup>: 0,1 M Zinksulfat (ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer

Es wurde 15-lagige Metall-Chelat-Strips verwendet. Diese wurden zunächst nach dem folgenden Protokoll mit den entsprechenden Metallionen beladen:

- 300 µL Equibrilierungspuffer auf die Membranen geben und für 2 min bei 1500 g zentrifugieren.
- Zweimal je 300 µL Metallsalzlösung (jede auf je 2 *columns*) geben und für 2 min bei 1500 g zentrifugieren.
- Zweimal mit je 300 µL Equibrilierungspuffer waschen um ungebundene Metallionen zu entfernen, 2 min bei 1500 g zentrifugieren.

Die Aufreinigung des His-getagten Proteins erfolgte anschließend nach dem folgenden Protokoll:

- Equibrilieren der Membran mit zweimal je 300 µL Bindungspuffer, 2 min bei 1500 g zentrifugieren.
- Beladung der Membran mit zweimal je 300 µL Probe (Doppelbestimmung pro Metalion), 4 min bei 1500 g zentrifugieren.
- Zweimal mit je 300 µL Bindungspuffer waschen um ungebundene Proteine zu entfernen, 4 min bei 1500 g zentrifugieren.
- Protein mit je 300 µL Elutionspuffer in drei Fraktionen eluieren, 4 min bei 1500 g zentrifugieren.

### C.6.1.2 Vorbereitung der IDA75-Membranadsorber

Für die präparative IMAC werden IDA75 Membranadsorber von Sartorius verwendet. Die Be- und Entladung der Membran erfolgt an der FPLC-Anlage. Zum Beladen wird die Membran zunächst mit 10 mL Equibrilierungspuffer, dann mit 10 mL Nickellösung und abschließend noch einmal mit 10 mL Bindungspuffer gespült. Zum Entladen der Membran wird sie dreifach mit zunächst 10 mL 1 M Schwefelsäure und dann mit 10 mL Equibrilierungspuffer gespült. Alle Be- und Entladungsprozesse werden bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Abschließend wird der Membranadsorber zur Lagerung mit Equibrilierungspuffer, welcher 0,02% Natriumazid enthält, gefüllt.

#### Verwendete Puffer/Lösungen:

Equibrilierungspuffer: 100 mM NaAc, 500 mM NaCl, pH=4,5

Ni<sup>2+</sup>-Lösung: 0,1 M Nickelsulfat (NiSO<sub>4</sub>·6 H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer

### C.6.1.3 Aufreinigung des extrazellulären VEGF<sub>165</sub>

Der Überstand wurde bis auf die Hälfte des gewünschten Volumens aufkonzentriert, mit einem Volumen Bindungspuffer versetzt und dann der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. Nach der Equibrilierung der beladenen Membran erfolgt die Aufreinigung dem folgenden Protokoll:

<u>Volumen</u>	<u>Puffer</u>	<u>Flussrate</u>
5 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
Probenauftragung mit Bindungspuffer		0,5 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
10 mL	Waschpuffer	1 mL/min
5 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
10 mL	Elutionspuffer	1 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min

## C Methoden

---

### Verwendete Puffer:

Bindungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH=8,0

Waschpuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH=8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=8,0

### C.6.1.4 Aufreinigung von LIF aus CHO-Zellen

Der Überstand wurde bis auf die Hälfte des gewünschten Volumens aufkonzentriert, mit einem Volumen Bindungspuffer versetzt und dann der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. Nach der Equilibrierung der beladenen Membran erfolgt die Aufreinigung nach dem folgenden Protokoll:

<u>Volumen</u>	<u>Puffer</u>	<u>Flussrate</u>
5 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
Probenauftragung mit Bindungspuffer		0,5 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
10 mL	Elutionspuffer	1 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min

### Verwendete Puffer:

Bindungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH=8,0

Elutionspuffer: 100 mM NaAc, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=4,5

### C.6.1.5 Aufreinigung von LIF aus *E.coli*

Der Zellaufschluss wurde in Bindungspuffer durchgeführt und kann deshalb direkt für die Aufreinigung eingesetzt werden. Nach der Equilibrierung der beladenen Membran erfolgt die Aufreinigung nach dem folgenden Protokoll:

<u>Volumen</u>	<u>Puffer</u>	<u>Flussrate</u>
5 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
Probenauftragung mit Bindungspuffer		1 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
10 mL	Waschpuffer	1 mL/min
5 mL	Elutionspuffer I	1 mL/min
15 mL	Elutionspuffer II	1 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min

### Verwendete Puffer:

Bindungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH=8,0

Waschpuffer: 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH=8,0

Elutionspuffer I: 50 mM Tris, 100 mM Imidazol, pH=7,5

Elutionspuffer II: 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=7,5

## C.6.2 Heparin-Affinitätschromatographie

Heparine sind variabel veresterte Glykosaminglykane, die aus der wechselnden Abfolge von D-Glucosamin und einer Uronsäure bestehen, welches aufgrund seiner Affinitäten zu bestimmten Biomolekülen, wie Koagulationsfaktoren oder Zytokinen, als funktionelle Gruppe einer Affinitätschromatographiematrix verwendet werden kann.

### C.6.2.1 Aufreinigung von extrazellulärem VEGF<sub>165</sub> und CHO-LIF

Es wird eine 1 mL Heparin HP HiTrap-Säule von GE Healthcare verwendet.

Nach dem der aufkonzentrierte mit Bindungspuffer verdünnte Überstand bzw. die in Bindungspuffer umgepuffeten Elutionsfraktionen des vorherigen Aufreinigungsschritttes in die Probenschleife gespritzt wurde, wird die FPLC nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

<u>Volumen</u>	<u>Puffer</u>	<u>Flussrate</u>
10 mL	Bindungspuffer	0,5 mL/min
Probenauftragung mit Bindungspuffer		0,2 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	0,5 mL/min
10 mL	Elutionspuffer	0,5 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min

Abschließend wird die Säule zur Lagerung mit 20% Ethanol gespült. Bei der Etablierung der Protokolle wurde die Elution per Gradient durchgeführt. Dabei wurde (statt der oben angegebenen Elution) über 10 mL der Elutionspufferanteil linear von 0 auf 100% erhöht und anschließend für 5 mL konstant auf 100% gehalten (alles mit 0,5 mL/min).

#### Verwendete Puffer:

Bindungspuffer: 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,0

Elutionspuffer: 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 M NaCl, pH = 7,0

## C.6.3 Protein G- und A-Affinitätschromatographie

Die Proteine A und G können aufgrund ihrer hohen Affinität zur Fc-Region von Immunoglobulinen als stationäre Phasen in der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von diesen eingesetzt werden. Für humane Immunoglobuline hat Protein A eine hohe Affinität zu IgG1, IgG2 und IgG4, sowie eine mäßige Affinität zu IgM, IgA und IgE. Protein G bindet mit hoher Affinität an IgG1-4, jedoch nicht an IgM, IgA und IgE. Der Fc-Teil des aufzureinigenden Fusionsproteins stammt von einem humanen IgG1.

### C.6.3.1 Aufreinigung des Dll1Fc-Fusionsproteins

Es werden 1 mL HiTrap Protein A/G-Säulen von GE Healthcare verwendet. Vor Beginn der FPLC wird in die Fraktionsröhrchen (Fraktionsvolumen je 1 mL) jeweils 60 µL 1 M Tris-HCl-Puffer vorgelegt um den stark sauren Elutionspuffer zu neutralisieren. Nachdem der aufkonzentrierte, mit Bindungspuffer verdünnte, Überstand in die Probenschleife gespritzt wurde, wird die FPLC nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

<u>Volumen</u>	<u>Puffer</u>	<u>Flussrate</u>
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
Probenauftragung mit Bindungspuffer		0,5 mL/min
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
5 mL	Elutionspuffer	1 mL/min
5 mL	Bindungspuffer	1 mL/min

Abschließend wird die Säule zur Lagerung mit 20% Ethanol gespült. Die laut SDS-PAGE produktenthaltenden Fraktionen werden mit Vivaspin-2-Zentrifugalkonzentratoren in PBS umgepuffert.

#### **Verwendete Puffer:**

Bindungspuffer: 20 mM Natriumphosphat, pH=7,0

Elutionspuffer Protein G-Säule: 0,1 M Glycin-HCl, pH=2,7

Elutionspuffer Protein A-Säule: 0,1 M Zitronensäure, pH=3,5

### C.6.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Proteine in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Das hydrodynamische Volumen der Proteine bestimmt dabei ihr Trennverhalten. Die Aufenthaltsdauer der Proteine in der stationären Phase ist dabei umgekehrt proportional zu ihrer Größe.

#### C.6.4.1 Aufreinigung von LIF aus CHO-Zellen

Es wird eine Proteema-300Å-Säule von PSS verwendet. Als Puffersystem kommt 50 mM NPP-Puffer (pH=7,0) zum Einsatz. Die Säule wird mit dem Puffer gespült und nach der Auftragung der Probe für 30 mL mit einer Flussrate von 0,2 mL/min laufen gelassen.

### C.6.5 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie basiert auf der ionischen Wechselwirkung geladener Proteine mit einer Ionenaustauscher-Matrix als stationärer Phase. Die Ladung der amphoteren

Proteine wird dabei durch den pH-Wert des Puffers und den isoelektrischen Punkt des Proteins bestimmt. Es gibt verschiedene funktionelle Gruppe welche für Ionenaustauscher-Matrizes verwendet werden. Es werden Carboxymethyl- (CM) als schwache und Sulfomethyl- (S) und Sulfopropylgruppen (SP) als starke Kationenaustauscher eingesetzt, sowie Diethylaminoethylgruppen (DEAE) als schwache und die quarternäre Ammoniumverbindung Trimethylaminoethyl (Q) als starke Anionenaustauscher. Die Elution kann entweder durch Verdrängung mit hohen Salzkonzentrationen oder durch eine pH-Wert-Änderung, bei welcher der isoelektrische Punkt des jeweiligen Proteins über- bzw. unterschritten wird, erfolgen.

### C.6.5.1 Aufreinigung von LIF aus CHO-Zellen

Für die Aufreinigung von LIF wurde aufgrund seines theoretische berechneten pI-Wertes von 9,3 ein Bindungs-pH-Wert von 8,3 und ein Elutions-pH-Wert von 10,3 gewählt. Als stationäre Phase wurde ein S75-Membranadsorber von Sartorius verwendet. Nach der Einstellung des pH-Wertes der Probe auf 8,3 und der Equibrilierung der Membran mit Bindungspuffer wurde die Ionenaustauschchromatographie nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

<u>Volumen</u>	<u>Puffer</u>	<u>Flussrate</u>
10 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
Probenauftragung mit Bindungspuffer		0,5 mL/min
5 mL	Bindungspuffer	1 mL/min
20 mL	Elutionspuffer	1 mL/min

Abschließend wird der Membranadsorber zur Lagerung mit PBS mit 1M NaCl und 0,02% Natriumazid gespült.

#### Verwendete Puffer:

Bindungspuffer: 20 mM Tris, pH=8,3

Elutionspuffer: 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH=10,3

### C.6.6 Aufreinigung des intrazellulären VEGF<sub>165</sub> mit *magnetic beads*

*Magnetic beads* sind kleine paramagnetische Kügelchen, welche (in diesem Fall) auf ihrer Oberfläche primäre Aminogruppen tragen. An diese wird mit Hilfe von Glutaraldehyd ein anti-VEGF<sub>165</sub>-Antikörper kovalent gekoppelt. Hierfür werden zunächst 333 µL der *magnetic beads* mit 1333 µL Kupplungspuffer für 5 min bei 20 rpm inkubiert. Die Partikel werden mittels eines Magneten an der Gefäßwand immobilisiert und der Puffer abgenommen. Dieser Vorgang wird insgesamt drei Mal wiederholt. Die *magnetic beads* werden für 3 h bei 20 rpm mit 666 µL Glutaraldehydlösung inkubiert und der Waschschrift mit Kupplungspuffer anschließend noch drei mal wiederholt. Die *magnetic beads* sind nun für die Antikörperimmobilisierung aktiviert. Dafür werden 333 µL des in PBS gelösten Antikörpers mit 667 µL Kupplungspuffer verdünnt und 7,3

## C Methoden

---

mg BSA darin gelöst. Die aktivierten *magnetic beads* werden in dieser Lösung für 20 h bei 20 rpm inkubiert und darauf folgend für 30 min mit Glycin-Quenching-Lösung deaktiviert und dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen, in welchem sie auch gelagert werden können. Für die Aufreinigung werden die *magnetic beads* drei Mal für 5 min mit 1,8 mL Bindungspuffer gewaschen. Der Aufschluss von  $150 \cdot 10^6$  Zellen in 3,6 mL Bindungspuffer wurde in zwei Aliquots aufgeteilt und die *magnetic beads* darin für 4 bzw. 11 h inkubiert. Nach zwei zehnminütigen Waschschrinen bei 20 rpm mit Bindungspuffer folgen die erste Elution für 5 min mit Elutionspuffer I, die zweite Elution für 10 min mit Elutionspuffer I und dann die dritte Elution für 5 min mit Elutionspuffer II. Die Elutionspuffervolumina betragen jeweils 1,5 mL. Zwischen den Elutionsschritten wird jeweils für 10 min mit 1,5 mL Bindungspuffer gewaschen.

