

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Herstellung von rekombinanten Biotherapeutika durch Säugetierzellen	3
2.2 Zelllinie AGE1.HN, α 1-Antitrypsin	5
2.3 Der Zentralstoffwechsel bei eukaryotischen Zellen	7
2.4 Systembiologische Ansätze	10
2.5 Proteomanalysen: 2D-Gelelektrophorese, Quantifizierung von Proteinen	13
2.6 Massenspektrometrie zur Proteinidentifikation	16
2.7 Organellfraktionierung zur Proteomanalytik	17
2.8 Ziel der Arbeit	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Kultivierung	21
3.1.1 Zelllinie AGE1.HN	21
3.1.2 Kryokonservierung, Auftauen der Zellen und Vorkulturhandling	21
3.1.3 Kultivierung im Bioreaktor	22
3.1.4 Prozessbegleitende Analytik	24
3.2 Proteom-Analysen	27
3.2.1 Isolierung von Mitochondrien aus AGE1.HN-Zellen	27
3.2.2 Proteinextraktion, -quantifizierung und Acetonfällung	29
3.2.3 2D-DIGE - erste Dimension	29
3.2.4 2D-Gelelektrophorese	31
3.2.5 Auswertung der 2D-Gele mit Delta2D-Software	33
3.2.6 Proteinidentifizierung	34
4 Ergebnisse und Diskussion	39
4.1 Kultivierungen	39
4.1.1 Zentralexperimente	40
4.1.2 Experimente mit Temperaturshift	50

4.2	Proteomanalysen	72
4.2.1	2D-Experimente	72
4.2.2	Quantitative Analyse der Proteinexpression, hierarchisches Clustering	75
4.2.3	Proteinexpression und Flussraten des Zentralstoffwechsels	104
4.3	Fazit und Ausblick	119
5	Literaturverzeichnis	i
6	Anhang	xxi
6.1	Kultivierung	xxi
6.1.1	PBS-CMF	xxi
6.2	Proteomics	xxi
6.2.1	Zellaufschluss	xxi
6.2.2	2D-Gelelektrophorese	xxii
6.2.3	Proteinidentifizierung	xxiv
6.3	Ergebnisse	xxvi
6.3.1	Vergrößerte Darstellung der mitochondrialen 2D-Proteomkarte	xxvi
6.3.2	Auflistung der identifizierten Proteinspots aus mitochondrialer Fraktion nach 2D-Gelelektrophorese	xxxii
6.3.3	Regulation des Zentralstoffwechsels: Spotintensitäten der TCA-Enzyme	lvii
6.4	Abkürzungsverzeichnis	lxi
6.5	Danksagungen	lxv
6.6	Erklärung	lxvi