

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Abstract</b>	<b>3</b>
<b>3 Theorie</b>	<b>5</b>
3.1 Pharmazeutische Proteinproduktion in tierischen Zellen . . . . .	5
3.2 Von der Zelllinie zum Produktionsprozess . . . . .	8
3.2.1 Wahl der Ausgangszelllinie . . . . .	9
3.2.2 Vektor-Design und Integration . . . . .	10
3.2.3 Transfektion . . . . .	12
3.2.4 Selektion und Genamplifikation . . . . .	14
3.2.5 Klonisolation und Screening . . . . .	15
3.2.6 Prozessentwicklung . . . . .	16
3.3 Stabilität der Produktivität in Produktionszelllinien . . . . .	17
3.4 Techniken für die Zelllinienoptimierung . . . . .	18
3.5 Die RNA-Interferenz-Technologie . . . . .	21
3.5.1 Mediatoren der RNAi . . . . .	21
3.5.2 Mechanismus der siRNA- und miRNA-vermittelten RNAi . . . . .	22
3.5.3 Nutzung der RNAi-Technologie . . . . .	26
3.5.4 Strukturmerkmale von funktionalen siRNA- und shRNA-Molekülen . . . . .	30
3.6 Strategien zur Auswahl von potentiellen <i>target</i> -Genen für die Zelllinienoptimierung .	31
3.6.1 HDAC7 und SET - Mediatoren in der Histon-Modifikation . . . . .	32
3.6.2 JNK - eine Kinase aus der MAPK-Signalkaskade . . . . .	34
3.6.3 MCM5 - ein Mediator der DNA-Replikation . . . . .	35
3.6.4 Die Proliferations-Inhibitoren PDCD4 und BTG2 . . . . .	37
3.7 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	39

---

<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
4.1	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden	43
4.1.1	Verwendete Vektoren	43
4.1.2	Verwendeter Bakterienstamm	44
4.1.3	Kultivierung der TOP10 <i>E. coli</i> Zellen	44
4.1.4	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	45
4.1.5	Design der Primer-Sequenzen	46
4.1.6	Design der siRNA- und shRNA-Sequenzen	49
4.1.7	Oligonukleotid- <i>Annealing</i> der shRNA-Einzelstränge	52
4.1.8	Restriktionsspaltung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	52
4.1.9	Ligation	54
4.1.10	Hitzeschock-Transformation zum Einbringen von DNA in <i>E. coli</i> Zellen	54
4.1.11	Polymerase-Kettenreaktion	55
4.1.11.1	Klonselektion mittels Kolonie-PCR	55
4.1.11.2	PCR zum Nachweis der erfolgreichen genomischen Integration des pLVX-shRNA1 Vektors	56
4.1.11.3	PCR zur Amplifikation der <i>Set</i> -Sequenz aus CHO cDNA	56
4.1.11.4	PCR zur Evaluation der qPCR Primer	57
4.1.12	Agarosegelelektrophorese	57
4.1.13	Amplifikation und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien	59
4.1.14	Bestimmung von DNA/RNA-Konzentration und Reinheit	59
4.1.15	Sequenzierung	60
4.1.16	Transfektion von DNA in CHO Zellen mittels Nukleofektion	60
4.1.17	Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen	61
4.1.18	DNase Verdau	62
4.1.19	cDNA Synthese	63
4.1.20	Extraktion von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	63
4.1.21	Quantitative <i>real-time</i> PCR	64
4.2	Zellkultur	67
4.2.1	Zelllinien	67
4.2.2	Verwendete Kulturmedien	68
4.2.3	Kryokonservierung	68
4.2.4	Bestimmung von Zellzahl und Viabilität	69
4.2.5	Kultivierung der CHO DP-12 Zellen	70
4.2.5.1	Schüttelkolbenkultivierung und Wachstumsvergleiche	70
4.2.5.2	Bioreaktorkultivierung der CHO DP-12 Zellen	71