### **Verwendete Puffer/Lösungen:**

Kupplungspuffer: 0,1 M Pyridin, pH=6,0

Glutaraldehydlösung: 5% Glutaraldehyd in Kupplungspuffer

Glycin-Quenching-Lösung: 1 M Glycin, pH=8,0

Waschpuffer: 0,01 M Tris, 0,1%  $\text{NaN}_3$ , 0,1% BSA, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH=7,4

Bindungspuffer: 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=7,0

Elutionspuffer I: 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 M  $\text{MgCl}_2$ , pH=7,0

Elutionspuffer II: 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3 M  $\text{MgCl}_2$ , pH=3,9

## D Ergänzende Ergebnisse

### D.1 Optimierung der IMAC-Aufreinigung von intrazellulärem VEGF<sub>165</sub> mit *8-strip-columns*

Für die Optimierung der Aufreinigung wurden sog. *8-strip-columns* verwendet, dies sind kleine IMAC-Membranen, welche in Plastikbehältern so angeordnet sind, dass sie mit 96-Loch-Platten als Sammelbehälter in Zentrifugen betrieben werden können. Die detaillierte Durchführung ist in Abschnitt C.6.1.1 dargestellt.

#### D.1.1 Optimierung der verwendeten Metallsalzlösung

Zuerst sollte festgestellt werden, welches Metallion die besten Ergebnisse liefert. Die hierfür verwendeten Metallsalzlösungen waren:

- Ni<sup>2+</sup>: 0,1 M Nickelsulfat (NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer
- Co<sup>2+</sup>: 0,1 M Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer
- Cu<sup>2+</sup>: 0,1 M Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer
- Zn<sup>2+</sup>: 0,1 M Zinksulfat (ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) in Equibrilierungspuffer

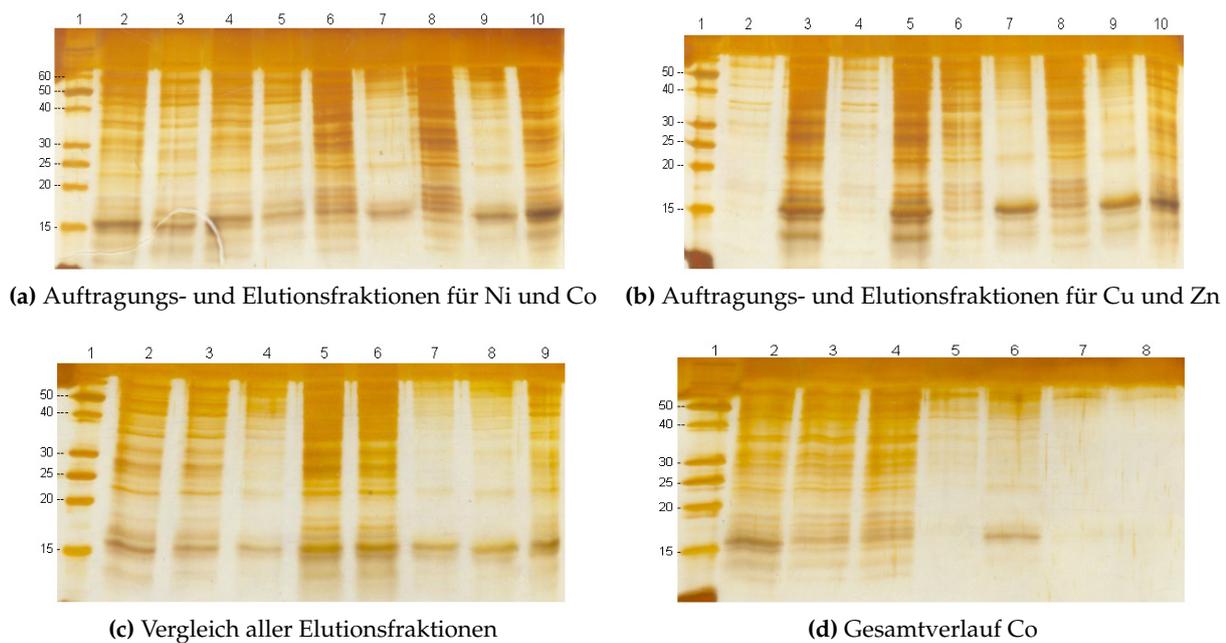
Jede der Aufreinigungen wurde doppelt durchgeführt ((1) und (2)). Es wurden 20 Millionen Zellen verwendet und der entsprechende Aufschluss in acht Aliquots aufgeteilt. Die Ergebnisse der entsprechenden SDS-PAGE-Gele sind in Abbildung repfig:8scMetalGele dargestellt.

Dem Western Blot in Abbildung 4.3 zufolge liegt die Größe des VEGF<sub>165</sub> im Bereich 21-24 kDa. Wenn man davon ausgeht, dass die Bande welche in allen Gelen etwa in der Mitte zwischen den Markern 20 und 25 kDa zu finden ist, das VEGF<sub>165</sub> darstellt, so konnte durch Verwendung von Nickel und Kupfer deutlich mehr VEGF<sub>165</sub> eluiert werden. Bei der Verwendung von Nickel ist der Grad der Verunreinigung geringer als bei Kupfer, weshalb für die folgenden Versuche Nickel als Metallion ausgewählt wurde.

#### D.1.2 Optimierung des verwendeten Elutionspuffers

Im ersten Versuchsteil wurde als Elutionspuffer 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol mit pH = 8,0 verwendet. Hier sollte nun geklärt werden ob durch erhöhte Imida-

## D Ergänzende Ergebnisse



**Abbildung D.1:** Silbergefärbte SDS-PAGE-Gele der Optimierung per *8-strip-columns*. Die Probenauftragung ist in Tabelle D.1 zusammengefasst.

zolkonzentration und gesenkten pH-Wert die Menge des eluierten VEGF<sub>165</sub> erhöht und/oder umgekehrt die Menge der Verunreinigung gesenkt werden kann. Die Durchführung entsprach jener der Metallsalzoptimierung (mit 40 Millionen aufgeschlossener Zellen, aufgeteilt in 16 Aliquots). Es wurden acht verschiedene Elutionspuffer (jeweils als Doppelbestimmung) getestet, alle enthielten 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl und verschiedene Konzentrationen Imidazol bei verschiedenen pH-Werten: 0,1 M und 0,5 M Imidazol jeweils mit den pH-Werten 3,5, 5,0, 6,5 und 8,0. Die Ergebnisse der entsprechenden SDS-PAGE-Gele sind in Abbildung D.2 dargestellt.

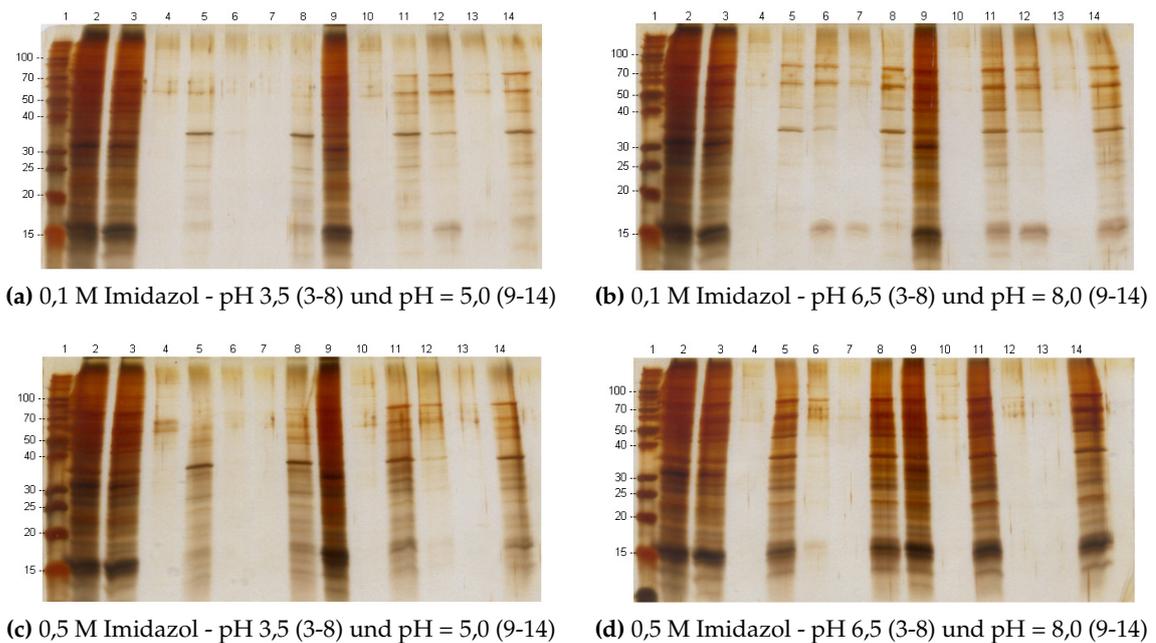
Eine deutlich geringere Verunreinigung des Zielproteins ließ sich mit keinem der Ansätze erreichen. Die größte Menge VEGF<sub>165</sub> wurde mit 0,5 M Imidazol bei pH = 8,0 erhalten. Da jedoch

**Tabelle D.1:** Probenauftragsschema für die SDS-PAGE-Gele der Optimierung der Metallsalzlösung (PA=Probenauftrags-, W=Wasch-, E=Elutionsfraktion, uZ=ursprünglicher Zellaufschluss)

Auftragsschema:

Spur	Gel (a)	Gel (b)	Gel (c)	Gel (d)
1	Marker	Marker	Marker	Marker
2	PA1 Ni(1)	PA1 Cu(1)	E1 Ni(1)	uZ
3	E1 Ni(1)	E1 Cu(1)	E1 Ni(2)	PA1 Co(1)
4	PA1 Ni(2)	PA1 Cu(2)	E1 Co(2)	PA2 Co(1)
5	E1 Ni(2)	E1 Cu(2)	E1 Cu(1)	W1 Co(1)
6	PA1 Co(1)	PA1 Zn(1)	E1 Cu(2)	E1 Co(1)
7	E1 Co(1)	E1 Zn(1)	E1 Zn(1)	E2 Co(1)
8	PA1 Co(2)	PA1 Zn(2)	E1 Zn(2)	E3 Co(1)
9	E1 Co(2)	E1 Zn(2)	uZ	-
10	uZ	uZ	-	-

## D.1 Optimierung der IMAC-Aufreinigung von intrazellulärem VEGF<sub>165</sub> mit *8-strip-columns*



**Abbildung D.2:** Silbergefärbte SDS-PAGE-Gele der Elutionspuffer-Optimierung per *8-strip-columns* (1: Marker, 2: ursprünglicher Zellaufschluss, 3/9: 1. Probenauftrag, 4/10: 1. Waschschrift, 5/11: 1. Elution, 6/12: 2. Elution, 7/13: 3. Elution, 8/14: 1. Elution (2. Ansatz))

hier die Verunreinigung besonders ausgeprägt ist, soll nun nach einem Waschschrift gesucht werden, welcher dieses Problem minimiert.

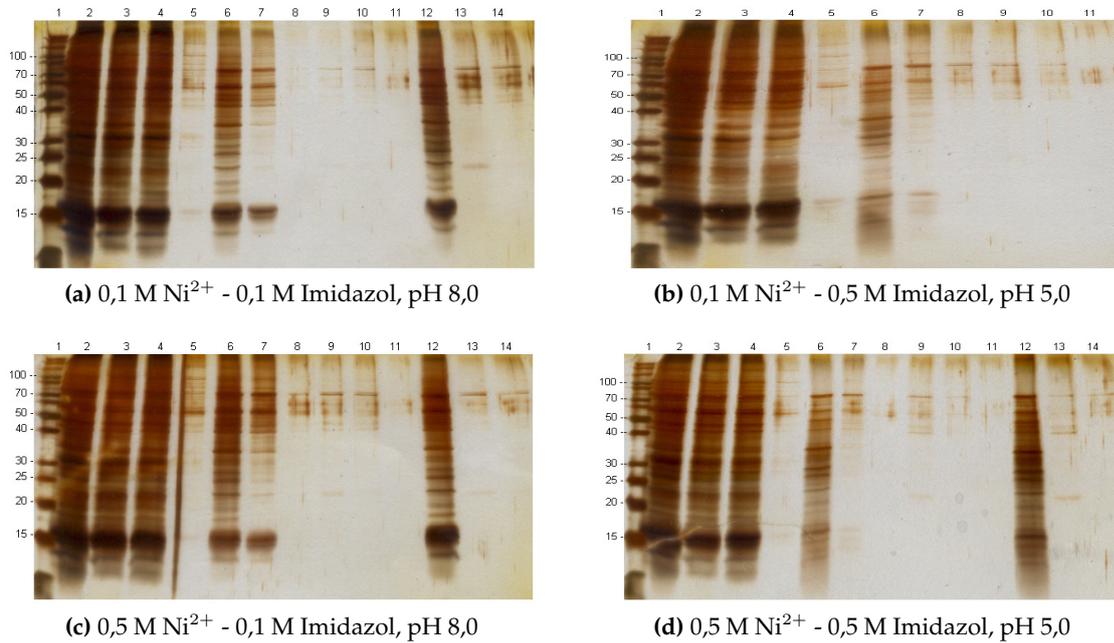
### D.1.3 Optimierung bezüglich Waschschrift und Molarität der Metallsalzlösung

Zusätzlich zur Suche nach einem Waschschrift, welcher möglichst viele der Verunreinigungen und möglichst wenig VEGF<sub>165</sub> eluiert, soll geklärt werden ob durch eine höhere Konzentration der zum Beladen der Membran verwendeten Metallsalzlösung die Kapazität der Membran erhöht und damit mehr Zielprotein gewonnen werden kann. Als Metallsalzlösungen werden 0,1 M und 0,5 M Nickelsulfat ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) in Equilibrierungspuffer verwendet, als Waschpuffer 0,1 M Imidazol mit pH = 8,0 und 0,5 M Imidazol mit pH = 5,0 in 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl (jede der Kombinationen als Doppelbestimmung). Die Ergebnisse der entsprechenden SDS-PAGE-Gele sind in Abbildung D.3 dargestellt.

In Bezug auf die verwendete Metallsalzlösung konnte kein eindeutiger Einfluss der Molarität festgestellt werden.

