

Optimierung und Anwendung von Strategien zur Herstellung von TGF- β 1 in eukaryotischen Zellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Chem. Estabraq Abdulkerim

geboren am 19. Juli.1981 in Kuwait-City

2014

Referent
Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferentin
Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Kasper

Tag der Promotion: 22. Januar 2014

Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper möchte ich herzlich für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen, sowie die durchgehende Unterstützung bedanken.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich herzlich Frau Prof. Dr. Cornelia Kasper. Danke für das große Vertrauen und das Interesse an meiner Arbeit und nicht zuletzt für die hilfreichen Korrekturen.

Bei Dr. Jürgen Alves möchte ich mich für die Bereiterklärung zum Drittprüfer herzlich bedanken. Herrn Prof. Dr.-Ing. Karl-Heinz Bellgardt danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission. Herr Dr. Frank Stahl möchte ich für die hervorragende fachliche Unterstützung und seine durchgehende Hilfsbereitschaft bedanken. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. Axel Schambach für die freundliche Zusammenarbeit.

Für die genaue und kritische Korrektur meiner Arbeit bedanke ich mich ganz besonders bei Sophia Bonk und Dr. Johanna Walter sowie Dr. Kai Mutz und Dr. Patrick Jonczyk. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie möchte ich für das angenehme Miteinander, die große Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima danken. Besonderer Dank gilt Sabrina Baganz für die hervorragenden Ergebnisse und sehr nette Zusammenarbeit, vielen Dank Sabrina!

Dr. Antonina Lavrentieva möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die motivierenden Worte danken: Liebe Tonya danke für deine Unterstützung und ich bin sehr froh dich zu kennen.

Rebecca was hätte ich ohne Dich gemacht. Ich danke dir von Herzen für deine enthusiastische und fachliche Unterstützung. In vielen Fragen des Laboralltags wie auch in vielen fachlichen Fragen bei der Erstellung der Arbeit konnte ich mich auf deine Unterstützung verlassen, wann immer ich sie benötigte. Danke für deine Freundschaft. Ich hoffe du weißt, wie froh ich bin, dass es dich gibt und freue mich auf viele gemeinsame entspannte Momente ohne Zeitdruck!

Danksagung

Ein großes Dankeschön geht an meine lieben Eltern und Schwestern. Durch ihre Unterstützung und ständige Motivation waren sie zu jeder Zeit ein großer Rückhalt für mich. Ich konnte mich immer auf Sie verlassen und sie haben immer an mich geglaubt. Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei der Familie Dreimann für die Unterstützung und die sehr viele schöne Momente bedanken.

Janis was du für mich getan hast, lässt sich mit wenigen Sätzen nicht ausdrücken. Ohne deine Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht geschafft. Danke, dass du an mich geglaubt hast, danke dass du mich an schlechten Tagen ertragen hast. Ich hoffe du weißt wie froh ich bin dich zu haben, Danke!

Zusammenfassung

Die Herstellung von *in vitro* gezüchtetem Gewebe aus Stammzellen stellt im *Tissue Engineering* eine wesentliche Herausforderung dar. Der dadurch bestehende Bedarf an Stammzellen in großen Mengen und ausreichender Qualität erfordert die Entwicklung und Etablierung kontrollierbarer Bioprozesse zur *in vitro*-Expansion und Differenzierung dieser Art von Zellen. In diesem Zusammenhang spielt neben physikalischen und mechanischen Einflüssen die Wirkung von biologisch hochaktiven Substanzen, sogenannten Wachstumsfaktoren, eine entscheidende Rolle. Wachstumsfaktoren sind regulatorische Proteine, die ihre Zielzellen zur Proliferation anregen. Darüber hinaus bewirken sie auch die Zelldifferenzierung, die Migration von Zellen und die Synthese anderer Wachstumsfaktoren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Prozess zur rekombinanten Herstellung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 unter Verwendung von eukaryotischen Zellen im Labormaßstab etabliert. Dafür wurden zunächst die Transfektionsmethoden und Expressionsvektoren für die verwendeten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zelllinie) und Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1-Zelllinie) optimiert und etabliert. Darüber hinaus wurden die Zellen der adhärenenten HEK293-Zelllinie an serumreduzierte Bedingungen und Kultivierung in Suspension adaptiert. Nach der Klonierung eines Expressionsvektors mit TGF- β 1 als Zielgen erfolgte eine Transfektion der CHO-K1 Zellen und der adaptierten HEK293-Zellen. Die TGF- β 1 Produktion gelang in den transfizierten HEK293-Zellen. Aufgrund des geringen Wachstums der Zellen während der Transfektion konnten jedoch nur niedrige Produkttitel erzielt werden. Das TGF- β 1 konnte ebenfalls von CHO-K1 Zellen erfolgreich produziert und sekretiert werden. Nach der Aufreinigung des TGF- β 1 mittels Affinitätschromatographie wurde unter Verwendung von A549 Zellen die biologische Aktivität des hergestellten und aufgereinigten TGF- β 1 erfolgreich nachgewiesen.

Schlagworte: Wachstumsfaktoren, TGF- β 1, rekombinante Proteine, transiente Transfektion

Abstract

The Production of in vitro generated tissue derived from stem cells poses a significant challenge in the field of tissue engineering. The resulting need of stem cells in high quantity and quality requires the development of standardized and reproducible bioprocesses for the in vitro expansion and differentiation of these types of cells. In this context, besides physical and mechanical influences, the effect of biological highly active substances, so-called growth factors, plays a crucial role. Growth factors are regulatory proteins that stimulate the target cells to proliferate. In addition, they induce cell differentiation, the migration of cells and the production of other growth factors.

The presented work, a process for the recombinant production of the growth factor TGF- β 1 using eukaryotic cells on a laboratory scale has been established. Therefore, the transfection method and the expression vectors for the human embryonic kidney cells (HEK293 cell line) and Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 cell line) were optimized and established. In addition, the adherent HEK293 cells were adapted to serum-reduced conditions and cultivation in suspension. After cloning an expression vector with TGF- β 1 as a target gene, a transfection of the CHO-K1 cells and the adapted HEK293 cells was carried out. The production of TGF- β 1 was achieved in the transfected HEK293 cells. However, due to the low growth rates during the transfection, only low product titers could be achieved. TGF- β 1 was also successfully produced and secreted by the CHO-K1 cells.

After the purification of the TGF- β 1 by affinity chromatography, the bioactivity of the produced TGF- β 1 was successfully determined by a cell based bioactivity assay.

Keywords: growth factors, TGF- β 1, recombinant proteins, transient transfection

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Zusammenfassung.....	V
Abstract.....	VI
Inhaltsverzeichnis.....	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
TABELLENVERZEICHNIS	XV
ABKÜRZUNGEN	XVI
1 EINLEITUNG.....	1
2 AUFGABENSTELLUNG	3
3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
3.1 Die transformierenden Wachstumsfaktoren- β (TGF- β)	4
3.2 Isoformen des TGF- β	5
3.3 TGF- β -Rezeptor-Komplexbildung	7
3.4 Signaltransduktion	9
3.4.1 Smad-abhängige Signaltransduktion.....	9
3.4.2 Smad-unabhängige Signaltransduktion	11
3.5 Physiologische Bedeutung des TGF- β 1.....	11
3.6 Produktion rekombinanter Proteine in Säugerzellen	12
3.6.1 Transiente Transfektion	13
3.6.1.1 Lipidvermittelte Transfektion	15
3.6.1.2 Polymervermittelte Transfektion	16
4 EXPERIMENTELLER TEIL	18
4.1 Transiente Transfektion mittels pEGFP-Plasmid	19
4.1.1 Amplifikation des pEGFP-N1-Plasmides	20
4.1.2 Lipidvermittelte Transfektion	20

4.1.3	Polymervermittelte Transfektion	22
4.1.4	Fazit.....	24
4.2	Transfektion der HEK293-Zellen zur Produktion des TGF- β 1	25
4.2.1	Amplifikation des pRRL PPT SF TGF- β 1-Plasmids	26
4.2.2	Transiente Transfektion per PEI	28
4.2.3	Stabile Transfektion per lentiviraler Transduktion	29
4.2.4	Lokalisierungs- und Expressionsnachweis	30
4.2.5	Fazit.....	37
4.3	Strategien zur Entwicklung eines neuen Expressionssystems	38
4.3.1	Konstruktion des Expressionsvektors pOSG-102-TGF- β 1.....	39
4.3.1.1	Amplifikation des TGF- β 1 mittels PCR	42
4.3.1.2	Generierung des Donorvektors pENTRY-IBA-51-TGF- β 1 ...	43
4.3.1.3	Generierung des Zielvektors pOSG-IBA-102-TGF- β 1	47
4.3.2	Fazit.....	48
4.4	HEK293-Zellen (human embryonic kidney)	49
4.4.1	Adaption an Kultivierung in Suspension	49
4.4.2	Adaption an serumreduzierte Kultivierung.....	51
4.4.3	Transfektion der adaptierten Zellen	53
4.4.4	Fazit.....	55
4.5	CHO-K1 (Chinese hamster ovary).....	56
4.5.1	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens.....	56
4.5.2	Transiente Transfektion der CHO-K1 Zellen	57
4.5.3	Transfektion der Zellen mit dem pOSG-102-IBA-TGF-b1-Plasmid....	58
4.5.4	Expressionsnachweis	60
4.5.5	Aufreinigung des TGF- β 1	61
4.5.6	Testung der biologischen Aktivität von TGF- β 1	63
4.5.6.1	Indirekte Messung der A549 Proliferation in Anwesenheit von TGF- β 1.....	64

