

INHALTSVERZEICHNIS

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
II	EINLEITUNG	3
1	CRICETULUS GRISEUS – DER CHINESISCHE HAMSTER	5
2	DIE CHO-ZELLINIE	7
2.1	Historie der CHO-Zelllinien	7
2.2	Biotechnologische Relevanz der CHO-Zelllinien	8
2.3	Industrielle Relevanz der CHO-Zelllinien	9
2.4	Insulin und „Insulin-like growth factor 1“	11
2.4.1	Insulin	11
2.4.2	„Insulin-like growth factor 1“	13
2.4.3	Long [®] R ³ – ein IGF-1 Analog	15
3	SEQUENZDATENLAGE DER CHO-ZELLINIEN	17
4	TRANSKRIPТОMIK VON CHO-ZELLINIEN	21
5	MICROARRAY TECHNOLOGIE	27
5.1	Das DNA-Microarray Funktionsprinzip	28
5.2	Sondendesign	29
5.3	Fluoreszenzmarkierung, Hybridisierung und Auswertung . .	31
III	ZIELSETZUNG	37
	Zielsetzung	38
IV	ERGEBNISSE & DISKUSSION	41
6	ERSTE CHO-cDNA-SEQUENZIERUNG	43
6.1	Erstellung des ersten cDNA-Datensatzes aus CHO-Zelllinien .	43
6.1.1	Sequenzierung der CHO-K1 und DUKXB11-Zelllinien	43
6.1.2	Assemblierung der Sequenzdaten der CHO-Zelllinien	46
6.2	Analyse der Assemblierung des ersten Datensatzes	48
6.3	Phylogenetische Auswertung des Transkriptoms	51
6.4	Vollständigkeit der Transkripte der CHO-Zelllinien	54
6.5	Detektion von Isoformen	56
6.6	Rekonstruktion wichtiger Stoffwechselwege	58
6.6.1	Rekonstruktion des Zentralstoffwechselwegs	59
6.6.2	Rekonstruktion der N-Glykosylierung	63

7	ERSTES CHO-ZELLINIEN MICROARRAY	67
7.1	Entwicklung des CHO _{V1} Microarrays	67
7.2	Validierung des CHO _{V1} Microarrays	70
7.3	Anwendung des CHO _{V1} Microarrays	77
8	ZWEITE CHO-cDNA-SEQUENZIERUNG	79
8.1	Erstellung des zweiten cDNA-Datensatzes einer CHO-Zelllinie	79
8.1.1	Sequenzierung der CHO-K ₁ (IgG) Zelllinie	80
8.1.2	Assemblierung der Sequenzdaten der CHO-K ₁ Zelllinie	80
8.2	Vergleich mit vorhandenen Sequenzdaten	84
8.3	Funktionale Analyse des zweiten Transkriptoms	85
8.4	Vervollständigung der Stoffwechselwegrekonstruktionen . . .	88
8.4.1	Vervollständigung des Zentralstoffwechselwegs	89
8.4.2	Vervollständigung der N-Glykosylierung	90
9	ZWEITES CHO-ZELLINIEN MICROARRAY	93
9.1	Entwicklung des CHO _{41K} Microarrays	93
9.1.1	Generierung eindeutiger repräsentativer Sequenzen	93
9.1.2	Sondendesign	94
9.2	Validierung des CHO _{41K} Microarrays	97
9.3	Expressionsumfang der CHO-Zelllinie	102
10	GENEXPRESSIONSSTUDIE MIT DEM CHO _{41K} MICROARRAY	105
10.1	Kultivierung unter Einfluss wachstumsfördernder Substanzen	105
10.2	Einfluss von Insulin und Long [®] R ³	107
10.2.1	Einfluss von Insulin auf das Transkriptom	109
10.2.2	Einfluss von Long [®] R ³ auf das Transkriptom	114
10.2.3	Effekte auf Zellgröße und Produktmenge	119
10.3	Validierung der Microarrayergebnisse mittels qRT-PCR	122
V	MATERIAL & METHODEN	127
11	ZELLKULTUR	129
11.1	Kultivierungen der CHO-Zelllinien	129
11.1.1	Kultivierung der CHO-K ₁ Zelllinie (Bielefeld/BI) . . .	129
11.1.2	Kultivierung der CHO-K ₁ Zelllinie (Wien/WI)	130
11.1.3	Kultivierung der CHO-DUKXB ₁₁ Zelllinie (Wien/WI)	130
11.1.4	Kultivierung der CHO-K ₁ (IgG) Zelllinie	131
11.1.5	Kultivierung mit wachstumsfördernden Substanzen .	132
11.2	Bestimmung der Zellzahl und des Zelldurchmessers	132
11.3	Analytik	133
11.3.1	Messung der Glukose- und Laktatkonzentration	133

11.3.2	Aminosäureanalytik	134
11.3.3	Messung der Antikörperkonzentration	135
12	RNA-ISOLATION	137
12.1	RNA-Isolation mittels TriZol-Reagenz	137
12.2	RNA-Isolation durch Vertis Biotechnologie AG	138
12.3	RNA-Isolation mittels Macherey-Nagel-Kit	139
13	NEXT-GENERATION-SEQUENZIERUNG	141
13.1	454-Pyrosequenzierung	141
13.2	Illumina-Sequenzierung	142
14	ASSEMBLIERUNG	143
14.1	Assemblierung der Sequenzdaten der ersten Sequenzierung .	143
14.2	Assemblierung der Sequenzdaten der zweiten Sequenzierung	143
14.2.1	Konstruktion der u80-Metrik	144
15	SEQUENZANALYSE	145
15.1	Phylogenie	145
15.2	Analyse der Transkripte und ihrer Isoformen	146
15.3	Funktionale Analyse	146
15.4	Rekonstruktion von Stoffwechselwegen	147
15.5	DAVID-Analyse	147
16	CHOV1 UND CHO41K MICROARRAY	149
16.1	Generierung eindeutiger repräsentativer Sequenzen	149
16.2	Sondendesign	149
16.2.1	Sondendesign für das CHOV1 Microarray	149
16.2.2	Sondendesign für das CHO41K Microarray	150
16.3	Erstellung des <i>In-silico</i> -Microarrays	151
16.4	Fluoreszenzmarkierung, Hybridisierung, Signaldetektion . .	152
16.4.1	Zweifarbmarkierung	152
16.4.2	Einfarbmarkierung	152
16.4.3	Hybridisierung, Signaldetektion, Datenverwaltung . .	153
16.5	Auswertung der Microarraydaten	153
16.5.1	Auswertung der CHOV1 Microarraydaten	154
16.5.2	Auswertung der CHO41K Microarraydaten	154
17	qRT-PCR	157
VI	AUSBLICK	161
18	AUSBLICK	163

VII ANHANG	165
A ANHANG	167
A.1 Anhang zur zweiten Sequenzierung	167
A.2 Anhang zum CHO _{41K} Microarray	169
LITERATURVERZEICHNIS	172
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	188
TABELLENVERZEICHNIS	189