Die erhaltenen Elutionsfraktionen zeigen auf Gel (d) das beste Ergebnis, eine Bande bei ca. 22-23 kDa ist erkennbar, es liegen jedoch noch Verunreinigungen durch mindestens zwei weitere Proteine vor. Ein anschließender zweiter Aufreinigungsschritt ist also nötig.

## D Ergänzende Ergebnisse



**Abbildung D.3:** Silbergefärbte SDS-PAGE-Gele der Waschpuffer- und Nickelkonzentrations-Optimierung per *8-strip-columns*. Die Probenauftragung ist in Tabelle D.2 zusammengefasst.

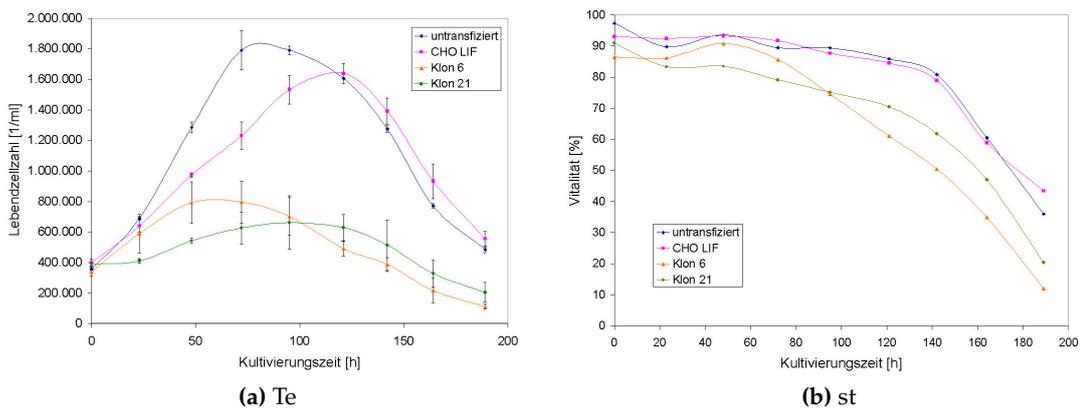
**Tabelle D.2:** Probenauftragsschema für die SDS-PAGE-Gele der Optimierung der VEGF<sub>165</sub>-Aufreinigung bezüglich Waschschritt und Nickelkonzentration.

Auftragsschema:

Lane	Probe
1	Marker
2	ursprünglicher Zellaufschluss
3	1. Probenauftrag
4	2. Probenauftrag
5	1. Spülen mit Bindungspuffer
6	1. Waschen mit Waschpuffer
7	2. Waschen mit Waschpuffer
8	2. Spülen mit Bindungspuffer
9	1. Elution
10	2. Elution
11	3. Elution
12	1. Waschen mit Waschpuffer (2. Ansatz)
13	1. Elution (2. Ansatz)
14	2. Elution (2. Ansatz)

## D.2 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der LIF-hochproduzierenden Einzelzellklone

Die von Pierre Morreti in seiner Dissertation per Einzelzellklonierung erzeugten hochproduzierenden Klone 6 und 21 wurden bezüglich ihres Wachstumsverhaltens mit der ursprünglichen CHO-LIF-Zelllinie und den untransfizierten CHO<sup>SFS</sup>-Zellen verglichen. Hierfür wurden sie in Schüttelkolben bei 110 rpm in 15 mL Medium kultiviert. Die Ergebnisse der Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungen sind in Abbildung D.4 dargestellt.



**Abbildung D.4:** Lebendzellzahl- (a) und Vitalitätsverläufe (b) für die Kultivierung der beiden LIF-Einzelzellklone 6 und 21 im Vergleich zu ihren Ursprungszelllinien.

Wie zu erkennen ist, sind die erreichbaren maximalen Zelldichten für beide Klone deutlich unter denen der ursprünglichen LIF-Zelllinie. Da dies für die Handhabung bei der Kultivierung das Problem ergab, dass man z.T. nicht mal das doppelte Volumen erreichte und da zusätzlich die Vitalitätswerte auch deutlich schlechter als bei der Ursprungszelllinie waren, wurde letztere für die weiteren Kultivierungen zur Produktion von LIF verwendet.



## E Abbildungsverzeichnis

2.1	Strukturen monokationischer Lipide zum Gentransfer. . . . .	7
2.2	Schematisches Diagramm der Struktur des Homodimers von VEGF <sub>165</sub> . . . . .	13
2.3	Überblick über die Rolle der VEGF-Rezeptoren und der sie aktivierenden VEGF-Varianten. . . . .	14
2.4	Schematisches Diagramm der Struktur von LIF. . . . .	15
2.5	Der JAK/STAT3-Signalweg. . . . .	16
2.6	Schematisches Diagramm des Notch-Signaltransduktionsweges. . . . .	18
3.1	Schematische Karte des Vektors, welcher für die Erstellung der Dll1Fc-produzierenden Zelllinie verwendet wurde. . . . .	22
3.2	Vitalitätsverlauf der drei FuGene6-Ansätze sowie ihrer jeweiligen Kontrollen während der Selektionskultivierung. . . . .	23
3.3	Vitalitätsverlauf der CaP <sub>i</sub> -Präzipitationsansätze a-c sowie ihrer entsprechenden Kontrollen während der Selektionskultivierung. . . . .	25
3.4	Fluoreszenzintensitäten für die mittels Lipofektion erstellten Zelllinien. . . . .	25
3.5	Fluoreszenzintensitäten für die durch CaP <sub>i</sub> -Präzipitation erstellten Zelllinien und den Einzelzellklon IIIIF11. . . . .	26
3.6	Western Blots der Überstände der fünf Dll1Fc-Zelllinien. . . . .	27
3.7	Anteil der positiven Zellen der mittels Einzelzellklonierung aus DF6 erzeugten Zelllinien im Vergleich zu ihrer Parentalzelllinie. . . . .	29
3.8	GFP-Fluoreszenzintensitäten der mittels GFP-Sortierungen der Dll1Fc-Zelllinie DFc gewonnenen Zellen. . . . .	29
3.9	Anteile der Dll1Fc-positiven Zellen der mittels GFP-Sortierungen der DFc-Zelllinie gewonnenen Zellen. . . . .	30
3.10	Lebendzellzahlen und Vitalitäten der sechs höchstproduzierenden Einzelzellklone und untransfizierter CHO <sup>SFS</sup> -Zellen. . . . .	31
3.11	Chromatogramme der vier affinitätschromatographischen Aufreinigungen von Dll1Fc. . . . .	33
3.12	Elutionspeaks der affinitätschromatographischen Aufreinigungen von Dll1Fc. . . . .	33
3.13	Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel von Elutionsfraktionen der vier affinitätschromatographischen Aufreinigungen von Dll1Fc. . . . .	34
3.14	Ergebnisse des Luciferase-Aktivitätsassays von Dll1Fc. . . . .	35
3.15	Anteile positiver Zellen der durch Lipofektion erzeugten Zelllinien zu Beginn der Kultivierung und nach 14, 32 und 60 Tagen. . . . .	36

3.16	Anteile positiver Zellen der durch $\text{CaP}_1$ -Präzipitation erzeugten Zelllinien zu Beginn der Kultivierung und nach 13 und 28 Tagen. . . . .	36
4.1	Schematische Karte des Vektors, welcher für die Erstellung der $\text{VEGF}_{165}$ -produzierenden Zelllinie verwendet wurde. . . . .	40
4.2	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der $\text{VEGF}_{165}$ -positiven Zellen im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle. . . . .	40
4.3	Western Blot von Zellaufschluss und Überstand der $\text{VEGF}_{165}$ -Zelllinie. . . . .	41
4.4	Western Blot vom Zellaufschluss und Überstand der bFGF-Zelllinie. . . . .	41
4.5	Ergebnis des Western Blots der Überstände und Aufschlüsse der Zelllinien transduziert mit den Vektoren, die die neuen Signalpeptiden enthalten. . . . .	42
4.6	Ergebnisse der Western Blots der Zellaufschlüsse und Kultivierungsüberstände der HEK293T-Zellen. . . . .	42
4.7	Ergebnisse der Lumineszenzmessung für Überstand und Zellaufschluss der HEK-293T-Zellen nach Transduktion mit den Luciferase-Vektoren. . . . .	43
4.8	Schematische Karte des Vektors, der für die Erstellung der neuen $\text{VEGF}_{165}$ -produzierenden Zelllinie verwendet wurde. . . . .	44
4.9	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der $\text{VEGF}_{165}$ -positiven Zellen im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle für die Zelllinien VEGF-100 und VEGF-250. . . . .	45
4.10	Überlagerung der Histogramme für VEGF-100 und VEGF-250. . . . .	45
4.11	Western Blot des aufkonzentrierten Überstandes der Zelllinien VEGF-100, VEGF-250 und der untransfizierten Ursprungszelllinie. . . . .	46
4.12	Agarosegele der Temperaturoptimierungsexperimente für die vier Primerpaare. . . . .	47
4.13	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der $\text{VEGF}_{165}$ -positiven Zellen für die per eGFP-Sortierung und Kälteinkubationsassay erzeugten Subzelllinien sowie ihre Parentalzelllinie VEGF-250. . . . .	49
4.14	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der eGFP-positiven Zellen für die per eGFP-Sortierung und Kälteinkubationsassay erzeugten Zelllinien sowie ihrer Parentalzelllinie VEGF-250. . . . .	50
4.15	Lebendzellzahl- und Vitalitätsverläufe für die aus den zwei Sortierungen erhaltenen Subzelllinien, sowie der beiden Parentalzelllinien. . . . .	52
4.16	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der $\text{VEGF}_{165}$ -positiven Zellen im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle für die nicht sezernierende $\text{VEGF}_{165}$ -Zelllinie. . . . .	53
4.17	Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der $\text{VEGF}_{165}$ -Aufreinigung per <i>magnetic beads</i> mit vier Stunden Inkubationszeit. . . . .	55
4.18	Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen des 1. Schrittes der Aufreinigung des extrazellulären $\text{VEGF}_{165}$ per IMAC. . . . .	56
4.19	Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen des 2. Schrittes der Aufreinigung des extrazellulären $\text{VEGF}_{165}$ per HAC. . . . .	57

4.20	Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte für die verschiedenen Assays mit und ohne Zusatz von 0,5 ng VEGF <sub>165</sub> /mL. . . . .	59
4.21	Konzentrationsabhängigkeit der Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte für die vier verschiedenen Assays. . . . .	60
4.22	Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte für den CTB- und den MTT-Assay. . . . .	60
4.23	Kulturen der mit den drei verschiedenen Collagenase-Lösungen isolierten Zellen an Tag 2. . . . .	61
4.24	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD31-positiven Zellen der beiden Isolationskulturen B0,5 und W0,5. . . . .	62
4.25	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der CD31-positiven Zellen der beiden CD31-Sortierungen des HUVEC-Isolierungsansatzes B0,5. . . . .	62
4.26	Fluoreszenzwerte für die drei CTB-Assays mit den unterschiedlichen HUVEC-Zellen. . . . .	63
4.27	Fluoreszenzwerte der drei CTB-Assays mit den unterschiedlichen VEGF <sub>165</sub> . . . . .	64
5.1	Schematische Karte des Plasmides wie es für die Erstellung der LIF-produzierenden Zelllinie verwendet wurde. . . . .	67
5.2	Per IMAC aufgereinigtes LIF, Detektion per silbergefärbtem SDS-PAGE-Gel und Western Blot. . . . .	68
5.3	Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen des 2. Schrittes der LIF-Aufreinigung per Größenausschlusschromatographie. . . . .	69
5.4	Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen des 2. Schrittes der LIF-Aufreinigung per Ionenaustauschchromatographie. . . . .	70
5.5	Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen des 2. Schrittes der LIF-Aufreinigung per Heparin-Affinitätschromatographie. . . . .	70
5.6	SDS-PAGE-Gel der aufkonzentrierten Elutionsfraktionen nach dem ersten und zweiten Schritt der LIF-Aufreinigung. . . . .	71
5.7	Western Blots der Durchläufe von LIF-Aufreinigungen per IMAC und Heparin-Affinitätschromatographie. . . . .	72
5.8	Lebendzellzahlen und Vitalitäten für die Kultivierungen der CHO-LIF-Zelllinie in Bioreaktor und Spinnerflasche. . . . .	72
5.9	Schematische Karte des Vektors, welcher für die Transformation der <i>E.coli</i> BL21 (DE3) verwendet wurde und schematische Darstellung des resultierenden Fusionsproteins. . . . .	74
5.10	Chromatogramm und silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel ausgewählter Fraktionen der Aufreinigung des trx-his-tev-hLIF-Fusionsproteins per IMAC. . . . .	74
5.11	Chromatogramm des zweiten Aufreinigungsschrittes per IEX und SDS-PAGE-Gel der vereinigten Elutionsfraktionen . . . . .	75
5.12	Lebendzellzahlen und Vitalitäten für die mESC-Kultivierungen mit den zu vergleichenden LIFs. . . . .	77

5.13	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Apoptosemessung der mESCs nach vier Tagen Kultivierung. . . . .	77
5.14	Lebendzellzahlen und Vitalitäten für die mESC-Kultivierungen mit den zu vergleichenden LIFs in verminderten Konzentrationen. . . . .	78
5.15	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der SSEA-1-positiven mESC-Zellen nach 14 Tagen Kultivierung mit 100 pg LIF/mL. . . . .	79
5.16	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der SSEA-1-positiven mESC-Zellen nach 14 Tagen Kultivierung mit 1 pg LIF/mL. . . . .	79
5.17	Lebendzellzahlen und Vitalitäten für die iPS-Kultivierungen mit den zu vergleichenden LIFs bei einer Konzentration von 10 ng/mL. . . . .	80
5.18	Ergebnisse der durchflusszytometrischen SSEA-1- und GFP-Messungen der iPS-Zellen an Tag 4. . . . .	80
5.19	Ergebnisse der durchflusszytometrischen SSEA-1- und GFP-Messungen der iPS-Zellen an Tag 21. . . . .	81
5.20	Relative Expressionsstärken der Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog, des ekto-dermalen Markers Trp63 und des mesodermalen Markers Brachyury für Kultivierungen der adhären-ten mESC mit den drei verschiedenen LIFs nach 25 Tagen Kultivierungsdauer. . . . .	82
C.1	Fotos von der Primärzellisolation aus einer Nabelschnur. . . . .	106
D.1	SDS-PAGE-Gele der Optimierung per <i>8-strip-columns</i> . . . . .	132
D.2	SDS-PAGE-Gele der Elutionspuffer-Optimierung per <i>8-strip-columns</i> . . . . .	133
D.3	SDS-PAGE-Gele der Waschpuffer- und Nickelkonzentrations-Optimierung per <i>8-strip-columns</i> . . . . .	134
D.4	Lebendzellzahl- und Vitalitätsverläufe für die Kultivierung der beiden LIF-Einzelzellklone 6 und 21 im Vergleich zu ihren Ursprungszelllinien. . . . .	135