4.5.6.2	Direkte Messung der A549 Proliferation in Anwesenheit von TGF- β 1	65
4.5.7	Fazit.....	67
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	69
A.	Material	73
A.1	Verbrauchsmaterialien	73
A.2	Geräte	74
A.3	Chemikalien	75
A.4	Biomoleküle, Kits und Fertigmedien	77
A.4 .1	Antikörper	77
A.4.2	Primer.....	78
A.5	Puffer.....	78
A.6	Medien.....	80
A.7	Software	81
A.8	Bakterienstämme und Zelllinien	82
A.8.1	Bakterienstämme.....	82
A.8.2	Zelllinien	82
B.	Methoden.....	83
B.1	Zellkulturmethoden.....	83
B.1.1	Kultivierung von CHO-Suspensionszellen	83
B.1.2	Kryokonservierung.....	83
B.1.3	Revitalisierung	83
B.1.4	Kultivierung von adhärenenten HEK293-Zellen	84
B.1.5	Kultivierung von HEK293-Suspensionszellen	84
B.1.6	Adaption von adhärenenten HEK293-Zellen zu Suspensionszellen	84
B.1.7	Adaption von HEK293-Suspensionszellen an serumreduzierte Kultivierungsbedingungen	84
B.1.8	Kultivierung von A549 Zellen	85

B.1.9	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mit Neubauer-Zählkammer	85
B.1.10	Cell Titer Blue-Assay.....	86
B.1.11	Transfektion mit Lipofectamin.....	86
B.1.12	Transfektion mit TurboFect	87
B.1.13	Transfektion mit GeneJuice	87
B.1.14	Transfektion mit Metafectene	87
B.1.15	Transfektion mit Polyethylenimin	88
B.1.16	Zellaufschluss mittels Ultraschall	89
B.1.17	Calcein-AM-Färbung.....	89
B.2	Proteinchemische Methoden	89
B.2.1	TCA-Fällung	89
B.2.2	Densitometrie	90
B.2.3	SDS-PAGE.....	90
B.2.4	Silberfärbung.....	90
B.2.5	Coomassie-Färbung.....	91
B.2.6	SemiDry Western Blot und Immunodetektion.....	91
B.2.7	Proteinquantifizierung mittels ELISA.....	92
B.2.8	Proteinquantifizierung mittels Nanodrop.....	92
B.3	Mikrobiologische Methoden	93
B.3.1	Bakterientransformation.....	93
B.3.2	Kultivierung von E.coli zur Vektoramplifikation	93
B.4.	Durchflusszytometrische Methode.....	93
B.4.1	Intrazelluläre Färbung	93
B.4.2	Messung der Expressionsstärke von EGFP.....	94
B.5	Molekularbiologische Methoden.....	94
B.5.1	RNA-Isolierung.....	94
B.5.2	cDNA-Synthese.....	95

B.5.3 Polymerase Kettenreaktion	96
B.5.4 Agarosegel-Elektrophorese	98
B.5.5 Plasmidpräparation	98
B.5.6 Enzymatische Spaltung von DNA.....	98
B.5.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli mittels Midi Kit	99
B.5.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli mittels Megaprep.....	100
B.5.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	100
B.5.10 DNA-Sequenzierung	101
B.5.11 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	101
B.5.12 Klonierung nach dem StarGate Cloning System.....	102
B.6 Chromatographische Methoden	102
B.6.1 Aufreinigung des TGF- β 1	102
C. Übersicht der betreuten Arbeiten.....	104
LITERATURVERZEICHNIS.....	105
Lebenslauf.....	112
Puplikationsliste	113

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.1 Darstellung der latenten Formen von TGF- β	6
Abbildung 3.2 Modell des TGF- β 1 zur Darstellung der <i>cystine knot</i> -Struktur.	7
Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der TGF- β -Rezeptoren Typ I und Typ II.	8
Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Signaltransduktion der TGF- β -Rezeptoren	10
Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der transienten und stabilen Transfektion. ...	14
Abbildung 3.6 Schematischer Ablauf der Lipofektion	16
Abbildung 4.1 Vektorkarte des verwendeten pEGFP-N1-Plasmids.....	19
Abbildung 3.2 Agarosegel der Amplifikation des EGFP-Gens.	20
Abbildung 4.3 Mikroskopische Aufnahmen von pEGFP-N1-transfizierten HEK 293- Zellen mittels Metafectene und Lipofectamin.....	21
Abbildung 4.4 GFP-Fluoreszenzintensität der mit pEGFP-N1-transfizierten HEK293- Zellen mittels Metafectene und Lipofectamin.....	22
Abbildung 4.5 Mikroskopische Aufnahmen von pEGFP-N1-transfizierten HEK293- Zellen mittels PEI.....	23
Abbildung 4.6 GFP-Fluoreszenzintensität der mit pEGFP-N1-transfizierten HEK293- Zellen mittels PEI.	24
Abbildung 4.7 Schematische Karte des TGF- β 1-Vektors	26
Abbildung 4.8 Agarosegel der Temperaturoptimierung.	27
Abbildung 4.9 Agarosegelanalyse der Amplifikation des TGF- β 1-Gens.....	28
Abbildung4.10 Mikroskopische Aufnahmen mit TGF- β 1-Plasmid transfizierten HEK293-Zellen mittels PEI.	28
Abbildung 4.11 Ergebnisse der DNA-Isolierung aus den lentiviral transduzierten HEK293-Zellen	30
Abbildung 4.12 Ergebnisse des Western Blots der Zellaufschlüsse und Kultivierungsüberstände der lentiviral transduzierten HEK293T-Zellen.	31

Abbildung 4.13 Ergebnis des Western Blots der Zellaufschlüsse nach der lentiviralen Transduktion der CHO ^{SFS} -Zellen	33
Abbildung 4.14 Ergebnis des Western Blots der aufkonzentrierten Überstände nach der lentiviralen Transduktion der CHO ^{SFS} -Zellen	34
Abbildung 4.15 Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der TGF-β1 positiven Zellen für die Zelllinien CHO-TGF-β1 ¹⁰⁰ und CHO-TGF-β1 ²⁵⁰	35
Abbildung 4.16 Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der TGF-β1 positiver Zellen der durchgeführten Kultivierung für CHO-TGF-β1 ²⁵⁰	36
Abbildung 4.17 Ergebnisse des Western Blots der durchgeführten Kultivierung für CHO-TGF-β1 ²⁵⁰ ..	36
Abbildung 4.18 Schematische Darstellung der Generierung des Donorvektors.....	40
Abbildung 4.19 Schematische Darstellung der Generierung des Zielvektors	41
Abbildung 4.20 Schematischer Aufbau eines pOSG-IBA-120 Vektors.....	42
Abbildung 4.21 Agarosegel des Optimierungsexperiments für 10 ng Template und 35 Zyklen.....	43
Abbildung 4.22 Amplifikation des TGF-β1-Gens mittels PCR unter optimierten Bedingungen.....	43
Abbildung 4.23 Vektorkarte des Eingangsvektors pENTRY-51.....	44
Abbildung 4.24 Analytischer Restriktionsverdau der aufgereinigten Plasmide.	45
Abbildung 4.25 Alignment der Nukleinsäuresequenzen von positiven Klone.....	46
Abbildung 4.26 Schematische Darstellung der Transformation des Zielvektors pOSG-IBA-102-TGF-β1.....	47
Abbildung 4.27 Analytischer Restriktionsverdau des aufgereinigten TGF-β1-Zielpasmids	48
Abbildung 4.28 Vereinfachte Darstellung der Expressionsregion des Zielvektors	48
Abbildung 4.29 Lichtmikroskopische Aufnahmen der HEK293-Zellen vor und während der Adaption an Suspensionsbedingungen.....	50
Abbildung 4.30 Charakterisierung von HEK293-Zellen kultiviert im Schüttelkolben und in der T-Flasche	50

Abbildung 4.31 Charakterisierung von HEK293-Zellen kultiviert mit unterschiedlichen Serumanteilen	52
Abbildung 4.32 Mikroskopische Aufnahmen mittels PEI mit TGF- β 1-Plasmid transfizierter HEK293-Zellen.....	53
Abbildung 4.33 Ergebnis des Western Blots der Überstände während der sechs Tage Kultivierung der adaptierten HEK293-Zellen.	54
Abbildung 4.34 Lebendzellzahl und Vitalität der CHO ^{SFS} -Zelllinie und der CHO-K1-Zelllinie.....	57
Abbildung 4.35 Mikroskopische Aufnahmen von pEGFP-N1-transfizierten CHO-K1-Zellen.....	58
Abbildung 4.36 Western Blots der Überstände der transienten Transfektion der CHO-K1-Zellen mittels PEI mit dem TGF- β 1-Plasmid.	60
Abbildung 4.37 Schematische Darstellung der Proteinaufreinigung mittels Twin-strep-tag.	61
Abbildung 4.38 Darstellung des Aufbaus des WET FRED-Systems zur Aufreinigung von Kulturüberständen.	62
Abbildung 4.39 Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (15%) der TGF- β 1-Aufreinigung	63
Abbildung 4.40 Ergebnis des CTB-Tests der A-549 Proliferation zur Testung der Bioaktivität des TGF- β 1.	65
Abbildung 4.41 Proliferation von A-549 Zellen während der Kultivierung mit und ohne TGF- β 1.	66
Abbildung 4.42 Lichtmikroskopische Aufnahmen von A-549 Zellen während der Kultivierung mit und ohne TGF- β 1.....	67
Abbildung 4.43 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Calzein-Zellfärbung der A-549 Zellen.....	67

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1 Kombination der TGF- β -Rezeptoren Typ I und Typ II	8
Tabelle 3.2 Gruppen der Smad-Familie und ihre Funktionen	10
Tabelle 4.1 Darstellung der Arbeitsschritte zur Serumanteilreduzierung für die Kultivierung von HEK293-Zellen.....	52
Tabelle 4.2 Übersicht der getesteten Varianten zur transienten Transfektion der CHO-Zellen bezüglich der Transfektionsmethode	58
Tabelle 4.3 Übersicht der getesteten Varianten zur transienten Transfektion der CHO-Zellen bezüglich der Komplexbildung und der Inkubationszeit.	59
Tabelle 4.4 Übersicht über die als optimal getesteten Variante für die transiente Transfektion der CHO-K1-Zellen.	61

ABKÜRZUNGEN

ALK	engl. activin receptor like kinase
BHK	engl. baby hamster kidney
BMP	engl. bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
BSA	engl. bovine serum albumine
cDNA	engl. complementary DNA
CHO	engl. chinese hamster ovary
CTB	engl. Cell Titer Blue (Assay)
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	engl. dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	engl. deoxyribonucleotide triphosphates
DTT	Dithiothreitol
DOPE	Diioleoylphosphatidylethanolamin
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECM	engl. extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	engl. enhanced green fluorescent protein
ERK	engl. extracellular signal regulated kinase
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	engl. fibroblast growth factor
FPLC	engl. fast protein liquid chromatography
GDF	engl. growth differentiation factors
GOI	engl. gene of interest