---

4.2.6	Kultivierung der CHO DG-44 Zellen . . . . .	73
4.2.7	Kultivierung der HEK293FT Zellen . . . . .	73
4.2.8	Lentiviraler Gentransfer . . . . .	74
4.2.8.1	Produktion von Lentiviren in HEK293FT Zellen . . . . .	74
4.2.8.2	Infektion von CHO DP-12 Zellkulturen mit Lentiviren . . . . .	76
4.3	Analytik . . . . .	77
4.3.1	Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentration . . . . .	77
4.3.2	Aminosäureanalytik . . . . .	77
4.3.3	Produktanalytik . . . . .	78
4.3.4	Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung des Anteils an GFP-positiven Zellen . . . . .	78
4.3.5	Analyse der differentiellen Genexpression mittels CHO cDNA <i>microarray</i> . . . . .	79
4.4	Berechnungen . . . . .	81
4.4.1	Berechnung der spezifischen Wachstumsrate . . . . .	81
4.4.2	Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate . . . . .	82
4.4.3	Berechnung der spezifischen Substratraten . . . . .	82
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>83</b>
5.1	Evaluation potentieller Zielgene für die Zelllinienentwicklung . . . . .	83
5.1.1	siRNA-Design, shRNA-Konstruktion und Auswahl von shRNA-Vektoren . . . . .	84
5.1.2	Transiente Transfektion der CHO DP-12 Zellen mit einem shRNA Konstrukt . . . . .	85
5.1.2.1	Ermittlung der optimalen Nukleofektionsparameter für CHO DP-12 Zellen . . . . .	85
5.1.2.2	Test der qPCR-Primer für die untersuchten Zielgene . . . . .	86
5.1.2.3	Evaluation des transienten siRNA- <i>knockdowns</i> der Zielgene in CHO DP-12 Zellen . . . . .	87
5.1.3	Stabile Transduktion der CHO DP-12 Zellen mit einem shRNA Konstrukt . . . . .	95
5.1.3.1	Ermittlung der optimalen Puromycin-Konzentration für die Selektion . . . . .	96
5.1.3.2	Puromycin-Selektion stabil transduzierter CHO DP-12 Zellen . . . . .	97
5.1.3.3	Nachweis der genomischen Integration des shRNA-Vektors mittels PCR . . . . .	102
5.1.3.4	Nachweis des stabilen Gen- <i>knockdowns</i> in transduzierten Zellpools . . . . .	104
5.1.4	Wachstumsvergleiche von stabil transduzierten CHO DP-12 Zellpools . . . . .	108
5.1.4.1	Batch-Kultivierungen der stabil transduzierten CHO DP-12 Zellpools . . . . .	108

5.1.4.2	Fed-Batch-Kultivierungen der stabil transduzierten CHO DP-12 Zellpools . . . . .	115
5.1.5	Zusammenfassende Diskussion . . . . .	131
5.2	Evaluation der Stabilität von CHO-Zellen hinsichtlich ihrer Produktivität . . . . .	140
5.2.1	Langzeitkultivierung von CHO DG-44 Zellen in verschiedenen Medien . . . . .	140
5.2.2	Wachstumsvergleich von CHO DG-44 Zellen mit unterschiedlicher Passagenzahl . . . . .	142
5.2.3	Nachweis der Produktgene auf Genom-Ebene mittels qPCR . . . . .	146
5.2.4	Nachweis der Produktgene auf Transkript-Ebene mittels qPCR . . . . .	148
5.2.5	Zusammenfassende Diskussion . . . . .	150
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick</b>	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>i</b>
8.1	Einheiten und Abkürzungen . . . . .	i
8.2	Glossar der englischen Begriffe . . . . .	vi
8.3	Verwendete Internet-Datenbanken und <i>Online-Tools</i> . . . . .	viii
8.4	In CHO-Zellen produzierte Biopharmazeutika . . . . .	ix
8.5	Genotyp des <i>E. coli</i> TOP10 Stammes . . . . .	ix
8.6	Zelllinienoptimierung durch Überexpression von Zielgenen . . . . .	x
8.7	Bioreaktorkultivierung von CHO DP-12 Zellen unter Butyrat-Zugabe . . . . .	xi
8.8	CHO cDNA <i>microarray</i> -Experiment von Butyrat-behandelten CHO DP-12 Zellen . . . . .	xiii
8.9	Sequenzierung der CHO-spezifischen Sequenz für das Zielgen <i>Set</i> . . . . .	xviii
8.10	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen . . . . .	xix
8.11	Substratkonzentrationen in der Fed-Batch-Kultivierung 1 . . . . .	xx
8.12	Sequenzen der shRNA-Oligonukleotide . . . . .	xx
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xxii</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xxv</b>
<b>11</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>xxvii</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>xxxii</b>