## F Tabellenverzeichnis

4.1	Erwartete Produktlängen und ermittelte optimale Anlagerungstemperaturen-temperaturen für die vier verwendeten Primerpaare. . . . .	47
4.2	Zusammenfassung der Messergebnisse der durchflusszytometrischen VEGF <sub>165</sub> -und eGFP-Bestimmungen der durch eGFP-Sortierung und Kälteinkubationsassay erzeugten Zelllinien sowie ihre Parentalzelllinie VEGF-250. . . . .	49
4.3	Zusammenfassung der Messergebnisse der durchflusszytometrischen VEGF <sub>165</sub> -und eGFP-Bestimmungen der per eGFP-Sortierung und Kälteinkubationsassay erzeugten Zelllinien sowie ihre Parentalzelllinie VEGF-250 nach 27 Tagen Kultivierung. . . . .	51
4.4	Zusammenfassung der Messergebnisse der durchflusszytometrischen VEGF <sub>165</sub> -Bestimmungen der nicht-sezernierenden VEGF <sub>165</sub> -Zelllinie während einer Kultivierung über 198 Tage. . . . .	54
4.5	Übersicht der getesteten Varianten des HUVEC-Proliferationsassays. . . . .	58
5.1	Kultivierungsvarianten der LIF-Aktivitätstestung mit mESCs. . . . .	76
5.2	Durchflusszytometrisch bestimmte Anteile der SSEA-1-positiven mESC-Zellen kultiviert mit 10 ng LIF/mL nach 0, 4, 11, 18 und 25 Tagen in Kultur. . . . .	78
A.1	Übersicht über die mit dem Dll1Fc-Vektor (Abbildung 3.1) erstellten Zelllinien und Subzelllinien . . . . .	89
A.2	Übersicht über die mit dem zweiten VEGF-Vektor (Abbildung 4.8) erstellten Zelllinien und Subzelllinien . . . . .	90
D.1	Probenauftragsschema für die SDS-PAGE-Gele der Optimierung der Metallsalzlösung. . . . .	132
D.2	Probenauftragsschema für die SDS-PAGE-Gele der Optimierung der VEGF <sub>165</sub> -Aufreinigung bezüglich Waschschrift und Nickelkonzentration. . . . .	134



## G Literaturverzeichnis

- [1] G. Hannig and S.C. Makrides. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 16:54–60, 1998.
- [2] F. Baneyx and M. Mujacic. Recombinant protein folding and misfolding in *escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22:1399–1408, 2004.
- [3] C. Holz, B. Prinz, N. Bolotina, V. Sievert, K. Büsow, B. Simon, U. Stahl, and C. Lang. Establishing the yeast *saccharomyces cerevisiae* as a system for expression of human proteins on a proteome-scale. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 4:97–108, 2003.
- [4] R. Daly and M.T.W. Hearn. Expression of heterologous proteins in *pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18:119–138, 2005.
- [5] T.A. Kost, J.P. Condreay, and D.L. Jarvis. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 23:567–575, 2005.
- [6] G. Chang, C.J. Chen, C.Y. Lin, H.C. Chen, and H.W. Chen. Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. *Journal of Biotechnology*, 102:61–71, 2003.
- [7] A.D. Bandaranayake, C. Correnti, B.Y. Ryu, M. Brault, R.K. Strong, and D.J. Rawlings. Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors. *Nucleic Acids Research*, September:1–11, 2011.
- [8] G. Chodorowska, A. Glowacka, and M. Tomczyk. Leukemia inhibitory factor (lif) and its biological activity. *Annalis Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina*, 59:189–193, 2004.
- [9] N. Ferrara and W.J. Henzel. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161:851–858, 1989.
- [10] P. Carmeliet. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9:653–660, 2003.
- [11] J. Folkman. Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other diseases. *Nature Medicine*, 1:27–31, 1995.
- [12] A.N. Gubin, B. Reddy, J.N. Njoroge, and J.L. Miller. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236:347–350, 1997.
- [13] G. Ringold, B. Dieckmann, and F. Lee. Co-expression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the *escherichia coli* xgprt gene in chinese hamster ovary cells. *Journal of molecular and applied genetics*, 1(3):165–175, 1981.

- [14] R.G. Werner and W. Noe. Mammalian cell cultures. part ii: Genetic engineering, protein glycosylation, fermentation and process control. *Arzneimittelforschung*, 43:1242–1249, 1993.
- [15] Sabine Schmitz. *Der Experimentator: Zellkultur*. Elsevier GmbH, München, 2007.
- [16] J.H. Nunberg, R.J. Kaufman, R.T. Schimke, G. Urlaub, and L.A. Chasin. Amplified dihydrofolate-reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant chinese hamster ovary cell line. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 75(11):5553–5556, 1978.
- [17] R.J. Kaufman and R.T. Schimke. Amplification and loss of dihydrofolate-reductase genes in a chinese hamster ovary cell line. *Molecular and Cellular Biology*, 1(12):1069–1076, 1981.
- [18] L.M. Barnes, C.M. Bentley, and A.J. Dickson. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology*, 32(2):109–123, 2000.
- [19] F.M. Wurm. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11):1393–1398, NOV 2004.
- [20] S.J. Singer and G.L. Nicolson. Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. *Science*, 175(4023):720–&, 1972.
- [21] T.M. Klein, E.D. Wolf, R. Wu, and J.C. Sanford. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. *Nature*, 327(6117):70–73, MAY 7 1987.
- [22] B.R. Frame, H.Y. Zhang, S.M. Cocciolone, L.V. Sidorenko, C.R. Dietrich, S.E. Pegg, S.F. Zhen, P.S. Schnable, and K. Wang. Production of transgenic maize from bombarded type II callus: Effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(1):21–29, JAN-FEB 2000.
- [23] D.P. Tieleman. The molecular basis of electroporation. *Biophysical Journal*, 86(1, Part 2 Suppl. S):371A–372A, JAN 2004. 48th Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, MD, FEB 14-18, 2004.
- [24] E. Mayhew and R. Juliano. Interactions of polynucleotides with cultured mammalian cells - cell surface charge density and rna uptake. *Experimental Cell Research*, 77(1-2):409–414, 1973.
- [25] W. Holter, C.M. Fordis, and B.H. Howard. Efficient gene-transfer by sequential treatment of mammalian cells with deae-dextran and deoxyribonucleic acid. *Experimental Cell Research*, 184(2):546–551, OCT 1989.
- [26] O. Boussif, F. Lezoualch, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in-vivo - polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16):7297–7301, AUG 1 1995.
- [27] F.L. Graham and A.J. Vandereb. New technique for assay infectivity of human adenovirus 5 dna. *Virology*, 52(2):456–467, 1973.
- [28] M. Jordan, C. Kohne, and F.M. Wurm. Calcium-phosphate mediated DNA transfer into HEK-293 cells in suspension: control of physicochemical parameters allows transfection in stirred media - Transfection and protein expression in mammalian cells. *Cytotechnology*, 26(1):39–47, 1998.
- [29] M. Jordan, A. Schallhorn, and F.M. Wurm. Transfecting mammalian cells: Optimization of critical

- parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acid Research*, 24(4):596–601, FEB 15 1996.
- [30] C. Chen and H. Okayama. High-efficiency transformation of mammalian-cells by plasmid-dna. *Molecular and Cellular Biology*, 7(8):2745–2752, AUG 1987.
- [31] C.A. Chen and H. Okayama. Calcium-phosphate-mediated gene transfer - a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid dna. *Biotechniques*, 6(7):632–&, JUL-AUG 1988.
- [32] E.H. Chowdhury, T. Sasagawa, M. Nagaoka, A.K. Kundu, and T. Akaike. Transfecting mammalian cells by DNA/calcium phosphate precipitates: Effect of temperature and pH on precipitation. *Analytical Biochemistry*, 314(2):316–318, MAR 15 2003.
- [33] K.M. Kjer and A.M. Fallon. Efficient transfection of mosquito cells is influenced by the temperature at which dna-calcium phosphate coprecipitates are prepared. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 16(3):189–200, 1991.
- [34] R. DellArciprete, M. Stella, M. Fornaro, R. Ciccocioppo, M.G. Capri, A.M. Naglieri, and S. Alberti. High-efficiency expression gene cloning by flow cytometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44(6):629–640, JUN 1996.
- [35] M. Jordan and F. Wurm. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods*, 33(2):136–143, JUN 2004.
- [36] Y.M. Shen, R.R. Hirschhorn, W.E. Mercer, E. Surmacz, Y. Tsutsui, K.J. Soprano, and R. Baserga. Gene-transfer - dna-microinjection compared with dna transfection with a very high efficiency. *Molecular and Cellular Biology*, 2(9):1145–1154, 1982.
- [37] C. Seelos. A critical parameter determining the aging of DNA - Calcium-phosphate precipitates. *Analytical Biochemistry*, 245(1):109–111, FEB 1 1997.
- [38] M. Okazaki, Y. Yoshida, S. Yamaguchi, M. Kaneno, and J.C. Elliott. Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials*, 22(18):2459–2464, SEP 2001.
- [39] S.P. Wilson, F. Liu, R.E. Wilson, and P.R. Housley. Optimization of calcium phosphate transfection for bovine chromaffin cells - relationship to calcium phosphate precipitate formation. *Analytical Biochemistry*, 226(2):212–220, APR 10 1995.
- [40] A. Loyter, G.A. Scangos, and F.H. Ruddle. Mechanisms of dna uptake by mammalian cells - fate of exogenously added dna monitored by the use of fluorescent dyes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(2):422–426, 1982.
- [41] H.M. Pick, P. Meissner, A.K. Preuss, P. Tromba, H. Vogel, and F.M. Wurm. Balancing GFP reporter plasmid quantity in large-scale transient transfections for recombinant anti-human rhesus-D IgG1 synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(6):595–601, SEP 20 2002.
- [42] P.J. Groot-Kormelink, M. Beato, C. Finotti, R.J. Harvey, and L.G. Sivilotti. Achieving optimal expression for single channel recording: a plasmid ratio approach to the expression of alpha 1 glycine receptors in HEK293 cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 113(2):207–214, JAN 30 2002.
- [43] M. Urabe, A. Kume, K. Tobita, and K. Ozawa. DNA/calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transfection efficiency. *Analytical Biochemistry*, 278(1):91–92, FEB 1 2000.

- [44] Y.W. Yang and J.C. Yang. Calcium phosphate as a gene carrier: Electron microscopy. *Biomaterials*, 18(3):213–217, FEB 1997.
- [45] J. Kaposos and P.G. Koutsoukos. Formation of calcium phosphates in aqueous solutions in the presence of carbonate ions. *Langmuir*, 15(19):6557–6562, SEP 14 1999.
- [46] C. Gorman, R. Padmanabhan, and B.H. Howard. High-efficient dna-mediated transformation of primate cells. *Science*, 221(4610):551–553, 1983.
- [47] S.P. Wilson and L.A. Smith. Addition of glycerol during DNA exposure enhances calcium phosphate transfection. *Analytical Biochemistry*, 246(1):148–150, MAR 1 1997.
- [48] I. Segura, M.A. Gonzalez, A. Serrano, J.L. Abad, A. Bernad, and H.H. Riese. High transfection efficiency of human umbilical vein endothelial cells using an optimized calcium phosphate method. *Analytical Biochemistry*, 296(1):143–147, SEP 1 2001.
- [49] P. Batard, M. Jordan, and F. Wurm. Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene*, 270(1-2):61–68, MAY 30 2001.
- [50] D. Lechardeur, K.J. Sohn, M. Haardt, P.B. Joshi, M. Monck, R.W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O’Brodovich, and G.L. Lukacs. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Therapy*, 6(4):482–497, APR 1999.
- [51] E. Orrantia and P.L. Chang. Intracellular distribution of dna internalized through calcium phosphate precipitation. *Experimental Cell Research*, 190(2):170–174, OCT 1990.
- [52] C. Somasundaram, I. Tournier, G. Feldmann, and D. Bernuau. Increased efficiency of gene transfection in primary cultures of adult rat hepatocytes stimulated to proliferate - a comparative-study using the lipofection and the calcium-phosphate precipitate methods. *Cell Biology International Reports*, 16(7):653–662, JUL 1992.
- [53] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northop, G.M. Ringold, and M. Danielsen. Lipofection - a highly efficient, lipid-mediated dna-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21):7413–7417, NOV 1987.
- [54] R. Leventis and J.R. Silvius. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1023(1):124–132, MAR 30 1990.
- [55] L. Stamatatos, R. Leventis, M.J. Zuckermann, and J.R. Silvius. Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid-vesicles and biological membranes. *Biochemistry*, 27(11):3917–3925, MAY 31 1988.
- [56] J.H. Felgner, R. Kumar, C.N. Sridhar, C.J. Wheeler, Y.J. Tsai, R. Boder, P. Ramsy, M. Martin, and P.L. Felgner. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4):2550–2561, JAN 28 1994.
- [57] X. Gao and L. Huang. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179(1):280–285, AUG 30 1991.
- [58] J.P. Behr, B. Demeneix, J.P. Loeffler, and J.P. Mutul. Efficient gene-transfer into mammalian primary endocrine-cells with lipopolyamine-coated dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(18):6982–6986, SEP 1989.