ABKÜRZUNGEN

HA	Hämagglutinin
HEK	engl. human embryonic kidney
His	Histidin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
JNK	engl. jun N-terminal kinase
LAP	engl. latency associated peptide
LTBP	engl. latent TGF- β binding protein
MAPK	engl. mitogen activated protein kinase
MIS	engl. müllerian inhibiting substance
HIV	humans Immundefizientvirus
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	engl. revolutions per minute
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
TCA	engl. trichloroacetic acid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	engl. transforming growth factor
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor

1 EINLEITUNG

In Zeiten, in denen die Anzahl an Organspendern bei gleichzeitig steigendem Bedarf an Spenderorganen immer geringer wird, bietet das *Tissue Engineering* eine höchst interessante Alternative. Die Herstellung von *in vitro* gezüchtetem Gewebe ermöglicht eine Entspannung des Transplantationsmarktes. Erste Erfolge wurden bereits bei der Herstellung von Knochen- und Knorpelgewebe mit 3D-Druckern erzielt. Grundlage für die Produktion artifizieller Gewebe sind Stammzellen, deren Differenzierbarkeit (bei embryonalen Stammzellen) zu nahezu allen Zelltypen nachgewiesen ist. Aus diesem Grund besteht ein enormer Bedarf, diese Art von Zellen genau zu untersuchen und kontrollierbare Bioprozesse zur *in vitro*-Expansion zu entwickeln. Dabei sind Fragestellungen bezüglich des Einflusses von physikalischen und mechanischen Stressfaktoren, sowie der Wirkung von biologisch hochaktiven Substanzen, sogenannten Wachstumsfaktoren, auf die Differenzierung der Zellen besonders interessant. Wachstumsfaktoren, die eine Untergruppe der Zytokinfamilie darstellen, sind regulatorische Proteine, die ihre Zielzellen zur Proliferation anregen. Darüber hinaus bewirken Wachstumsfaktoren auch die Zelldifferenzierung.

Eines der wichtigsten Zytokine in diesem Zusammenhang ist der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β 1). TGF- β 1 zählt zur TGF- β -Superfamilie. Alle Vertreter dieser Familie sind multifunktionale Zytokine, d.h. transformierende Wachstumsfaktoren, die zahlreiche zelluläre Prozesse in einer kontextabhängigen Weise regulieren können.

Aufgrund ihres hohen Bedarfs, werden diese Zytokine rekombinant produziert. Dies kann durch die Transfektion von Zellen eines geeigneten Expressionssystems mit dem Gen des Zielzytokins, einer anschließenden Kultivierung der Zellen und der Isolierung des Wachstumsfaktors erreicht werden. Für die Produktion entsprechender Wachstumsfaktoren sind sowohl einfache Prokaryoten (z.B. *Escherichia coli*), als auch deutlich komplexere Eukaryoten (z.B. *chinese hamster ovary*) etabliert. Die Produktion in Bakterienzellen ermöglicht zwar in der Regel höhere Expressionsraten und ist kostengünstiger, doch sind Prokaryoten nicht in der Lage, die für eine hohe Aktivität des Proteins notwendigen posttranslationalen Modifikationen auszuführen. Heute werden diese Wachstumsfaktoren daher hauptsächlich in Säugerzellen produziert.

Besonders bezüglich Proteinfaltung, Glykosylierung und weiterer wichtiger postrationaler Modifikationen sind Säugerkellen zu bevorzugen. Einen entscheidenden Nachteil stellt allerdings die meist kosten- und zeitintensive Produktion dar, insbesondere wenn eine lentivirale Transduktion und eine anschließende Sortierung der Zellen zur Erstellung von hochproduzierenden Zelllinien notwendig ist.

Eine Alternative zu der stabilen Transfektion stellt die transiente Transfektion durch vorübergehendes Einbringen eines Gens in die Wirtszelle dar. Die Vorteile der transienten Transfektion bestehen darin, dass sie im Vergleich zu stabilen Transfektionen sehr einfach und schnell durchzuführen ist. Auch die Konstruktion des benötigten Vektors ist deutlich unkomplizierter, weshalb die transiente Transfektion eine immer größere Bedeutung bei der Produktion rekombinanter Zytokine erlangt.

2 AUFGABENSTELLUNG

In Kooperation mit dem Exzellenzcluster REBIRTH (Von der Regenerativen Biologie zur Rekonstruktiven Therapie) soll in dieser Arbeit die rekombinante Herstellung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 in ausreichender Reinheit erzielt werden. Den Schwerpunkt der Arbeit soll dabei die Produktbildung mit einer geeigneten und auf eine industrielle Produktion übertragbaren Produktionsmethode bilden.

Deshalb soll der Hauptfokus dieser Arbeit auf die Optimierung der transienten Transfektion zur Herstellung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 in eukaryotischen Systemen im Labormaßstab gelegt werden. Hierfür werden die Bedingungen für eine transiente Transfektion ermittelt und optimiert. Um einen optimalen Produktionsprozess zu garantieren, wird nach der Sicherstellung der Expression und Sezernierung des Zielproteins, dieses aufgereinigt. Um die biologische Aktivität des aufgereinigten Proteins zu untersuchen, werden Aktivitätsassays etabliert und durchgeführt.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1 Die transformierenden Wachstumsfaktoren- β (TGF- β)

Der Begriff Zytokine leitet sich von der griechischen Sprache ab und bedeutet „sich zwischen den Zellen bewegend“. Dies deutet auf die Funktion von Zytokinen und ihren großen Einfluss auf die Zellen hin [53].

Zytokine bilden eine heterogene Gruppe regulatorisch hochaktiver Proteine. Sie werden in vielen Zelltypen produziert und können autokrine (in der gleichen Zelle), parakrine (in benachbarten Zellen) und endokrine (in systemisch entfernten Zellen) Effekte verursachen [72]. Diese Effekte entstehen durch die hochaffine Bindung an spezifische Zytokin-Rezeptoren und die dadurch entstehenden Signalkaskaden [6, 18]. Diese Rezeptoren sind zum großen Teil membrangebundene Rezeptoren an den jeweiligen Zielzellen. Sie kommen aber auch in löslicher Form vor [72]. Besonders im Immunsystem und bei der Hämatopoese (Blutbildung) spielen die vielfältigen Funktionen von Zytokinen eine entscheidende Rolle [48]. Das TGF- β beispielsweise kann als starker Unterdrücker des Immunsystems wirken, sodass Störungen der TGF- β -Signalkaskaden zu Autoimmunkrankheiten, Entzündungen und Krebs führen können [65]. Außerdem spielen Zytokine in vivo und in vitro unter anderem eine Rolle bei der Förderung der Wundheilung, der Vermittlung von Entzündungsreaktionen sowie der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Angiogenese (Wachstum kleiner Blutgefäße) [49].

Neben diesen Effekten können einige Zytokine außerdem die Produktion weiterer Zytokine beeinflussen. Häufig kommen Zytokine glykosyliert vor, weisen eine Größe von 5-100 kDa auf und sind mit Konzentrationen im Bereich von pg/mL bis ng/mL biologisch aktiv [53]. Abhängig von ihren Strukturen und Rezeptoren sowie ihrer Funktions- und Wirkungsweise werden sie in Interleukine, Interferone, Chemokine, Monokine und Wachstumsfaktoren eingeteilt. Eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweisen und Strukturen von Zytokinen der einzelnen Gruppen sind in der Dissertationsarbeit von Claas Haake sowie in der Masterarbeit von Sophia Bonk zu finden [35, 12].

Zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren gehören die transformierenden Wachstumsfaktoren- β der TGF- β -Superfamilie. Es sind multifunktionale Zytokine, welche zahlreiche biologische Prozesse in einer kontextabhängigen Weise regulieren. Der Prototyp der Familie TGF- β wurde erstmals 1981 auf Grund seiner Fähigkeit, das Wachstum von Fibroblasten der Niere zu stimulieren, beschrieben [74]. Seitdem wurden mehr als 40 weitere Zytokine mit ähnlichen Strukturen und Funktionsweisen entdeckt und infolge dessen neben dem Prototyp TGF- β der TGF- β -Superfamilie zugeordnet. Zu diesen gehören die bone morphogenetic proteins (BMPs), Activine und Inhibine, Müllerian-Inhibiting Substances (MIS) und growth differentiation factors (GDFs) [59, 11, 14]. Die Mitglieder der TGF- β -Familie werden in vielen verschiedenen Zellarten unter anderem in allen Zelltypen des Immunsystems (in B- und T-Zellen sowie in den Macrophagen) exprimiert und erfüllen verschiedene Funktionen [65]. So können sie eine Proliferation und Differenzierung sowie das Überleben und die Apoptose in verschiedenen Zelltypen steuern [58, 60]. Außerdem steuern die Mitglieder dieser Familie zahlreiche biologische Prozesse, wie zum Beispiel die Organogenese (Organbildung) und die Hämatopoese und stellen insbesondere auch wichtige Faktoren bei der Wundheilung dar [89, 82]. Außerdem stimulieren sie die Bildung der extrazellulären Matrix und sind für viele Immunreaktionen zuständig [14]. Die auftretenden Effekte sind von dem jeweiligen Zelltyp und dem Status der Zelle stark abhängig [73, 38]. Die Mitglieder der einzelnen Subgruppen der TGF- β -Superfamilie unterscheiden sich in ihrem Expressionsprofil, ihrer Affinität gegenüber den gruppenspezifischen Rezeptoren und folglich in ihrer charakteristischen biologischen Aktivität. In den nächsten Kapiteln werden diese Unterschiede anhand der TGF- β -Subgruppe beschrieben.

3.2 Isoformen des TGF- β

Die Mitglieder der TGF- β -Gruppe bestehen aus zwei Polypeptidketten, welche über Disulfid-Brücken verbunden sind und eine Dimere bilden [8]. In der Gruppe sind fünf Isoformen ähnlicher Aminosäuresequenzen bekannt. Die drei wichtigsten Isoformen (TGF β 1, β 2 und β 3) sind in Säugerzellen zu finden und weisen eine Homologie von 70 % auf [4, 92, 22]. Sie werden von fast allen Zellen in Form einer latenten inaktiven dimeren Vorstufe synthetisiert. Diese bildet einen 100 kDa großen Komplex und wird

als Vorläuferprotein bezeichnet. Das Vorläuferprotein besteht aus einem TGF- β -Isoform und einem Precursor, welcher als *latency-associated protein* (LAP) bezeichnet wird (Abbildung 3.1). Mit Hilfe eines Signalpeptids wird dieser Komplex in den Golgi-Apparat geleitet, wo eine Spaltung der beiden Fragmente mit Hilfe der Protease Furin stattfindet [25]. Das C-terminale Fragment stellt das bioaktive TGF- β -Molekül dar (110-140 Aminosäuren) [47, 66] und wird zunächst durch eine nicht kovalente Wechselwirkung mit dem N-terminalen Fragment (LAP) unter Bildung eines inaktiven Komplexes, des *small latent complex* (SLC), verbunden. Dieser besitzt gegenüber der aktiven Form von TGF- β eine deutlich höhere Stabilität [66]. Das LAP-Fragment ist zusätzlich mit einem weiteren Protein, dem *latent TGF- β binding protein* (LTBP) über Disulfid-Brücken verbunden und bildet den sogenannten *large latent complex* (LLC) [64]. Diese Proteine sind für die zusätzliche Stabilität des Komplexes zuständig und sind in drei Isoformen bekannt (LTBP-1, -2 und -3) [11]. Es wird ebenfalls vermutet, dass sie bei der Steuerung der späteren Freisetzung des aktiven TGF- β in und bei seiner Speicherung im extrazellulären Bereich eine Rolle spielen [85].

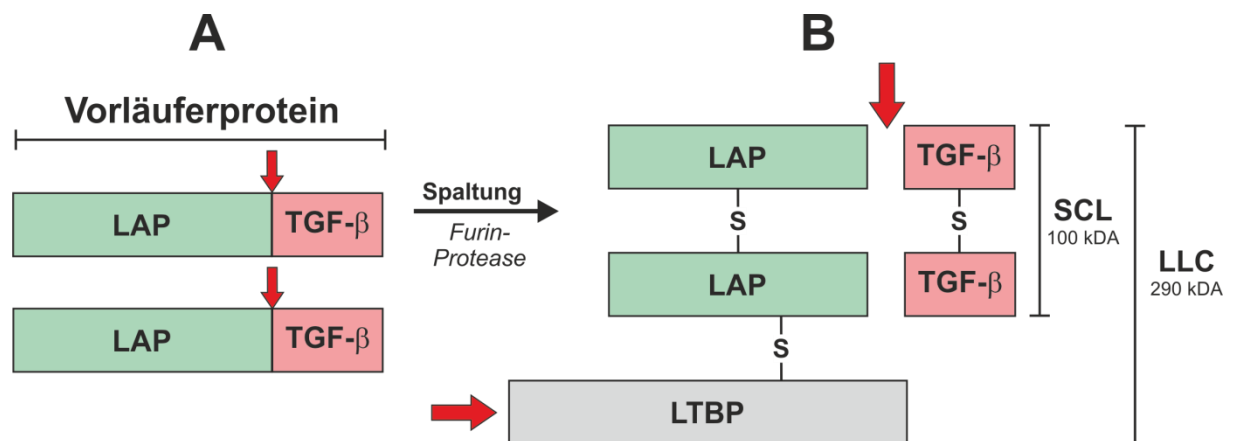


Abbildung 3.1: Darstellung der beiden latenten Formen von TGF- β . Die roten Pfeile bezeichnen die Stellen, die während der Freisetzung des TGF- β von spezifischen Proteasen gespalten werden (adaptiert von [11]).

Die Freisetzung bzw. die definitive Aktivierung des TGF- β -Moleküls erfolgt durch die Spaltung des LTBP und die anschließende enzymatische Dissoziation des LAP durch membrangebundene Proteasen wie Plasmin [85, 66, 17]. Die TGF- β -Moleküle werden entweder mit den transmembranen Rezeptoren interagieren oder assoziieren

und anschließend entsorgt oder mit anderen Proteinen gebunden, welche für die Aufrechterhaltung der TGF- β -Moleküle sorgen [11, 9].

Das aktive TGF- β -Molekül besitzt eine charakteristische Struktur aus sechs Cysteinresten. Diese bilden drei intramolekulare Schwefelbrücken (Abbildung 3.2). Diese Struktur, welche bei allen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie vorkommt, ist als *cystine knot* bekannt [14].

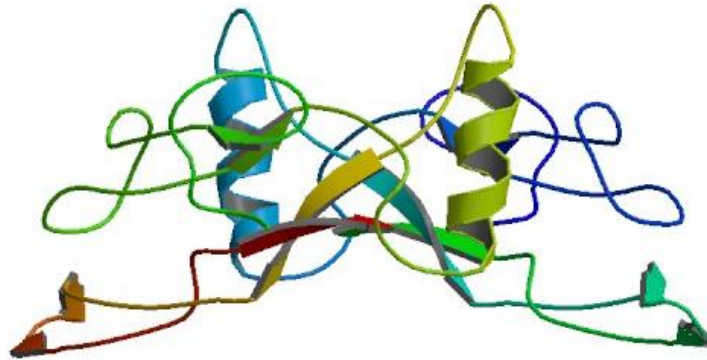


Abbildung 3.2 Modell des TGF- β 1 zur Darstellung der *cystine knot*-Struktur (übernommen von Protein Data Bank¹).

3.3 TGF- β -Rezeptor-Komplexbildung

Für die Signalübertragung der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind zwei transmembrane Serin/Threonin-Kinase-Rezeptortypen (Typ-I und Typ-II) verantwortlich [57, 58, 26, 44]. Diese Rezeptoren sind Glykoproteine. Der Typ-I Rezeptor, welcher auch als *Activin-receptor-like-Kinasen* (ALKs) bezeichnet wird besitzt ein Molekulargewicht von 55-70 kDa und der Typ-II Rezeptor ein Molekulargewicht von 70-100 kDa. Beide liegen zunächst als Homodimer in der Zellmembran vor. Ein Rezeptor besteht aus drei Domänen (Abbildung 3.3): eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne an der die Liganden des TGF- β binden, eine Transmembransegment-Domäne und eine intrazelluläre Domäne mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität [57, 91]. Insgesamt sind sieben verschiedene Typ-I (ALK 1-7) Rezeptoren und fünf Typ-II Rezeptoren bekannt. Die Rezeptoren des Typs-II werden nach ihren Hauptliganden (z.B. TGF- β *receptor* II) benannt. Der Ablauf der Signalvermittlung nach der

¹www.rcsb.org

Ligandenbindung ist für alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie prinzipiell ähnlich [75]. Ein Signal wird in der Zelle ausgelöst, indem die Liganden der Wachstumsfaktoren an einem der jeweiligen Typen, unter Bildung eines tetrameren Rezeptor-Ligand-Komplexes, anbinden.

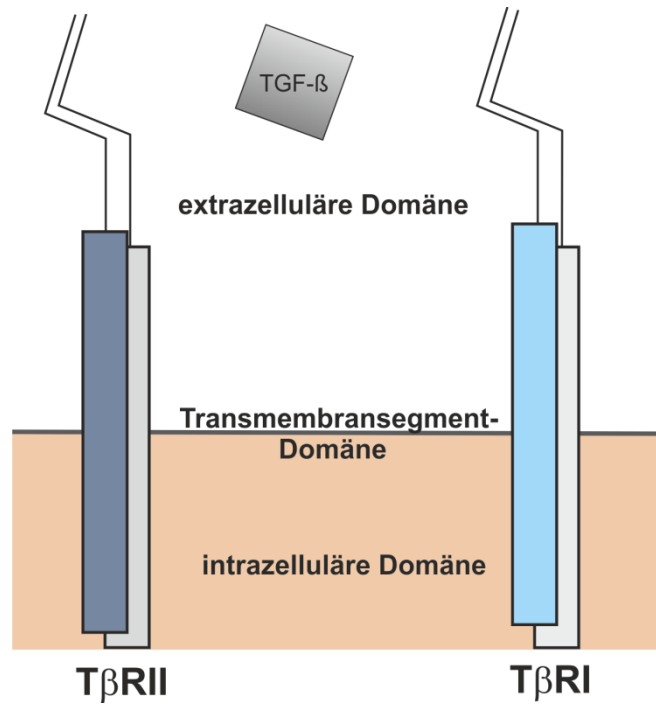


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der TGF- β -Rezeptoren Typ I (T β RI) und Typ II (T β RII) (adaptiert nach [47]).

Eine Kombinationsmöglichkeit der verschiedenen Rezeptoren der beiden Typen führt zu einer großen Anzahl von verschiedenen tetrameren Komplexen. Die unterschiedliche Affinität der Liganden zu den Rezeptoren ermöglicht eine regulierbare entstehende Antwort [23]. In Tabelle 3.1 werden für den Rezeptor T β RII (TGF- β *receptor* II) bevorzugte Komplexbildungen und die dadurch entstehende Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Proteine, der R-Smads, welche für die Signalweiterleitung zuständig sind, gegenübergestellt.

Tabelle 3.1: Kombination der TGF- β -Rezeptoren Typ-I und Typ-II sowie die Signalweiterleitung über R-Smads (Adaptiert von [54]).