- [59] E. Dodds, M.G. Dunckley, K. Naujoks, U. Michaelis, and G. Dickson. Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. *Gene Therapy*, 5(4):542–551, APR 1998.
- [60] J.P. Loeffler and J.P. Behr. Gene transfer into primary and established mammalian cell lines with lipopolyamine-coated dna. *Methods in Enzymology*, 217:599–618, 1993.
- [61] A. Fasbender, J. Zabner, B.G. Zeiher, and M.J. Welsh. A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Therapy*, 4(11):1173–1180, NOV 1997.
- [62] T. Griffiths, M. Russell, K. Froning, B.D. Brown, S.M. Scanlon, M. Almazan, R. Marcil, and J.P. Hoeffler. The PerFect(TM) lipid optimizer kit for maximizing lipid-mediated transfection of eukaryotic cells. *Biotechniques*, 22(5):982–987, MAY 1997.
- [63] R.C. Adami, W.T. Collard, S.A. Gupta, K.Y. Kwok, J. Bonadio, and K.G. Rice. Stability of peptide condensed plasmid DNA formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(6):678–683, JUN 1998.
- [64] A. Kichler, K. Mechtler, J.P. Behr, and E. Wagner. Influence of membrane-active peptides on lipospermine/DNA complex mediated gene transfer. *Bioconjugate Chemistry*, 8(2):213–221, MAR-APR 1997.
- [65] B. Schwartz, M.A. Ivanov, B. Pitard, V. Escriou, R. Rangara, G. Byk, P. Wils, J. Crouzet, and D. Scherman. Synthetic DNA-compacting peptides derived from human sequence enhance cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 6(2):282–292, FEB 1999.
- [66] O. Boussif, M.A. Zanta, and J.P. Behr. Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Therapy*, 3(12):1074–1080, DEC 1996.
- [67] M.P. Turunen, M.O. Hiltunen, M. Ruponen, L. Virkamaki, F.C. Szoka, A. Urtti, and S. Yla-Herttuala. Efficient adventitial gene delivery to rabbit carotid artery with cationic polymer-plasmid complexes. *Gene Therapy*, 6(1):6–11, JAN 1999.
- [68] F.L. Sorgi, S. Bhattacharya, and L. Huang. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, 4(9):961–968, SEP 1997.
- [69] J. You, M. Kamihira, and S. Iijima. Enhancement of transfection efficiency by protamine in DDAB lipid vesicle-mediated gene transfer. *Journal of Biochemistry*, 125(6):1160–1167, JUN 1999.
- [70] W. Zauner, S. Brunner, M. Buschle, M. Ogris, and E. Wagner. Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1428(1):57–67, JUN 28 1999.
- [71] J.D. Fritz, H. Herweijer, G.F. Zhang, and J.A. Wolff. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. *Human Gene Therapy*, 7(12):1395–1404, AUG 1 1996.
- [72] J.F. KukowskaLatallo, A.U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D.A. Tomalia, and J.R. Baker. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10):4897–4902, MAY 14 1996.
- [73] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessee, L. Seymour, F. Szoka, A.R. Thierry, E. Wagner, and G. Wu. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Human Gene Therapy*, 8(5):511–512, MAR 20 1997.

- [74] B. Sternberg, F.L. Sorgi, and L. Huang. New structures in complex-formation between dna and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron-microscopy. *FEBS Letters*, 356(2-3):361–366, DEC 19 1994.
- [75] B. Sternberg, K.L. Hong, W.W. Zheng, and D. Papahadjopoulos. Ultrastructural characterization of cationic liposome-DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1375(1-2):23–35, OCT 15 1998.
- [76] N. Dan. The structure of DNA complexes with cationic liposomes - cylindrical or flat bilayers? *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1369(1):34–38, FEB 2 1998.
- [77] B.J. Battersby, R. Grimm, S. Huebner, and G. Cevc. Evidence for three-dimensional interlayer correlations in cationic lipid-DNA complexes as observed by cryo-electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1372(2):379–383, JUL 17 1998.
- [78] J. Gustafsson, G. Arvidson, G. Karlsson, and M. Almgren. Complexes between cationic liposomes and dna visualized by cryo-tem. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1235(2):305–312, MAY 4 1995.
- [79] A.R. Thierry, P. Rabinovich, B. Peng, L.C. Mahan, J.L. Bryant, and R.C. Gallo. Characterization of liposome-mediated gene delivery: Expression, stability and pharmacokinetics of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 4(3):226–237, MAR 1997.
- [80] H. Gershon, R. Ghirlando, S.B. Guttman, and A. Minski. Mode of formation and structural features of dna cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry*, 32(28):7143–7151, JUL 20 1993.
- [81] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, and M.J. Welsh. Cellular and molecular barriers to gene-transfer by a cationic lipid. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32):18997–19007, AUG 11 1995.
- [82] F. Labat-Moleur, A.M. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Furstenberger, F. Oberling, E. Brambilla, and J.P. Behr. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Therapy*, 3(11):1010–1017, NOV 1996.
- [83] T. Stegmann and J.Y. Legendre. Gene transfer mediated by cationic lipids: Lack of a correlation between lipid mixing and transfection. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1325(1):71–79, APR 3 1997.
- [84] Y.H. Xu, S.W. Hui, P. Frederik, and F.C. Szoka. Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes. *Biophysical Journal*, 77(1):341–353, JUL 1999.
- [85] D.S. Friend, D. Papahadjopoulos, and R.J. Debs. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1278(1):41–50, JAN 12 1996.
- [86] P. Pires, S. Simoes, S. Nir, R. Gaspar, N. Duzgunes, and M.C.P. de Lima. Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1418(1):71–84, APR 14 1999.
- [87] X.H. Zhou and L. Huang. Dna transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine - characterization and mechanism of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1189(2):195–203, JAN 19 1994.

- [88] I. Wrobel and D. Collins. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1235(2):296–304, MAY 4 1995.
- [89] Y.H. Xu and F.C. Szoka. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, 35(18):5616–5623, MAY 7 1996.
- [90] D. Hoekstra, J. Rejman, L. Wasungu, F. Shi, and I. Zuhorn. Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochemical Society Transactions*, 35(Part 1):68–71, FEB 2007. Conference on Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules, Cardiff, WALES, AUG 29-31, 2006.
- [91] R. Tachibana, H. Harashima, N. Ide, S. Ukitsu, Y. Ohta, N. Suzuki, H. Kikuchi, Y. Shinohara, and H. Kiwada. Quantitative analysis of correlation between number of nuclear plasmids and gene expression activity after transfection with cationic liposomes. *Pharmaceutical Research*, 19(4):377–381, APR 2002.
- [92] R. Zhou, C. Geiger, and D. Dean. Intracellular trafficking of nucleic acids. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 1(1):127–140, November 2004.
- [93] N. M. Rao. Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(3):245–252, MAR 2010.
- [94] I. Mortimer, P. Tam, I. MacLachlan, R.W. Graham, E.G. Saravolac, and P.B. Joshi. Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Therapy*, 6(3):403–411, MAR 1999.
- [95] M. Wilke, E. Fortunati, M. van den Broek, A.T. Hoogeveen, and B.J. Scholte. Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Therapy*, 3(12):1133–1142, DEC 1996.
- [96] S.L. Grant, A.M. Douglas, G.A. Goss, and C.G. Begley. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor regulate the growth of normal human breast epithelial cells. *Growth Factors*, 19(3):153–162, 2001.
- [97] T.M. Daly. Overview of adeno-associated viral vectors. *Methods in Molecular Biology*, 246:157–165, 2004.
- [98] G.B. Karlsson and Liljeström P. Delivery and expression of heterologous genes in mammalian cells using self-replicating alphavirus vectors. *Methods in Molecular Biology*, 246:543–557, 2004.
- [99] R.V. Merrihew, T.A. Kost, and J.P. Condreay. Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*, 246:355–365, 2004.
- [100] W.F. Goins, D. Wolfe, D.M. Krisky, Q. Bai, E.A. Burton, D.J. Fink, and J.C. Glorioso. Delivery using herpes simplex virus: an overview. *Methods in Molecular Biology*, 246:257–299, 2004.
- [101] N. Somia. Gene transfer by retroviral vectors: an overview. *Methods in Molecular Biology*, 246:463–490, 2004.
- [102] A.M.C. Brown and J.P. Dougherty. *DNA Cloning 4: Mammalian Systems (Editors: D.M. Glover and B.D. Hames)*, chapter Retroviral Vectors, pages 113–142. Oxford University Press, 1995.
- [103] H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell. *Molecular Cell Biology (4th edition)*. W.H. Freeman, New York, USA, 2000.
- [104] C.-K. Tai and N. Kasahara. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy. *Frontiers in Bioscience*, 13:3083–3095, JAN 1 2008.

- [105] D. Markowitz, S. Goff, and A. Bank. A safe packaging line for gene-transfer - separating viral genes on 2 different plasmids. *Journal of Virology*, 62(4):1120–1124, APR 1988.
- [106] S. Kim, H. Lin, E. Barr, L. Chu, J.M. Leiden, and M.S. Parmacek. Transcriptional targeting of replication-defective adenovirus transgene expression to smooth muscle cells in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 100(5):1006–1014, SEP 1 1997.
- [107] I.M. Verma and N. Somia. Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature*, 389(6648):239–242, SEP 18 1997.
- [108] J.D. Harris and N.R. Lemoine. Strategies for targeted gene therapy. *Trends in Genetics*, 12(10):400–405, OCT 1996.
- [109] N. Kasahara, A.M. Dozy, and Y.W. Kan. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science*, 266(5189):1373–1376, NOV 25 1994.
- [110] H. Neda, C.H. Wu, and G.Y. Wu. Chemical modification of an ecotropic murine leukemia-virus results in redirection of its target-cell specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22):14143–14146, AUG 5 1991.
- [111] W.R. Beyer, M. Westphal, W. Ostertag, and D. von Laer. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: Generation, concentration, and broad host range. *Journal of Virology*, 76(3):1488–1495, FEB 2002.
- [112] J.C. Burns, T. Matsubara, G. Lozinski, J.K. Yee, T. Friedmann, C.H. Washabaugh, and P.A. Tsonis. Pantropic retroviral vector-mediated gene-transfer, integration, and expression in cultured newt limb cells. *Developmental Biology*, 165(1):285–289, SEP 1994.
- [113] K.Y. Qing, T. Bachelot, P. Mukherjee, X.S. Wang, L. Peng, M.C. Yoder, P. Leboulch, and A. Srivastava. Adeno-associated virus type 2-mediated transfer of ecotropic retrovirus receptor cDNA allows ecotropic retroviral transduction of established and primary human cells. *Journal of Virology*, 71(7):5663–5667, JUL 1997.
- [114] E.H. Oldfield, Z. Ram, Y.W. Chiang, and R.M. Blaese. Intrathecal gene-therapy for the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. *Human Gene Therapy*, 6(1):55–85, JAN 1995.
- [115] Z. Abdel-Wahab, C. Wetz, D. Hester, N. Pickett, C. Vervaert, J.R. Barber, D. Jolly, and H.F. Seigler. A phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-gamma gene-modified autologous melanoma cells - Monitoring the humoral immune response. *Cancer*, 80(3):401–412, AUG 1 1997. 87th Annual Meeting of the American-Association-for-Cancer-Research, WASHINGTON, DC, APR 20–24, 1996.
- [116] R.P. Rother, W.L. Fodor, J.P. Springhorn, C.W. Birks, E. Setter, M.S. Sandrin, S.P. Squinto, and S.A. Rollins. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 182(5):1345–1355, NOV 1 1995.
- [117] S.A. Rollins, C.W. Birks, E. Setter, S.P. Squinto, and R.P. Rother. Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: Strategies for evading the humoral immune response. *Human Gene Therapy*, 7(5):619–626, MAR 20 1996.
- [118] S. Ghazizadeh, J.M. Carroll, and L.B. Taichman. Repression of retrovirus-mediated transgene expression by interferons: Implications for gene therapy. *Journal of Virology*, 71(12):9163–9169, DEC 1997.

- [119] R.M. Diaz, T. Eisen, I.R. Hart, and R.G. Vile. Exchange of viral promoter/enhancer elements with heterologous regulatory sequences generates targeted hybrid long terminal repeat vectors for gene therapy of melanoma. *Journal of Virology*, 72(1):789–795, JAN 1998.
- [120] P. Lewis, M. Hensel, and M. Emerman. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO Journal*, 11(8):3053–3058, AUG 1992.
- [121] R.S. Mitchell, B.F. Beitzel, A.R.W. Schroder, P. Shinn, H.M. Chen, C.C. Berry, J.R. Ecker, and F.D. Bushman. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLOS Biology*, 2(8):1127–1137, AUG 2004.
- [122] L. Naldini, U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage, I.M. Verma, and D. Trono. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259):263–267, APR 12 1996.
- [123] D. Escors and K. Breckpot. Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential. *Archivum Immunologiae et Therapica Experimentalis*, 58(2):107–119, APR 2010.
- [124] A. Schambach, M. Galla, U. Modlich, E. Will, S. Chandra, L. Reeves, M. Colbert, D.A. Williams, C. von Kalle, and C. Baum. Lentiviral vectors pseudotyped with murine ecotropic envelope: Increased biosafety and convenience in preclinical research. *Experimental Hematology*, 34(5):588–592, MAY 2006.
- [125] A. Schambach, J. Bohne, S. Chandra, E. Will, G.P. Margison, D.A. Williams, and C. Baum. Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells. *Molecular Therapy*, 13(2):391–400, FEB 2006.
- [126] S.R. Bartz and M.A. Vodicka. Production of high-titer human immunodeficiency virus type 1 pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Methods - A Companion to Methods in Enzymology*, 12(4):337–342, AUG 1997.
- [127] T. Kishimoto, T. Taga, and S. Akira. Cytokine signal-transduction. *Cell*, 76(2):253–262, JAN 28 1994.
- [128] D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, and W. Gerok. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie (15. Auflage)*. Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
- [129] F. Horn, G. Lindenmeier, I. Moc, C. Grillhösl, S. Berghold, N. Schneider, and B. Münster, editors. *Biochemie des Menschen (Auflage: 3., überarb. u. erw. A.)*. Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
- [130] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell (Fifth Edition)*. Garland Science, Taylor & Francis Group, NY, USA, 2007.
- [131] T. Hehlhans and K. Pfeffer. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115(1):1–20, MAY 2005.
- [132] W. Swardfager, K. Lanctot, L. Rothenburg, A. Wong, J. Cappell, and N. Herrmann. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer’s Disease. *Biological Psychiatry*, 68(10):930–941, NOV 15 2010.
- [133] R.M. Locksley, N. Killeen, and M.J. Lenardo. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4):487–501, FEB 23 2001.
- [134] Y. Dowlati, N. Herrmann, W. Swardfager, H. Liu, L. Sham, E.K. Reim, and K.L. Lanctot. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry*, 67(5):446–457, MAR 1 2010.