Rezeptor-Typ II	Rezeptor-Typ I	R-Smad
T β II	ALK-1	Smad 1, Smad 5
	ALK-2	Smad 1, Smad 5
	ALK-5	Smad 2, Smad 3

3.4 Signaltransduktion

3.4.1 Smad-abhängige Signaltransduktion

Die TGF- β -Rezeptoren befinden sich in unterschiedlichen Zuständen. Der Typ II (T β RII) liegt in einem aktiven Zustand vor, während der TGF- β -Rezeptor Typ I (T β RI) erst durch das Binden an den T β RII-Rezeptor aktiviert wird. Diese führt wiederum zur Bildung einer vorübergehenden Verbindung zwischen dem Liganden des TGF- β und den beiden Rezeptoren (Abbildung 3.4). Der T β RI-Rezeptor wird durch den T β RII-Rezeptor phosphoryliert, wodurch eine Konformationsänderung des T β RI-Rezeptors entsteht [91]. Diese Konformationsänderung ermöglicht die Freigabe des sterisch behinderten Zentrums des T β RI-Rezeptors [20]. Der aktivierte Akzeptor kann dadurch mit spezifischen Proteinen, die sogenannten Smad-Proteinen, interagieren. Die Smad-Proteine sind eine Gruppe intrazellulärer Genregulatorproteine, welche Signale innerhalb der Zelle weiterleiten können [81]. Diese Proteine unterscheiden sich in ihrer Funktion und Struktur und werden dementsprechend in drei Gruppen unterteilt: common-mediator Smads (co-Smads), rezeptor-regulierte Smads (R-Smads) und inhibitorische Smads (I-Smads). Die Smad-Proteine (co-Smads und R-Smad) sind aus N-terminalen MH1-Domäne und MH2-Domänen (*mad homology domains*) aufgebaut. Beide Domänen sind über eine Linker-Region miteinander verbunden. Die MH1-Domäne ist für die Bindung an die DNA zuständig, wohingegen die C-terminale MH2-Domäne für die Interaktion mit Proteinen und die Transkriptionskontrolle zuständig ist [58]. I-Smad ist ähnlich aufgebaut, jedoch ohne die MH1-Domäne. Sie besitzt deswegen nicht die Möglichkeit sich an das DNA zu binden [81]. In Tabelle 3.2 werden die Mitglieder der verschiedenen Smad-Gruppen dargestellt und ihre Funktionen zusammengefasst.

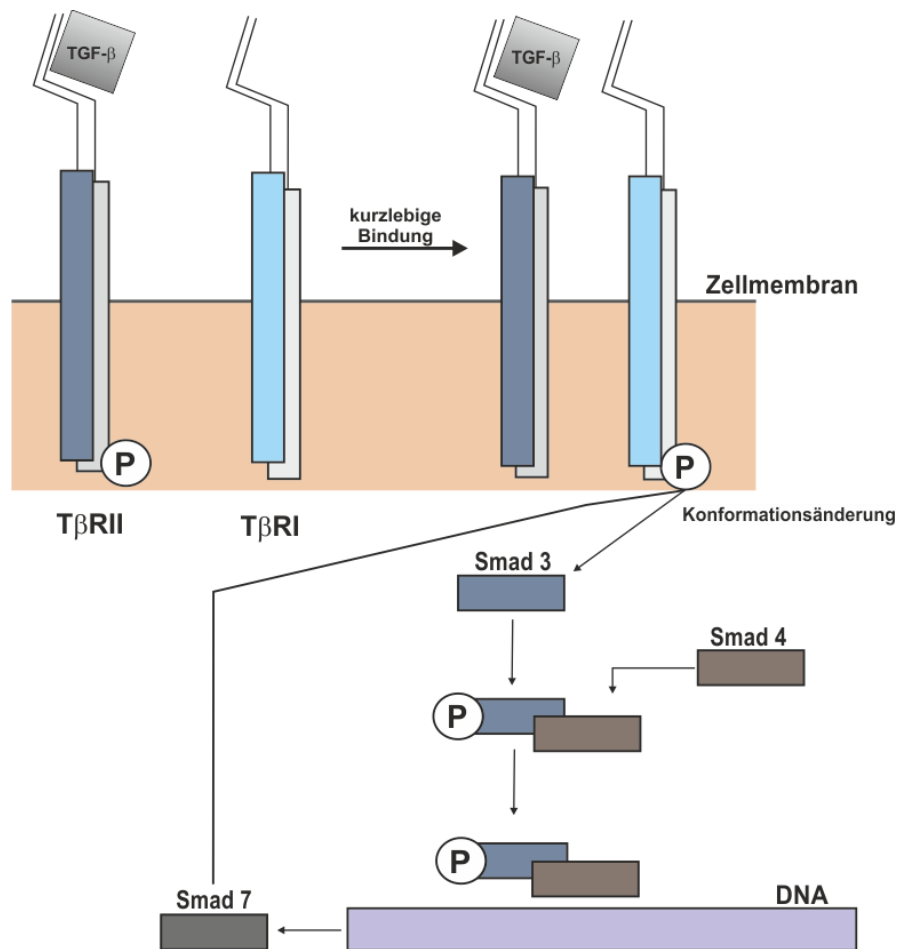


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Signaltransduktion der TGF-β-Rezeptoren Typ I (TβRI) und Typ II (TβRII) (adaptiert nach [23]).

Tabelle 3.2: Gruppen der Smad-Familie und ihre Funktionen [83, 75, 65].

Gruppe	Mitglieder	Aktivierung	Funktion
R-Smads	Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5, Smad 8	direkt über Rezeptor-Typ 1	Einfluss auf den TGF-β-Signalweg
co-Smads	Smad 4	indirekt durch R-Smad-Mitglieder	Bindungspartner der R-Smads
I-Smads	Smad 6, Smad 7	direkt über Rezeptor-Typ 1	Antagonisten, konkurrieren mit R- und co-Smads um die Bindung an den aktivierten Typ 1 Rezeptor

Bei der Signaltransduktion von TGF-β werden bevorzugt die Smad 2 und Smad 3 phosphoryliert. Dieser Vorgang wird mit Hilfe des smad-interagierenden Hilfsprotein *Smad anchor for receptor activation* (SARA) unterstützt, welche die Interaktion zwischen Rezeptor und Smad-Protein erleichtert [43]. Bei der Phosphorylierung

eines Smad-Proteins wird die Bindung von Smad-Protein und SARA-Protein gelöst. Das freigesetzte Smad-Protein kann dann mit einem co-Smad-Protein zum heterotrimeren Komplex oligomerisieren [23]. Dieser wandert zum Nukleus, wo die Genexpression mithilfe anderer Cofaktoren reguliert wird.

3.4.2 Smad-unabhängige Signaltransduktion

Eine weitere mögliche Signaltransduktion des TGF- β ist die smad-unabhängige Signalübertragung bei der die Proteine der Familie MAP- (*mitogen activated protein*) Kinasen eine entscheidende Rolle spielt [28]. Drei Untergruppen dieser Familie werden von TGF- β aktiviert: die p38-MAP-Kinase, die ERK- (*extracellular signal regulated kinase*) und die JNK- (*Jun N-terminal Kinase*) [23]. Dabei ist die Aktivierungsdauer deutlich kürzer als bei der smad-abhängigen Signaltransduktion und wird vermutlich nicht über den Zellkern geleitet [60]. Eine genauere Erklärung der Funktion dieses Signalwegs ist noch nicht beschrieben. Es wurde allerdings beobachtet, dass die Proteine der smad-Familie und der MAP-Familie einen Einfluss auf die Regulierung der Aktivität des jeweiligen Proteins haben können. So können zum Beispiel aktive MAP-Kinasen das R-smad Proteins phosphorylieren und dadurch seine Aktivität kontrollieren [50, 28, 33]. Smad7-Proteine verstärken wiederum die Aktivierung von JK-Kinase [62].

3.5 Physiologische Bedeutung des TGF- β 1

TGF- β 1 besitzt vielfältige Wirkungen. Die Hauptaufgaben liegen vor allem in der Entwicklung von Stammzellen, der Regulation der Differenzierung und der Zellproliferation, in Wundheilungsprozessen und der Immunsystemregulation [73]. TGF- β 1 kann von fast allen Zelltypen exprimiert werden. Die ausgelösten Reaktionen sind dabei aber konzentrationsabhängig. Kleine Konzentrationen haben meist stimulierende Wirkungen, wohingegen der inhibierende Effekt bei Konzentrationserhöhung zunimmt [38]. Desweiteren ist die Wirkung aber auch abhängig vom Zelltyp und dem Zellzyklenstadium [42]. TGF- β 1 besitzt zum Teil gegensätzliche Effekte. Zum Beispiel hat es einen besonderen inhibitorischen Einfluss auf die Zellproliferation von Epithel- und Endothelzellen, wohingegen es auf mesenchymale Zellen stimulierend

wirkt. Ebenfalls es ist an dem Wachstum von Knochen und Knorpel beteiligt, da es die Differenzierung und Proliferation der Chondrozyten und Osteoblasten stimuliert [42]. Somit könnte es als Therapie in der Knochenheilung angewandt werden. Im Tierexperiment konnte bereits durch lokale und systemische Gaben des TGF- β gezeigt werden, dass die Knochenbildung beschleunigt werden kann [56]. Die Angaben über Funktion und Expressionsmuster einzelner TGF- β -Isoformen im Knochengewebe sind jedoch nicht eindeutig und häufig widersprüchlich. Offenbar bestehen in Wirkungsweise, Wirkungs- und Expressionsgrad Unterschiede, die bis jetzt nicht ausreichend präzise erforscht sind. Deshalb wird oft verallgemeinernd von TGF- β und nicht von TGF- β 1, -2 oder -3 berichtet. Es ist jedoch nachgewiesen, dass sich die TGF- β -Isoformen gegenseitig beeinflussen und ihre biologische Aktivität und Synthese teilweise selbst regulieren können [11, 29]. TGF- β 1 besitzt außerdem einen antiinflammatorischen Effekt: Es ist dafür verantwortlich, dass die Zellen des Immunsystems zwischen körpereigenem und körperfremdem Gewebe unterscheiden können [80]. Eine Fehlfunktion der TGF- β 1-Expression kann daher zu schwerwiegenden Autoimmunkrankheiten führen. Im Tierexperiment zeigte sich, dass TGF- β -knockout-Mäuse binnen weniger Tage an schweren Entzündungsreaktionen starben [27]. Jedoch besitzt TGF- β 1 auch Effekte auf das Wachstum von Krebszellen. Zu Beginn der Krankheit hemmt es das Wachstum von Krebszellen, bei fortschreitender Krankheit können einige Krebszellen jedoch durch Mutationen der TGF- β 1 Rezeptoren eine Resistenz gegen das anti-proliferative Signal des TGF- β 1 entwickeln. Dieses führt zu einem ungehemmten Wachstum. Desweiteren schütten die Krebszellen TGF- β 1 aus, welches sich gegen die körpereigene Immunabwehr richtet [79]. TGF- β könnte daher auch als Marker in der Früherkennung von Krebs dienen. Erhöhte TGF- β -Werte im Blut oder Urin konnten vor allem bei Brust-, Lungen- und Leberkrebskranken gemessen werden. Diese sensitive Methode ist aber noch nicht etabliert [27].

3.6 Produktion rekombinanter Proteine in Säugerzellen

Die Herstellung von rekombinanten Proteinen über die Einführung von Nucleinsäuren in Zellen ist eine zentrale Technik der Biotechnologie und Molekularbiologie. Hierfür sind unterschiedliche Wirtszellen geeignet. Als prokaryotische Zellkultursysteme werden beispielweise *Escherichia coli* [39, 55] und *Bacillus subtilis* [10] verwendet.

Auch Hefen wie *Pichia pastoris* [51] oder *Saccharomyces cerevisiae* [34] finden hier eine Anwendung. Die wichtigsten Wirtszellen sind jedoch Säugerzellen. 60-70 % aller rekombinanten Proteine werden in Säugerzellen produziert. Die Eignung eines Expressionssystems hängt generell sowohl von dem Kosten- und dem Zeitaufwand, vor allem aber von dem produzierten Protein ab. Nur durch eine experimentelle Ermittlung eines spezifisch für das Zielprotein geeigneten Expressionssystems kann die richtige Wirtszelllinie getroffen werden. Die Produktion in Bakterienzellen ermöglicht in der Regel höhere Expressionsraten und ist kostengünstiger, jedoch werden eukaryotische Proteine, die in Prokaryoten exprimiert worden sind, mit einer geringeren Löslichkeit gebildet. Dieses führt wiederum zu einer fehlerhaften Faltung oder zur Aggregatbildung [36, 7]. Außerdem sind Prokaryoten nicht in der Lage posttranslationale Modifikationen durchzuführen (zum Beispiel Proteinfaltung und Glycosylierung), welche für die Stabilität und die Bioaktivität von Proteinen notwendig sind. Somit sind sie für die Produktion von komplexen Proteinen ungeeignet. Hefen können im Gegensatz zu den Bakterien diese posttranslationalen Modifikationen [40, 19], durchführen. Allerdings unterscheidet sich das Glykosilierungsmuster der in ihnen produzierten Proteine sehr von dem der humanen Proteine, was diese Systeme wenig interessant für die Produktion rekombinanter Proteine macht [45]. Deswegen wird häufig die Expression von Proteinen in Säugerzellen bevorzugt, da nur diese die für die Proteine korrekte Faltung und alle notwendigen Modifikationen ermöglichen. Zudem ist das Glykosilierungsmuster der in ihnen produzierten Proteine dem humanen sehr ähnlich ist. Ein bevorzugt verwendetes Expressionssystem stellen die CHO-Zellen dar. Diese wurden aus den Ovarien eines chinesischen Hamster (*cricketulus griseus*) isoliert [87]. Die heutzutage häufigste verwendete CHO-Zelllinie ist die CHO-DHFR-Zelllinie, welche durch eine Mutagenese der CHO-K1-Zelllinie etabliert wurde [88]. Alternativ werden für die Produktion rekombinanter Proteine humane embryonale Nierenzellen (HEK293), Maus-Mayeloma Zellen (NS0) sowie Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK) verwendet [94].

3.6.1 Transiente Transfektion

Die Produktion rekombinanter Proteine in den geeigneten Wirtszellen erfolgt durch die Klonierung des ausgewählten Zielgens in einen Expressionsvektor und die anschließende Transfektion dieses Vektors in die Zielzelle. Das Zielgen kann hierbei entweder vorübergehend (transiente Transfektion) oder dauerhaft (stabile Transfektion) in das

Genom der Wirtszelle integriert werden. In den meisten Transfektionsmethoden findet eine zufällige Integration des Zielgens in die Wirtszelle statt wobei die Wahrscheinlichkeit eine Integration des Zielgens in eine stark transkribierte Region nicht hoch ist [61, 96]. Für eine stabile Integration des exogenen Gens in ein Chromosom werden nach einer Transfektion die erfolgreich transfizierten Zellen selektiert. Eine Selektionsmöglichkeit kann über eine Co-Transfektion von Selektionsmarkern erfolgen. Über einen Selektionsdruck während der Kultivierung der Zellen in einem dafür geeigneten Selektionsmedium bietet sich die Möglichkeit, Zellen mit mehreren Kopien des Zielgens zu erhalten, welche somit eine höhere Produktivität des Zielproteins aufweisen. Hierfür werden nach der Transfektion Zellen dieser Kulturen über Einzelklonierung sortiert und die Zellen mit besonders hohen Expressionsraten des Zielgens selektiert. Diese Methode hat den Nachteil, dass sie extrem zeit- und kostenaufwendig ist und ihr Erfolg von mehreren unkontrollierbaren Faktoren abhängig ist [16].

Verglichen mit stabilen Transfektionen haben transiente Transfektionen den Vorteil, dass sie schnell und einfach durchzuführen sind. Das Zielgen wird hierbei nicht in das Genom der Wirtszellen integriert, sondern liegt extrachromosomal vor (Abbildung 3.5). Während stabile Vektorkonstrukte eigene Promotoren und zusätzliche Selektionsmarker benötigen, ist die Konstruktion eines Vektors für eine transiente Transfektion wesentlich unkomplizierter. In der Regel enthält der Plasmid-Vektor lediglich das Zielgen, einen meist viralen Promotor/Enhancer sowie prokaryotische Elemente zur Reproduktion in Bakterien (Antibiotika-Resistenzen und Replikationsursprung) [16].

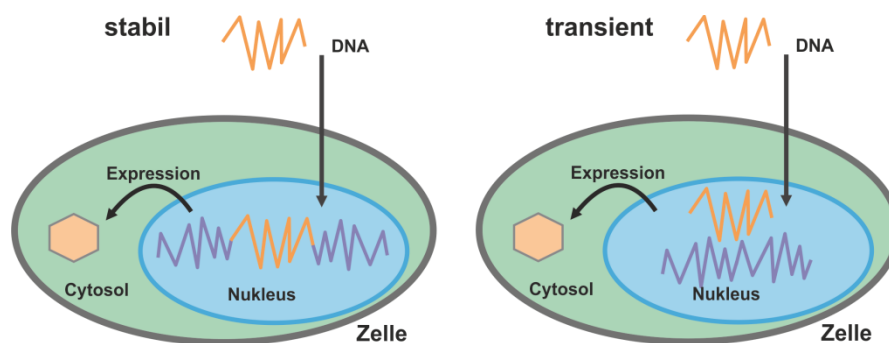


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der transienten und stabilen Transfektion (adaptiert von [46]).

Mit chemischen Methoden kann die fremde DNA auf die einfachste Art in die Zielzelle eingebracht werden. Neben Calciumphosphatpräzipitation und dem

Lipidvermittelten Transfer zählen zu den chemischen Methoden auch polymervermittelte Transfektionsmethoden.

12 bis 72 Stunden nach der Transfektion wird ein Expressionsmaximum erreicht, nachdem es zu einem rapiden Abbau durch Tod der Zellen oder Verlust des Plasmids kommt. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion ist hierbei somit eine Selektion und Einzellklonierung der erfolgreich transfizierten Zellen sinnlos [93].

Als besonders geeignet für transiente Transfektionsmethoden wird in der Literatur die HEK-Zelllinie beschrieben [86]. Es kann jedoch auch die für stabile Transfektionen gut geeignete CHO-Zelllinie verwendet werden, mit welcher jedoch in der Regel keine vergleichbaren Proteinausbeuten erzielt werden können. Es besteht somit für die Verwendung von CHO-Zellen bei transienten Transfektionen noch Optimierungsbedarf [21].

3.6.1.1 Lipidvermittelte Transfektion

Im Jahre 1987 fanden Felgner *et al.* eine Möglichkeit, DNA mithilfe von Lipiden in die Zellen einzubringen [30]. Vereinfacht lässt sich der molekulare Aufbau von Lipiden so beschreiben, dass über einen variablen Linker eine hydrophile Kopfgruppe und ein hydrophober Rest miteinander verbunden sind. Aus diesem Grund ordnen sich Lipide in wässriger Lösung als Liposomen (kugelförmige Vesikel mit einer Lipid-Doppelschicht) an.

Da die Lipidkopfgruppen positive Ladungen besitzen, können diese mit den negativ geladenen Stellen des DNA-Rückgrats komplexieren. Es bilden sich sogenannte Lipoplexe, die anschließend über Endocytose von den Zellen aufgenommen werden. Nachdem die Lipoplexe in die Zelle gelangt sind, öffnet sich die Endosomenmembran, wodurch die DNA ins Zellplasma freigesetzt wird. Während der Mitose, wenn es zur Auflösung der Kernmembran kommt, kann die DNA in den Zellkern diffundieren (Abbildung 3.6) [97].