- [135] J. Brynskov, P. Foegh, G. Pedersen, C. Ellervik, T. Kirkegaard, A. Bingham, and T. Saermark. Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 51(1):37–43, JUL 2002.
- [136] E.J. Fernandez and E. Lolis. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42:469–499, 2002.
- [137] D.W. Leung, G. Cachianes, W.J. Kuang, D.V. Goeddel, and N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935):1306–1309, DEC 8 1989.
- [138] D. Maglione, V. Guerriero, G. Viglietto, P. Dellibovi, and M.G. Persico. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular-permeability factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20):9267–9271, OCT 1991.
- [139] B. Olofsson, K. Pajusola, A. Kaipainen, G. von Euler, V. Joukov, O. Saksela, A. Orpana, R.F. Petersson, K. Alitalo, and U. Eriksson. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6):2576–2581, MAR 19 1996.
- [140] V. Joukov, K. Pajusola, D. Kaipainen, A. and Chilov, I. Lahtinen, E. Kukk, O. Saksela, N. Kalkkinen, and K. Alitalo. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases (vol 15, pg 290, 1996). *EMBO Journal*, 15(7):1751, APR 1 1996.
- [141] M.G. Achen, M. Jeltsch, E. Kukk, T. Makinen, A. Vitali, A.F. Wilks, K. Alitalo, and S.A. Stacker. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2):548–553, JAN 20 1998.
- [142] M. Meyer, M. Clauss, A. Lepple-Wienhues, J. Waltenberger, H.G. Augustin, M. Ziche, C. Lanz, M. Buttner, H.J. Rziha, and C. Dehio. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO Journal*, 18(2):363–374, JAN 15 1999.
- [143] Y. Komori, T. Nikai, K. Taniguchi, K. Masuda, and H. Sugihara. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). *Biochemistry*, 38(36):11796–11803, SEP 7 1999.
- [144] J.F. Murphy and D.J. Fitzgerald. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) induces cyclooxygenase (COX)-dependent proliferation of endothelial cells (EC) via the VEGF-2 receptor. *FASEB Journal*, 15(7):1667+, MAY 29 2001.
- [145] K.A. Houck, N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, and D.W. Leung. The vascular endothelial growth factor family - identification of a 4th molecular species and characterization of alternative splicing of rna. *Molecular Endocrinology*, 5(12):1806–1814, DEC 1991.
- [146] E. Tischer, R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J.C. Fiddes, and J.A. Abraham. The human gene for vascular endothelial growth factor - multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 266(18):11947–11954, JUN 25 1991.
- [147] I. Zachary. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 280(6):C1375–C1386, JUN 2001.

- [148] Y.A. Muller, B. Li, H.W. Christinger, J.A. Wells, B.C. Cunningham, and A.M. DeVos. Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14):7192–7197, JUL 8 1997.
- [149] G. Siemeister, D. Marme, and G. Martiny-Baron. The alpha-helical domain near the amino terminus is essential for dimerization of vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18):11115–11120, MAY 1 1998.
- [150] J. Plouet, J. Schilling, and D. Gospodarowicz. Isolation and characterization of a newly identified endothelial-cell mitogen produced by att-20 cells. *EMBO Journal*, 8(12):3801–3806, DEC 1989.
- [151] N. Ferrara, K.A. Houck, L.B. Jakeman, J. Winer, and D.W. Leung. The vascular endothelial growth-factor family of polypeptides. *Journal of Cellular Biochemistry*, 47(3):211–218, NOV 1991.
- [152] Y.A. Muller, H.W. Christinger, B.A. Keyt, and A.M. deVos. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 angstrom resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*, 5(10):1325–1338, OCT 15 1997.
- [153] M. Shibuya, S. Yamaguchi, A. Yamane, T. Ikeda, A. Tojo, H. Matsushime, and M. Sato. Nucleotide-sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5(4):519–524, APR 1990.
- [154] B.I. Terman, M.E. Carrion, E. Kovacs, B.A. Rasmussen, R.L. Eddy, and T.B. Shows. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 6(9):1677–1683, SEP 1991.
- [155] F. Shalaby, J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman, and A.C. Schuh. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535):62–66, JUL 6 1995.
- [156] H.P. Gerber, A. McMurtrey, J. Kowalski, M.H. Yan, B.A. Keyt, V. Dixit, and N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase Akt signal transduction pathway - Requirement for Flk-1/KDR activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46):30336–30343, NOV 13 1998.
- [157] J.E. Park, H.H. Chen, J. Winer, K.A. Houck, and N. Ferrara. Placenta growth factor - potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in-vitro and in-vivo, and high-affinity binding to flt-1 but not to flk-1/kdr. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41):25646–25654, OCT 14 1994.
- [158] P. Carmeliet, L. Moons, A. Lutun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bon, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. DiPalma, M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. Vandendriessche, A. Ponten, U. Eriksson, K.H. Plate, J.M. Foidart, W. Schaper, D.S. Charnock-Jones, D.J. Hicklin, J.M. Herbert, D. Collen, and M.G. Persico. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*, 7(5):575–583, MAY 2001.
- [159] A. Lutun, M. Tjwa, L. Moons, Y. Wu, A. Angelillo-Scherrer, F. Liao, J.A. Nagy, A. Hooper, J. Priller, B. De Klerck, V. Compernelle, E. Daci, P. Bohlen, M. Dewerchin, J.M. Herbert, R. Fava, P. Matthys, G. Carmeliet, D. Collen, H.F. Dvorak, D.J. Hicklin, and P. Carmeliet. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature Medicine*, 8(8):831–840, AUG 2002.
- [160] S. Hiratsuka, O. Minowa, J. Kuno, T. Noda, and M. Shibuya. Flt-1 lacking the tyrosine kinase

- domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16):9349–9354, AUG 4 1998.
- [161] B. Barleon, S. Sozzani, D. Zhou, H.A. Weich, A. Mantovani, and D. Marme. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, 87(8):3336–3343, APR 15 1996.
- [162] K. Hattori, B. Heissig, Y. Wu, S. Dias, R. Tejada, B. Ferris, D.J. Hicklin, Z.P. Zhu, P. Bohlen, L. Witte, J. Hendrikx, N.R. Hackett, R.G. Crystal, M.A.S. Moore, Z. Werb, D. Lyden, and S. Rafii. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Medicine*, 8(8):841–849, AUG 2002.
- [163] H.P. Gerber, A.K. Malik, G.P. Solar, D. Sherman, X.H. Liang, G. Meng, K. Hong, J.C. Marsters, and N. Ferrara. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, 417(6892):954–958, JUN 27 2002.
- [164] N. Ferrara, H.P. Gerber, and J. LeCouter. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6):669–676, JUN 2003.
- [165] D.P. Gearing, N.M. Gough, D.J. King, J.A. and Hilton, N.A. Nicola, R.J. Simpson, E.C. Nice, A. Kelso, and D. Metcalf. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (lif). *EMBO Journal*, 6(13):3995–4002, DEC 1987.
- [166] D.J. Hilton. Lif - lots of interesting functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(2):72–76, FEB 1992.
- [167] A.M. Segrave, D.E. Mager, S.A. Charman, G.A. Edwards, and C.J.H. Porter. Pharmacokinetics of recombinant human leukemia inhibitory factor in sheep. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(3):1085–1092, JUN 1 2004.
- [168] R.C. Robinson, L.M. Grey, D. Staunton, H. Vankelecom, A.B. Vernallis, J.F. Moreau, D.I. Stuart, J.K. Heath, and E.Y. Jones. The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor - implications for receptor-binding. *Cell*, 77(7):1101–1116, JUL 1 1994.
- [169] D.J. Hilton and N.M. Gough. Leukemia inhibitory factor - a biological perspective. *Journal of Cellular Biochemistry*, 46(1):21–26, MAY 1991.
- [170] N. Sato, L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard, and A.H. Brivanlou. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine*, 10(1):55–63, JAN 2004.
- [171] R.M. Albano, N. Groome, and J.C. Smith. Activins are expressed in preimplantation mouse embryos and in ES cells and are regulated on their differentiation. *Development*, 117(2):711–723, FEB 1993.
- [172] D. James, A.J. Levine, D. Besser, and A. Hemmati-Brivanlou. TGF beta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem. *Development*, 132(6):1273–1282, MAR 2005.
- [173] K. Ogawa, R. Nishinakamura, Y. Iwamatsu, D. Shimosato, and H. Niwa. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(1):159–166, APR 28 2006.
- [174] X.X. Qi, T.G. Li, J. Hao, J. Hu, J. Wang, H. Simmons, S. Miura, Y. Mishina, and G.Q. Zhao. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pa-

- thways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16):6027–6032, APR 20 2004.
- [175] T. Burdon, A. Smith, and P. Savatier. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology*, 12(9):432–438, SEP 2002.
- [176] T. Burdon, C. Stracey, I. Chambers, J. Nichols, and A. Smith. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, 210(1):30–43, JUN 1 1999.
- [177] L. Jirmanova, M. Afanassieff, S. Gobert-Gosse, S. Markossian, and P. Savatier. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*, 21(36):5515–5528, AUG 15 2002.
- [178] T. Kunath, M.K. Saba-El-Leil, M. Almousailleakh, J. Wray, S. Meloche, and A. Smith. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, 134(16):2895–2902, AUG 15 2007.
- [179] F. He, W.H. Ge, K. Martinowich, S. Becker-Catania, V. Coskun, W.Y. Zhu, H. Wu, D. Castro, F. Guillemot, G.P. Fan, J. de Vellis, and Y.E. Sun. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nature Neuroscience*, 8(5):616–625, MAY 2005.
- [180] R. Raz, C.K. Lee, L.A. Cannizzaro, P. D'Eustachio, and D.E. Levy. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6):2846–2851, MAR 16 1999.
- [181] H. Boeuf, C. Hauss, F. DeGraeve, N. Baran, and C. Kedinger. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, 138(6):1207–1217, SEP 22 1997.
- [182] H. Niwa, T. Burdon, I. Chambers, and A. Smith. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Development*, 12(13):2048–2060, JUL 1 1998.
- [183] H. Niwa, J. Miyazaki, and A.G. Smith. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4):372–376, APR 2000.
- [184] N.M. Gough, R.L. Williams, D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, J. Stahl, D.P. Gearing, N.A. Nicola, and D. Metcalf. LIF - a molecule with divergent actions on myeloid leukemic cells and embryonic stem cells. *Reproduction Fertility and Development*, 1(4):281–288, 1989.
- [185] Q.L. Ying, M. Stavridis, D. Griffiths, M. Li, and A. Smith. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology*, 21(2):183–186, FEB 2003.
- [186] S. Artavanis-Tsakonas, M.D. Rand, and R.J. Lake. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415):770–776, 1999.
- [187] E.C. Lai. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*, 131(5):965–973, MAR 2004.
- [188] B. Ma, J.L. Simala-Grant, and D.E. Taylor. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology*, 16(12):158R–184R, DEC 2006.
- [189] I. Rebay, R.J. Fleming, R.G. Fehon, L. Cherbas, P. Cherbas, and S. Artavani-Tsakonas. Specific

- egf-repeats of notch mediate interactions with delta and serrate - implications for notch as a multifunctional receptor. *Cell*, 67(4):687–699, NOV 15 1991.
- [190] C. Brou, F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J.R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R.A. Black, and A. Israel. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: The role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell*, 5(2):207–216, FEB 2000.
- [191] M.E. Fortini and S. Artavanis-Tsakonas. The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell*, 79(2):273–282, OCT 21 1994.
- [192] F. Oswald, B. Tauber, T. Dobner, S. Bourteele, U. Kostezka, G. Adler, S. Liptay, and R.M. Schmid. p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22):7761–7774, NOV 2001.
- [193] T. Henkel, P.D. Ling, S.D. Hayward, and M.G. Peterson. Mediation of epstein-barr-virus ebna2 transactivation by recombinant signal-binding protein j(k). *Science*, 265(5168):92–95, JUL 1 1994.
- [194] M. Simons. Angiogenesis - Where do we stand now? *Circulation*, 111(12):1556–1566, MAR 29 2005.
- [195] R. Brambilla, K. Bruckner, D. Orioli, A.D. Bergemann, J.G. Flanagan, and R. Klein. Similarities and differences in the way transmembrane-type ligands interact with the Elk subclass of Eph receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 8(2-3):199–209, 1996.
- [196] H.U. Wang, Z.F. Chen, and D.J. Anderson. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 93(5):741–753, MAY 29 1998.
- [197] R.H. Adams, G.A. Wilkinson, C. Weiss, F. Diella, N.W. Gale, U. Deutsch, W. Risau, and R. Klein. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes & Development*, 13(3):295–306, FEB 1 1999.
- [198] A. Fischer, N. Schumacher, M. Maier, M. Sendtner, and M. Gessler. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes & Development*, 18(8):901–911, APR 15 2004.
- [199] R.H. Adams, F. Diella, S. Hennig, F. Helmbacher, U. Deutsch, and R. Klein. The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell*, 104(1):57–69, JAN 12 2001.
- [200] K. Hamada, Y. Oike, Y. Ito, H. Maekawa, K. Miyata, T. Shimomura, and T. Suda. Distinct roles of ephrin-B2 forward and ephB4 reverse signaling in endothelial cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 23(2):190–197, FEB 2003.
- [201] S. Hayashi, T. Asahara, H. Masuda, J.M. Isner, and D.W. Losordo. Functional ephrin-B2 expression for promotive interaction between arterial and venous vessels in postnatal neovascularization. *Circulation*, 111(17):2210–2218, MAY 3 2005.
- [202] N.D. Lawson, A.M. Vogel, and B.M. Weinstein. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Developmental Cell*, 3(1):127–136, JUL 2002.
- [203] C.J. Shawber and J. Kitajewski. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays*, 26(3):225–234, MAR 2004.