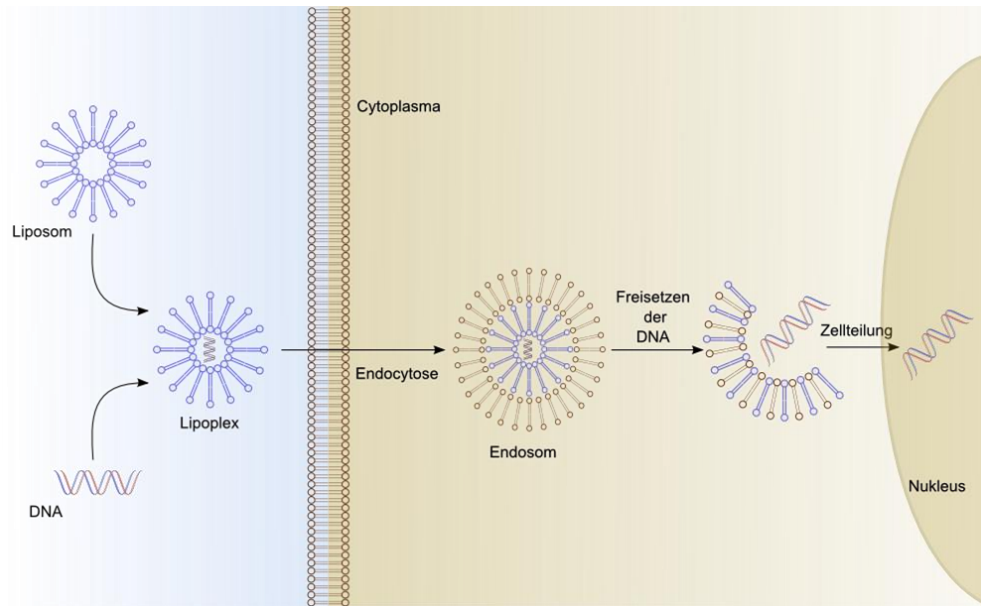


Abbildung 3.6: Schematischer Ablauf der Lipofektion (übernommen von [69]).

Wie erfolgreich die Lipofektion letztendlich ist, hängt hauptsächlich von der chemischen Struktur des Lipids ab. So ist die Lipofektion umso effektiver, je länger der hydrophobe Rest ist und je mehr positive Teilladungen die Kopfgruppe trägt [95]. Durch den Zusatz von Helferlipiden (meist ungeladene Lipide) kann die Lipofektionseffektivität weiterhin gesteigert werden [41]. Ein Beispiel für ein Helferlipid ist das Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE), welches sowohl zur Steigerung der Membranfusion als auch der Fluidität von Biomembranen eingesetzt wird [52]. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an Helferlipiden und kationischen Lipiden, die für die Lipofektion eingesetzt werden [3].

3.6.1.2 Polymervermittelte Transfektion

Bei der polymervermittelten Transfektion kommen kationische Polymere zum Einsatz, um fremde DNA in die Wirtszellen einzubringen. Polyethylenimine, die effektivsten und daher am häufigsten verwendeten Polymere, wurden von Boussif *et al.*, 1995 [15] zum ersten Mal für die Transfektion verwendet.

Polyethylenimine können als lineare, aber auch als verzweigte Ketten verschiedener Länge vorliegen. Die unterschiedlichen Polyethylenimin-Moleküle unterscheiden sich dabei deutlich in ihrer Toxizität. So weisen lineare Polyethylenimine eine geringere Toxizität auf als verzweigte Moleküle desselben Molekulargewichtes. Weiterhin sind vor allem kleinere Polyethylenimine mit einem geringen Molekulargewicht deutlich

weniger toxisch als große, langkettige Polyethylenimine [90]. Bei Transfektionen finden aus diesem Grund häufig das lineare 22 kDa und das verzweigte 25 kDa Polyethylenimin Anwendung [31].

Polyethylenimine sind wasserlösliche Moleküle, deren in der Ethylenimin-Einheit gebundene Stickstoffatome eine positive Ladung tragen und somit die Komplexbildung mit der negativ geladenen DNA ermöglichen. Da die Polyethyleniminmoleküle zu ca. einem Drittel aus Stickstoffatomen bestehen, sind die bei dieser Komplexbildung entstehenden Polyplexe sehr viel stabiler als Lipoplexe.

Die Aufnahme der gebildeten Polyplexe erfolgt wie auch bei der Lipofektion über Endocytose. Jedoch können Protonen innerhalb des Endosoms aktiv vom Polyplex gebunden werden, da nicht alle Amine im Polyethylenimin gesättigt sind. Die Folge ist ein Chloridüberschuss und dadurch eine Erhöhung des osmotischen Drucks, was zu einem regelrechten Zerplatzen der Endosomen führt. Die DNA wird so in die Zelle freigesetzt [2].

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Prozess für die Produktion des rekombinanten Wachstumsfaktors TGF- β 1 im Labormaßstab zu etablieren. Hierfür wurden zwei eukaryotische Zelllinien transient transfiziert und deren Produktivität hinsichtlich des Wachstumsfaktors TGF- β 1 verglichen (Kapitel 4.2, 4.4 und 4.5). Nach der Aufreinigung des TGF- β 1 mittels Affinitätschromatographie (Kapitel 4.5.5) erfolgten Untersuchungen zur biologischen Aktivität. Hierfür wurde ein Aktivitätsassay etabliert und durchgeführt (Kapitel 4.5.6). Die erfolgreiche Produktion von rekombinanten Proteinen ist von vielen Faktoren abhängig: der Transfektionsmethode, den verwendeten Expressionsvektoren, der eingesetzten DNA-Konzentration und der ausgewählten Wirtszelllinie. Im ersten Abschnitt des experimentellen Teils werden die Arbeiten zur Optimierung dieser Faktoren für die verwendeten humanen embryonalen Nierenzellen (*engl. human embryonic kidney*, HEK293-Zelllinie) beschrieben, im zweiten Abschnitt für die Ovarzellen des chinesischen Hamsters (*engl. chinese hamster ovary*, CHO-K1-Zelllinie). Durch Transfektion der Zellen mit einem Plasmid für das Reportergen des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) konnten unterschiedliche chemische Transfektionsmethoden miteinander verglichen und anschließend die heterologe Expression über Fluoreszenz quantifiziert werden (Kapitel 4.1 und 4.5.3).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse erfolgte, nach der Klonierung eines neuen Expressionsvektors mit TGF- β 1 als GOI (*gene of interest*) (Kapitel 4.3), eine Transfektion beider Zelllinien mit dem Plasmid (Kapitel 4.4.3 und 4.5.3). Nach dem Nachweis der Expression und der Sekretion des TGF- β 1 wurde das Protein aufgereinigt (Kapitel 4.5.5) und dessen biologische Aktivität getestet. (Kapitel 4.5.6).

Die folgenden Abschnitte enthalten einzelne Ergebnisse, die in Zusammenarbeit mit durch die Autorin betreute Studienabschlussarbeit entstanden. In Abschnitt C ist eine Auflistung zu finden.

4.1 Transiente Transfektion mittels pEGFP-Plasmid

Die in diesem Kapitel für die Transfektion verwendete Zelllinie (HEK-293-Zellen) wurde von Prof. Dr. Axel Schambach (Institut für Hämatologie, Medizinische Hochschule Hannover) bereitgestellt. HEK-Zellen wurden bereits mehrfach erfolgreich zur Produktion unterschiedlicher Proteine durch transiente Transfektion eingesetzt [70, 5, 63] und sind hierfür besonders geeignet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte, wie in Kapitel B.1.4 beschrieben, in DMEM-Medium mit 10%tigem Serumanteil. Die Zellen wurden adhärent in T-Flaschen unterschiedlicher Größe (25, 75 und 175 cm²) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nachdem Master- und Arbeitszellbänke angefertigt wurden (siehe Abschnitt B.1.2), erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem pEGFP-N1-Plasmid (Clontech) zunächst mittels transienter Methoden. Die Transfektion mit dem pEGFP-N1-Plasmid ist sehr schnell und einfach durchzuführen und eignet sich deshalb besonders gut als Vorab-Screening, um die Transfektionseffizienz und die optimale Transfektionsmethode für diese Zelllinie zu bestimmen. Das pEGFP-N1-Plasmid besteht aus einem einfachen Vektorkonstrukt. Es enthält einen viralen Promotor, prokaryotische Elemente zur Reproduktion in Bakterien und das Zielgen EGFP (siehe Abbildung 4.1). Die fluoureszierende Eigenschaft des EGFP wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz verwendet.

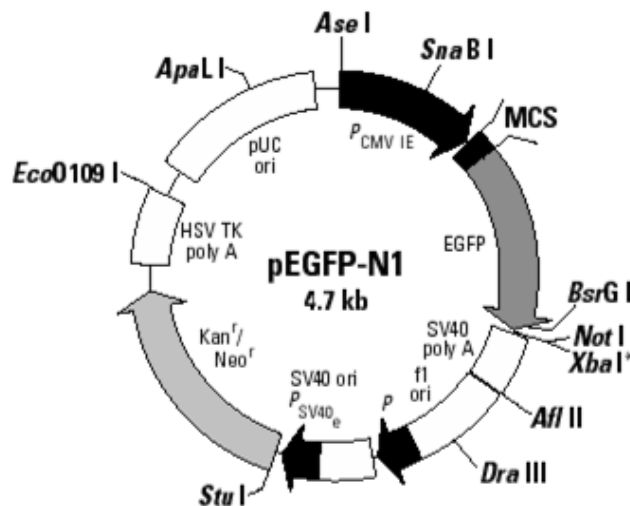


Abbildung 4.1: Vektorkarte des verwendeten pEGFP-N1-Plasmids (übernommen von CLONTECH Laboratories, Inc.²).

²www.clontech.com

4.1.1 Amplifikation des pEGFP-N1-Plasmides

Das Plasmid pEGFP-N1 wurde zunächst in *E. coli* amplifiziert. Dazu wurden kompetente *E. coli* OneShot® TOP10-Zellen (Life Technologies) nach dem in Abschnitt B.3.1 angegebenen Protokoll transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden verwendet, um eine 100 ml Flüssigkultur anzupflanzen, welche nach 12 Stunden Kultivierung geerntet wurde. Mittels QIAGEN Plasmid Purification Midi Kit (Qiagen GmbH) wurde der Vektor aufgereinigt (siehe Abschnitt B.5.7) und in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) umgepuffert. Nach der Durchführung einer PCR (siehe Abschnitt B.5.3) ergab die anschließende Agarosegel-Analyse der PCR-Produkte (siehe Abschnitt B.5.4) eine Bande von 600 bp (Abbildung 4.2, Spur 2 und 3), welche mit der erwarteten Größe des EGFP-Gens übereinstimmt.