- [204] T. Gridley. Notch signaling during vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10):5377–5378, MAY 8 2001.
- [205] F.P. Limbourg, K. Takeshita, F. Radtke, R.T. Bronson, M.T. Chin, and J.K. Liao. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation*, 111(14):1826–1832, APR 12 2005.
- [206] L.T. Krebs, J.R. Shutter, K. Tanigaki, T. Honjo, K.L. Stark, and T. Gridley. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes & Development*, 18(20):2469–2473, OCT 15 2004.
- [207] J. Beckers, A. Clark, K. Wunsch, M.H. De Angelis, and A. Gossler. Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mechanisms of Development*, 84(1-2):165–168, JUN 1999.
- [208] M.H. deAngelis, J. McIntyre, and A. Gossler. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature*, 386(6626):717–721, APR 17 1997.
- [209] T. Ziegelhoeffer, B. Fernandez, S. Kostin, M. Heil, R. Voswinckel, A. Helisch, and W. Schaper. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circulation Research*, 94(2):230–238, FEB 6 2004.
- [210] A. Limbourg, M. Ploom, D. Elligsen, I. Soerensen, T. Ziegelhoeffer, A. Gossler, H. Drexler, and F.P. Limbourg. Notch ligand delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis. *Circulation Research*, 100(3):363–371, FEB 16 2007.
- [211] M. Gessler. Dll1 and Dll4: similar, but not the same. *Blood*, 113(22):5375–5376, MAY 28 2009.
- [212] K. Shimizu, S. Chiba, T. Saito, T. Takahashi, K. Kumano, Y. Hamada, and H. Hirai. Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain. *EMBO Journal*, 21(3):294–302, FEB 1 2002.
- [213] S.J. Morrison, S.E. Perez, Z. Qiao, J.M. Verdi, C. Hicks, G. Weinmaster, and D.J. Anderson. Transient notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell*, 101(5):499–510, MAY 26 2000.
- [214] S.L. Wang, A.D. Sdrulla, G. diSibio, G. Bush, D. Nofziger, C. Hicks, G. Weinmaster, and B.A. Barres. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron*, 21(1):63–75, JUL 1998.
- [215] B. Varnum-Finney, L.Z. Wu, M. Yu, C. Brashem-Stein, S. Staats, D. Flowers, J.D. Griffin, and I.D. Bernstein. Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of Notch signaling. *Journal of Cell Science*, 113(23):4313–4318, DEC 2000.
- [216] P. Mulsant, A. Gagnon, M. Dalens, and G. Tiraby. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in cho cells. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 14:243–252, 1988.
- [217] J. Davies and A. Jimenez. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *The American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, 29:1089–1092, 1980.
- [218] Y. Royer, C. Menu, X. Liu, and S.N. Constantinescu. High-throughput gateway bicistronic retroviral vectors for stable expression in mammalian cells: exploring the biological effects of stat5 overexpression. *DNA and Cell Biology*, 23:355–365, 2004.
- [219] M. Boshart, F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Häsler, B. Fleckenstein, and W. Schaffner. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41:521–530, 1985.

- [220] J.A. Nelson, C. Reynolds-Kohler, and B.A. Smith. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Molecular and Cellular Biology*, 7:4125–4129, 1987.
- [221] A.A. Zarrin, L. Malkin, I. Fong, K.D. Luk, A. Ghose, and N.L. Berinstein. Comparison of cmv, rsv, sv40 viral and v $\lambda$ 1 cellular promoters in b and t lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1446:135–139, 1999.
- [222] M.K. Foecking and H. Hofstetter. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene*, 45:101–105, 1986.
- [223] R.P. Bennett, C.A. Cox, and J.P. Hoeffler. Fusion of green fluorescent protein with the zeocin-resistance marker allows visual screening and drug selection of transfected eukaryotic cells. *Biotechniques*, 24:478–482, 1998.
- [224] G.M. Wahl, B.R. de Saint Vincent, and M.L. Derose. Effect of chromosomal position on amplification of transfected genes in mamalian cells. *Nature*, 307:516–520, 1984.
- [225] K.W. Dobie, M. Lee, J.A. Fantes, E. Graham, A.J. Clark, A. Springbett, R. Lathe, and M. McCle-naghan. Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the trans-gene integration locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:6659–6664, 1996.
- [226] J.R. Lambert and S.K. Nordeen. Steroid-selective initiation of chromatin remodeling and transcrip-tional activation of the mouse mammary tumor virus promoter is controlled by the site of promoter integration. *Journal of Biological Chemistry*, 273:32708–32714, 1998.
- [227] T.H.J. Kwaks and A.P. Otte. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic pro-teins in mammalian cells. *Trends in Biotechnology*, 24:137–142, 2006.
- [228] N. Dillon and R. Festenstein. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends in Genetics*, 18:252–258, 2002.
- [229] A.P. Otte and T.H.J. Kwaks. Gene repression by polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Current Opinion in Genetics & Development*, 13:448–454, 2003.
- [230] N. Dillon. Heterochromatin structure and function. *Biology of the Cell*, 96:631–637, 2004.
- [231] J. Byun, J.M. Kim, P.D. Robbins, and S. Kim. The selectable marker neo gene down-regulates gene expression from retroviral vectors containing an internal ribosome entry side. *Gene Therapy*, 5:1441–1444, 1998.
- [232] J.R. Birch and A.J. Racher. Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58:671–685, 2006.
- [233] S. Subramanian and F. Srien. Quantitative analysis of transient gene expression in mammalian cells using the green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 49:137–151, 1996.
- [234] Y.G. Meng, J. Liang, W.L. Wong, and V. Chisholm. Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected cho cells. *Gene*, 242:201–207, 2000.
- [235] A. Osterlehner, S. Simmeth, and U. Göpfert. Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, just published online yet:–, 2011.

- [236] H.F. Ding, Y.L. Lin, G. McGill, P. Juo, H. Zhu, J. Blenis, J. Yuan, and D.E. Fisher. Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *Journal of Biological Chemistry*, 275:38905–38911, 2000.
- [237] M. Kim, P.M. O’Callaghan, K.A. Droms, and D.C. James. A mechanistic understanding of production instability in cho cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 108:2434–2446, 2011.
- [238] C.H. Fann, F. Guirgis, G. Chen, M.S. Lao, and J.M. Piret. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 69:204–212, 2000.
- [239] L. Hammill, J. Welles, and G.R. Carson. The gel microdrop secretion assay: Identification of a low productivity subpopulation arising during the production of human antibody in cho cells. *Cytotechnology*, 34:27–37, 2000.
- [240] N.S. Kim, S.J. Kim, and G.M. Lee. Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified chinese hamster ovary cells: stability in the absence of selective pressure. *Biotechnology and Bioengineering*, 60:679–688, 1998.
- [241] S.J. Kim, N.S. Kim, C.J. Ryu, H.J. Hong, and G.M. Lee. Characterization of chimeric antibody producing cho cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnology and Bioengineering*, 58:73–84, 1998.
- [242] M.G. Pallavicini, P.S. DeTeresa, C. Rosette, J.W. Gray, and F.M. Wurm. Effects of methotrexate on transfected dna stability in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 10:401–404, 1990.
- [243] K. Strutzenberger, N. Borth, R. Kunert, W. Steinfellner, and H. Katinger. Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant cho cells. *Journal of Biotechnology*, 69:215–226, 1999.
- [244] P.J. Hastings, J.R. Lupski, S.M. Rosenberg, and G. Ira. Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics*, 10:551–564, 2009.
- [245] L.M. Barnes, C.M. Bentley, and A.J. Dickson. Molecular definition of predictive indicators of stable protein expression in recombinant ns0 myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 85:115–121, 2004.
- [246] J. Chusainow, Y.S. Yang, J.H. Yeo, P.C. Toh, P. Asvadi, N.S. Wong, and M.G. Yap. A study of monoclonal antibody-producing cho cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnology and Bioengineering*, 102:1182–1196, 2009.
- [247] R. Margueron, P. Trojer, and D. Reinberg. The key to development: interpreting the histone code? *Current Opinion in Genes & Development*, 15:163–176, 2005.
- [248] H. Cedar and Y. Bergman. Linking dna methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, 10:295–304, 2009.
- [249] D.D. De Carvalho, J.S. You, and P.A. Jones. Dna methylation and cellular reprogramming. *Trends in Cell Biology*, 20:609–617, 2010.
- [250] R.J. Klose and A.P. Bird. Genomic dna methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences*, 31:89–97, 2006.

- [251] S. Prösch, J. Stein, K. Staak, C. Liebenthal, H.D. Volk, and D.H. Krüger. Inactivation of the very strong hcmv immediate early promoter by dna cpg methylation in vitro. *Biological Chemistry*, 377:195–201, 1996.
- [252] M. Krishnan, J.M. Park, F. Cao, D. Wang, R. Paulmurugan, J.R. Tseng, M.L. Gonzalgo, S.S. Gambhir, and J.C. Wu. Effects of epigenetic modulation on reporter gene expression: implications for stem cell imaging. *The FASEB Journal*, 20:106–108, 2006.
- [253] Y. Yang, Mariati, J. Chusainow, and M.G. S. Yap. Dna methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing cho cell lines. *Journal of Biotechnology*, 147:180–185, 2010.
- [254] S.C. Jun, M.S. Kim, H.J. Hong, and Lee G.M. Limitations to the development of humanized antibody producing chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification. *Biotechnology Progress*, 22:770–780, 2006.
- [255] P. Kreiss, B. Cameron, R. Rangara, P. Mailhe, O. Aguerre-Charriol, M. Airiau, D. Scherman, J. Crouzet, and B. Pitard. Plasmid dna size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Research*, 27:3792–3798, 1999.
- [256] O. Krämer, S. Klausung, and T. Noll. Methods in mammalian cell line engineering: from random mutagenesis to sequence-specific approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88:425–436, 2010.
- [257] T. Benton, T. Chen, M. McEntee, B. Fox, D. King, R. Crombie, T.C. Thomas, and C. Bebbington. The use of ucoe vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein. *Cytotechnology*, 38:43–46, 2002.
- [258] J.L. Galbete, M. Buceta, and N. Mermod. Mar elements regulate the probability of epigenetic switching between active and inactive gene expression. *Molecular Biosystems*, 5:143–15, 2009.
- [259] M. Kito, S. Itami, Y. Fukano, K. Yamana, and T. Shibui. Construction of engineered cho strains for high-level production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:442–448, 2002.
- [260] H. Zhou, Z.G. Liu, Z.W. Sun, Y. Huang, and W.Y. Yu. Generation of stable cell lines by site-specific integration of transgenes into engineered chinese hamster ovary strains using an flp-frt system. *Journal of Biotechnology*, 147:122–129, 2010.
- [261] A. Oberbek, M. Matasci, D.L. Hacker, and F.M. Wurm. Generation of stable, high-producing cho cell lines by lentiviral vector-mediated gene-transfer in serum-free suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 108:600–610, 2010.
- [262] F. Bushman, M. Lewinski, A. Ciuffi, S. Barr, J. Leipzig, S. Hannenhalli, and C. Hoffmann. Genome-wide analysis of retroviral dna integration. *Nature Reviews Microbiology*, 3:848–858, 2005.
- [263] C. Demaison, K. Parsley, G. Brouns, M. Scherr, K. Battmer, C. Kinnon, M. Grez, and A.J. Thrasher. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Human Gene Therapy*, 13:803–813, 2002.
- [264] H. Reisinger, W. Steinfellner, B. Stern, H. Katinger, and R. Kunert. The absence of effect of gene copy number and mrna level on the amount of mab secretion from mammalian cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81:701–710, 2008.

- [265] S. Knappskog, H. Ravneberg, C. Gjerdrum, C. Trösse, B. Stern, and I.F. Pryme. The level of synthesis and secretion of gaussia princeps luciferase in transfected cho cells is heavily dependent on the choice of signal peptide. *Journal of Biotechnology*, 128:705–715, 2007.
- [266] X.-W. Xu, S.-J. Pei, X.-R. Miao, and W.-F. Yu. Human signal peptide had advantage over mouse in secretory expression. *Histochemistry and Cell Biology*, 132:239–246, 2009.
- [267] R.N. Bamford, A.P. DeFilippis, N. Azimi, G. Kurys, and T.A. Waldmann. The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of il-15 participate in its multifaceted translational control. *Journal of Immunology*, 160:4418–4426, 1998.
- [268] J.X. Liu, D.J. O'Kane, and A. Escher. Secretion of functional renilla reniformis luciferase by mammalian cells. *Gene*, 203:141–148, 1997.
- [269] R. Sasada, R. Marumoto, and K. Igarashi. The establishment of il-2 producing cells by genetic engineering. *Cell Structure and Function*, 12:205–217, 1988.
- [270] K. Suzuki, H. Nakazato, H. Matsui, M. Hasumi, Y. Shibata, K. Ito, Y. Fukabori, K. Kurokawa, and H. Yamanaka. Nk cell-mediated anti-tumor immune response to human prostate cancer cell, pc-3: immunogene therapy using a highly secretable form of interleukin-15 gene transfer. *Journal of Leukocyte Biology*, 69:531–537, 2001.
- [271] D.T. Rutkowski, C.M. Ott, J.R. Polansky, and V.R. Lingappa. Signal sequences initiate the pathway of maturation in the endoplasmatic reticulum lumen. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:30365–30372, 2003.
- [272] A. Helenius and M. Aebi. Intracellular functions of n-linked glycans. *Science*, 291:2364–2369, 2001.
- [273] S.M. Bahr, T. Borgschulte, K. J. Kayser, and N. Lin. Using microarray technology to select housekeeping genes in chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 104:1041–1046, 2009.
- [274] S.C.G. Brezinsky, G.G. Chiang, A. Szilvasi, S. Mohan, R.I. Shapiro, A. MacLean, W. Sisk, and G. Thill. A simple method for enriching populations of transfected cho cells for cells of higher specific productivity. *Journal of Immunological Methods*, 277:141–155, 2003.
- [275] S.M. Ngoi, A.C. Chien, and C.G. Lee. Exploiting internal ribosome entry sites in gene therapy vector design. *Current Gene Therapy*, 4:15–31, 2004.
- [276] M. López-Lastra, A. Rivas, and I.M. Barría. Protein synthesis in eukaryotes: The growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biological Research*, 38:121–146, 2005.
- [277] D. Freimark. *Entwicklung und Charakterisierung von Bioprozessen zur Produktion osteoinduktiver Wachstumsfaktoren in chinese hamster ovary Zellen*. PhD thesis, Universität Bayreuth, 2008.
- [278] N. Ferrara, J. Winer, T. Burton, A. Rowland, M. Siegel, H.S. Phillips, T. Terrell, G.A. Keller, and A.D. Levinson. Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to chinese hamster ovary cells. *Journal of Clinical Investigation*, 91:160–170, 1993.
- [279] A.M. Mercurio, E.A. Lipscomb, and R.E. Bachelder. Non-angiogenic functions of vegf in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10:283–290, 2005.
- [280] K. Góra-Kupilas and J. Josko. The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (vegf). *Folia Neuropathologica*, 43:31–39, 2005.

- [281] R.G. Keck, L. Berleau, R. Harris, and B.A. Keyt. Disulfide structure of the heparin binding domain in vascular endothelial growth factor: characterization of posttranslational modifications in vegf. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 344:103–113, 1997.
- [282] W.J. Fairbrother, M.A. Champe, H.W. Christinger, B.A. Keyt, and M.A. Starovasnik. Solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor. *Structure*, 6:637–648, 1998.
- [283] D. Gospodarowicz, J.A. Abraham, and J. Schilling. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86:7311–7315, 1989.
- [284] S.B. Lee, J.S. Park, S. Lee, J. Park, S. Yu, H. Kim, D. Kim, T.H. Bytm, K. Baek, Y.J. Ahn, and J. Yoon. Overproduction of recombinant human VEGF (vascular endothelial growth factor) in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(1):183–187, JAN 2008.
- [285] G.Y. Lee, W.W. Jung, C.S. Kang, and I.S. Bang. Expression and characterization of human vascular endothelial growth factor vegf165 in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 46:503–509, 2006.
- [286] E. Abdulkirim. *laufende Dissertation*. PhD thesis, Leibniz Universität Hannover, vorraussichtlich 2012.
- [287] Pierre Moretti. *Establishment of recombinant cell lines and characterization of primary cells for stem cell applications*. PhD thesis, Leibniz Universität Hannover, 2010.
- [288] J. Bahnemann. *Produktion von rekombinanten zytokinen in cho-zellkulturen am beispiel des human leukemia inhibitory factor*. Master's thesis, Leibniz Universität Hannover, 2009.
- [289] Magda Tomala. *Entwicklung und Anwendung von Strategien zur Expansion pluripotenter Stammzellen*. PhD thesis, Leibniz Universität Hannover, 2010.
- [290] E. Kardami, D. Spector, and R.C. Strohman. Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82:8044–8047, 1985.
- [291] R.S. Mangrulkar, M. Ono, M. Ishikawa, S. Takashima, M. Klagsbrun, and R.A. Nowak. Isolation and characterization of heparin-binding growth factors in human leiomyomas and normal myometrium'. *Biology of Reproduction*, 53:636–646, 1995.
- [292] R.R. Lobb and J.W. Fett. Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry*, 23:636–646, 1984.
- [293] M. Klagsbrun, R. Sullivan, S. Smith, R. Rybka, and Y.E. Shing. Purification of endothelial cell growth factors by heparin affinity chromatography. *Methods in Enzymology*, 147:95–105, 1987.
- [294] B.B. Samal, T. Arakawa, T.C. Boone, T. Jones, S.J. Prestrelski, L.O. Narhi, J. Wen, G.W. Stearns, C.A. Crandall, J. Pope, and S. Suggs. High level expression of human leukemia inhibitory factor (lif) from a synthetic gene in escherichia coli and the physical and biological characterization of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1260:27–34, 1995.
- [295] E.R. LaVallie, E.A. DiBlasio, S. Kovacic, K.L. Grant, P.F. Schendel, and J.M. McCoy. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the e. coli cytoplasm. *Nature Biotechnology*, 11:187–193, 1993.

- [296] M. Tomala, A. Lavrentieva, P. Moretti, U. Rinas, C. Kasper, F. Stahl, A. Schambach, E. Warlich, U. Martin, T. Cantz, and T. Scheper. Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant escherichia coli using thioredoxin as fusion partner. *Protein Expression and Purification*, 73:51–57, 2010.
- [297] T. Yoshimizu, N. Sugiyama, M. De Felice, Y. Yeom, K. Ohbo, K. Masuko, M. Obinata, K. Abe, H.R. Schöler, and Y. Matsui. Germline-specific expression of the oct-4/green fluorescent protein (gfp) transgene in mice. *Development, Growth & Differentiation*, 41:675–684, 1999.
- [298] M. Antoniou, L. Harland, T. Mustoe, S. Williams, J. Holdstock, E. Yague, T. Mulcahy, M. Griffiths, S. Edwards, P. Ioannou, A. Mountain, and R. Crombie. Transgenes encompassing dual-promoter cpg islands from the human *tbp* and *hnrpa2b1* loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing. *Genomics*, 82:269–279, 2003.
- [299] S. Williams, T. Mustoe, T. Mulcahy, M. Griffiths, D. Simpson, M. Antoniou, A. Irvine, A. Mountain, and R. Crombie. Cpg-island fragments from the *hnrpa2b1/cbx3* genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hcmv promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC Biotechnology*, 5:17–26, 2005.
- [300] H. Meents, B. Enenkel, R.G. Werner, and M. Fussenegger. p27kip1-mediated controlled proliferation technology increases constitutive sicam production in cho-dukx adapted for growth in suspension and serum-free media. *Biotechnology and Bioengineering*, 79:619–627, 2002.
- [301] S. Hu, L. Deng, H. Wang, Y. Zhuang, J. Chu, S. Zhang, Z. Li, and M. Guo. Bioprocess development for the production of mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor viii antibody c12 by suspension culture of recombinant chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology*, 63:247–258, 2011.
- [302] H.J. Fehling, G. Lacaud, A. Kubo, M. Kennedy, S. Robertson, G. Keller, and V. Kouskoff. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development*, 130:4217–4227, 2003.
- [303] Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55–63, 1983.
- [304] J. Dolbeare. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine. *The Histochemical Journal*, 28:531–575, 1996.
- [305] T.T. Puck and P.I. Marcus. A rapid method for viable cell titration and clone production with hela cells in tissue culture: The use of x-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41:432–437, 1955.
- [306] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, 1976.
- [307] S.J. Compton and C.G. Jones. Mechanism of dye response and interference in the bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151:369–374, 1985.
- [308] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76–85, 1985.
- [309] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide

- gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:4350–4354, 1979.
- [310] J. Renart, J. Reiser, and G.R. Stark. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:3116–3120, 1979.
- [311] G. Koopman, C.P. Reutelingsperger, G.A. Kuijten, R.M. Keehnen, S.T. Pals, and M.H. van Oers. Annexin v for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on b cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84:1415–1420, 1994.
- [312] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. A novel assay for apoptosis. flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin v. *Journal of immunological Methods*, 184:39–51, 1995.
- [313] K.B. Mullis and F.A. Faloona. Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335–350, 1987.
- [314] C.A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams. Real time quantitative pcr. *Genome Research*, 6:986–994, 1996.
- [315] J. Vandesompele, K. DePreter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. DePaepe, and F. Speleman. Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3:1–12, 2002.

# H Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

Name	Claas Haake
Adresse	Hausmannstr. 4, 30159 Hannover
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	14. August 1980
Geburtsort	Hannover

## **Akademische Ausbildung**

Mai 2008 - Dez. 2011	Promotion im Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
----------------------	---

Okt. 2001 - April 2008	Chemie-Studium, Leibniz Universität Hannover Abschluss: Diplom-Chemiker
------------------------	--

## **Zivildienst**

Sept. 2000 - Juli 2001	Johanniter-Unfall-Hilfe, Wunstorf
------------------------	-----------------------------------

## **Schulische Ausbildung**

1993 - 2000	Hölty-Gymnasium, Wunstorf Abschluß: Abitur
1991 - 1993	Orientierungsstufe Nord, Wunstorf
1987 - 1991	Grundschule Stadtschule, Wunstorf



# I Publikationsliste

## Paper

On-line infrared spectroscopy for bioprocess monitoring

*Applied microbiology and biotechnology*, 2010; 88(1): 11-22

D. Landgrebe, C. Haake, T. Höpfner, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper, M. Rhiel, K.F. Reardon

Moderne Bioprozessanalytik - Eine kurze Übersicht

*Biospektrum*, 2009; 6: 662-664

C. Endres, C. Haake, D. Landgrebe, S. Beutel, F. Stahl, B. Hitzmann, T. Scheper, K. Friehs

Online-Infrarotspektroskopie in der Bioprozessanalytik

*Chemie Ingenieur Technik*, 2009; 81(9): 1385-1396

C. Haake, D. Landgrebe, T. Scheper, M. Rhiel

## Buchkapitel

Disposable Sensor Systems

in: *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, Editors: R. Eibl, D. Eibl, Wiley-VCH, 2011

P. Lindner, C. Endres, A. Bluma, T. Höpfner, A. Glindkamp, C. Haake, D. Landgrebe, D. Riechers, R. Baumfalk, B. Hitzmann, T. Scheper, K.F. Reardon

## Conference Proceedings

Production and purification of a human Dll1(ECD)IgGfC fusion protein in CHO<sup>SFS</sup> cells

in: *Proceedings of the 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT)*, Dublin, Ireland, June 7-10, 2009, Editors: N. Jenkins, N. Barron, P. Alves, Springer, 2011

C. Haake, P. Moretti, J. Woiterski, F.P. Limbourg, C. Kasper, T. Scheper

Comparison of the activity and pluripotency maintaining potential of human leukemia inhibitory factor (LIF) produced in *E.coli* and CHO cells

*BMC Proceedings*, 2011; 5(Suppl 8):P109

C. Haake, S. Bonk, J. Parsieglä, M. Tomala, K. Loya, M. Sgodda, T. Cantz, A. Schambach, C. Kasper, T. Scheper



## J Danksagung

Ich danke meinen Doktorvater Prof. Thomas Scheper für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Gruppe durchführen zu können und für die Bereitstellung dieses interessanten Themas.

Ich danke Prof. Cornelia Kasper für die Übernahme des Korreferates, sowie für die wissenschaftliche Betreuung während der Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine „Vorgänger“ Pierre Moretti und Fabienne Anton deren geduldige Beantwortung aller meiner Fragen und konstante praktische Hilfestellung mir den Quereinstieg in die Zellkultur sehr erleichtert haben.

Ich danke Daniel Landgrebe für die viele Zeit und noch mehr Nerven, die er für mich vor dem FACS verloren hat und Kai-Oliver Mutz für die geduldige Hilfe bei allen Fragstellungen zur qRT-PCR, sowie Marianna Costa für die viele Hilfe bei den Reaktorkultivierungen und Martina Weiss für die konstante Unterstützung bei allen Problemen mit der FPLC.

Meinen Master- bzw. Diplomandinnen Estabraq Abdulkerim und Sophia Bonk danke ich für die vielen Beiträge die sie zu dieser Arbeit geleistet haben, es hat Spaß gemacht euch dieses Thema näher bringen zu können.

Ich danke allen Kollegen, die daran mitgewirkt haben, dass wir nicht nur ein Haufen Leute waren die zufällig im selben Institut promovieren. Die Atmosphäre hier war wirklich etwas besonderes.

Zudem danke ich Daniel Landgrebe, Pierre Moretti, Marianna Costa, Estabraq Abdulkerim und Sophia Bonk, sowie allen die sonst mal vorbeigeschaut haben für die äußerst angenehme Zusammenarbeit in „unserem“ Produktionszelllinienlabor.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung in jeder erdenklichen Weise während meines gesamten Studiums und meiner Doktorarbeit.

Anne, ich weiss nicht wie oft ich ohne dich in den letzten dreieinhalb Jahren an dieser Arbeit verzweifelt wäre. Danke, dass du immer für mich da warst. Ich liebe dich.