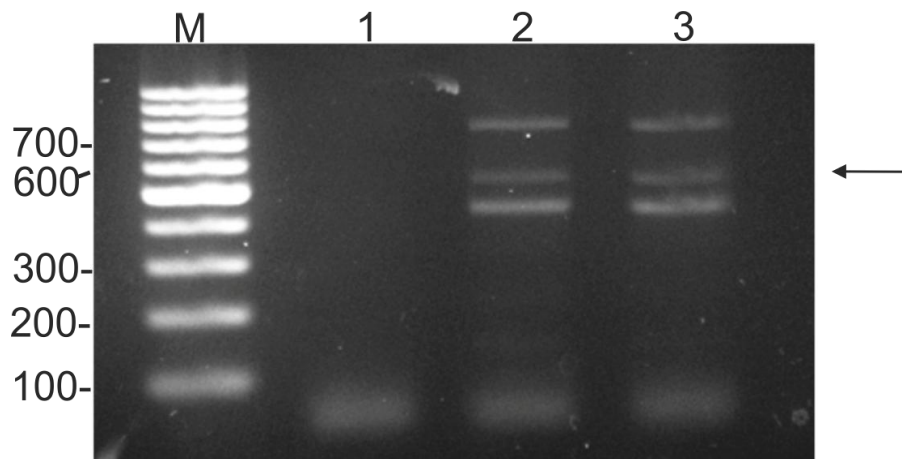


Abbildung 4.2: Agarosegel der Amplifikation des EGFP-Gens. Aufgetragene Proben: M:Marker; 1-3: Proben der PCR-Produkte. Die Größen sind in bp angegeben.

Die Quantifizierung des Plasmids mit dem Spektrophotometer NanoDrop-ND 1000 (siehe Abschnitt B.2.8) ergab eine Gesamtmenge von 330 µg.

4.1.2 Lipidvermittelte Transfektion

Mit dem amplifizierten Plasmid wurden zwei chemische Methoden der transienten Transfektion durchgeführt und miteinander verglichen: die Transfektion per Lipofektion und per Polyfektion. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte zunächst semiquantitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie und anschließend quantitativ mittels Durchflusszytometrie.

Für die Lipofektion wurden zwei unterschiedliche Transfektionsreagenzien gewählt: das Metafectene von Biontex und das Lipofektamin von Invitrogen. Die adhärenenten HEK-293-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 24-Loch-Platten mit einer Zelldichte von 400.000 Zellen/ml in 1 ml Medium (Lipofektamin-Ansatz) bzw. mit einer Zelldichte von 40.000 Zellen/ml in 1 ml Medium (Metafectene-Ansatz) ausplattiert und transfiziert (siehe Abschnitt B.1.11 und B.1.14). Hierbei wurden jeweils zwei Ansätze mit unterschiedlichen Reagenz-DNA-Verhältnissen (1:3 und 1:5 für Metafectene und 1:2 sowie 1:4 für Lipofektamin) angefertigt (Die verwendeten Zelldichten sowie Reagenz-DNA-Verhältnisse wurden von den Herstellern der Transfektionsmittel empfohlen).

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden alle Transfektionsansätze 24 Stunden nach der Transfektion mikroskopisch untersucht. Die Transfektionseffizienz ergibt sich als Quotient aus den fluoreszierenden Zellen und der Gesamtzahl aller gezählten Zellen. Für beide Ansätze wurde eine Transfektionseffizienz von über 80% (bei einem Reagenz-DNA-Verhältnis von 1:3 für Metafectene bzw. 1:4 für Lipofektamin) erreicht (Abbildung 4.3).

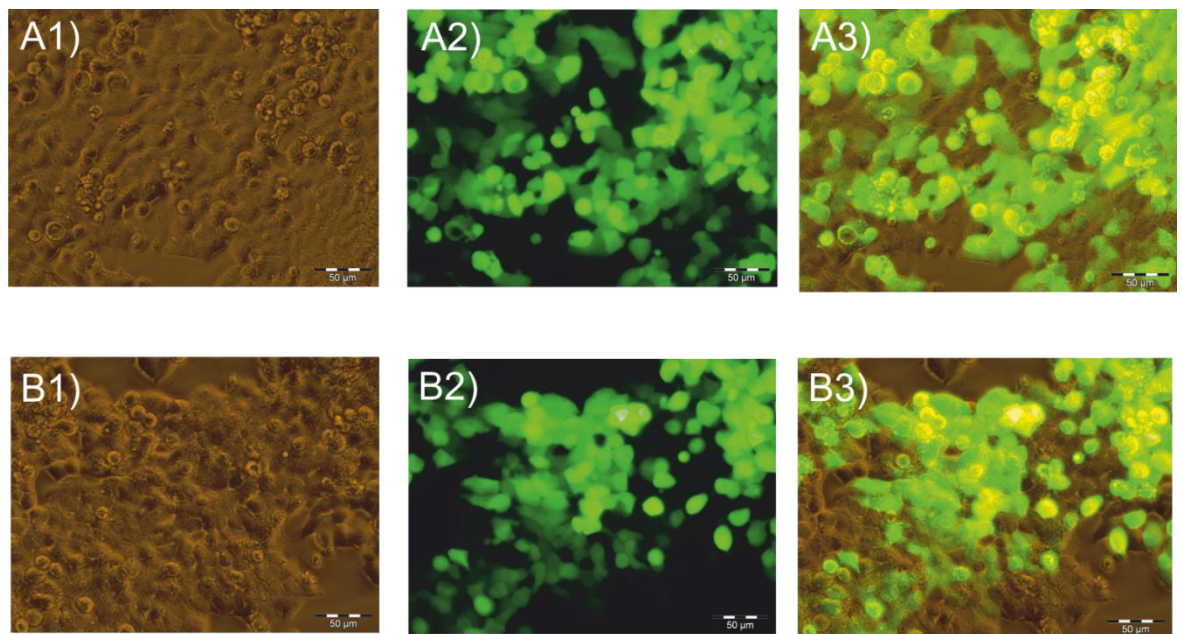


Abbildung 4.3: Mikroskopische Aufnahmen von pEGFP-N1-transfizierten HEK293-Zellen. Oben mittels Metafectene 1:3: A1) Hellfeldaufnahme, A2) Fluoreszenzaufnahme, A3) Überlagerung der Bilder A1 und A2. Unten mittels Lipofektamin 1:4: B1) Hellfeldaufnahme, B2) Fluoreszenzaufnahme, B3) Überlagerung der Bilder B1 und B2. Der Maßstab zeigt 50 µm.

Für eine genauere Quantifizierung der Fluoreszenzintensität und somit dem Anteil der exprimierenden Zellen, wurde der Anteil der GFP-positiven Zellen 48 Stunden

nach der Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abschnitt B.4.2). Mit Hilfe dieser Methode können sehr viele Zellen in kurzer Zeit gemessen werden. Somit kann eine im Vergleich mit der mikroskopischen Methode statistisch besser reproduzierbare Aussage über die Transfektionseffizienz getroffen werden. Für die durchflusszytometrische Methode wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Messung verwendet. Die erhaltenen Messdaten wurden mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogramms (WinMDI 2.9) ausgewertet. Für die graphische Darstellung wurde ein eindimensionales Histogramm (Abbildung 4.4), in welchem die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen wurde, verwendet.

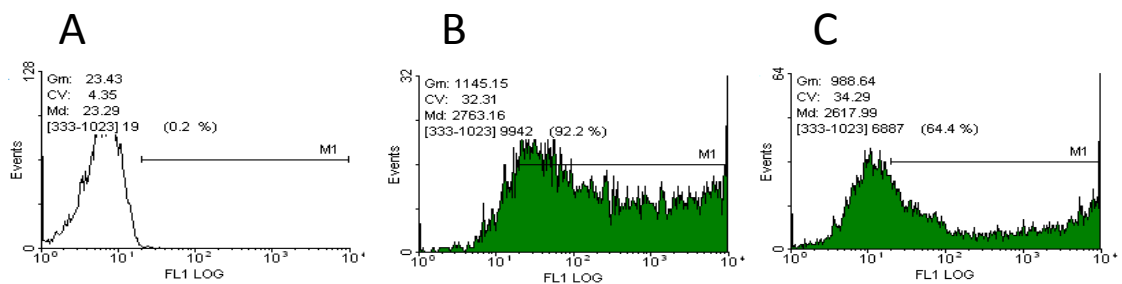


Abbildung 4.4: GFP-Fluoreszenzintensität der mit pEGFP-N1-transfizierten HEK-293-Zellen. A: nicht transfizierte HEK293-Zellen als Negativkontrolle B: Metafectene, C: Lipofectamin.

Die grüne Fläche unterhalb der Grenzmarke M1-Region entspricht den erfolgreich transfizierten Zellen mit erhöhter Fluoreszenzintensität. Es konnte gezeigt werden, dass eine Transfektionseffizienz von 92,2 % (Metafectene-Ansatz) bzw. 64,4 % (Lipofectamin-Ansatz) erzielt wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die mikroskopisch erhaltenen Ergebnisse ungenau waren. Vermutlich, da deutlich weniger Zellen gezählt werden konnten. Für weitere Transfektionen der HEK293-Zellen mittels lipidvermittelter Transfektion ist somit der Metafectene-Ansatz deutlich geeigneter.

4.1.3 Polymervermittelte Transfektion

Kationische Polymere werden ebenfalls für die chemische Transfektion verschiedener Zelllinien eingesetzt. Sie bilden mit der DNA stabile Polyplexe, welche über Endocytose in die Zellen aufgenommen werden.

Für diese Art der Transfektion wurden ebenfalls verschiedene Transfektionsreagenzien (TurboFect von Thermofischer, GeneJuice von Novagen und Polyethylenimin von Polysciences Inc.) mit unterschiedlichen Reagenz-DNA-Verhältnissen

ausgewählt. Polyethylenimin-Verbindungen (PEI) liegen sowohl linear als auch verzweigt vor. Das Molekulargewicht kann sehr unterschiedlich sein (0,4-25 kDa). Je kleiner ein PEI-Molekül und je weniger verzweigt es ist, desto weniger toxisch wirkt es auf die Zellen. Allerdings haben sich PEI-Moleküle mit kleinen Molekulargewichten als weniger effektiv für die Transfektion von Zellen erwiesen [21]. Deswegen wurde für diese Arbeit das 25 kDa schwere, lineare Polyethylenimin verwendet.

48 h nach der Transfektion (siehe Abschnitt B.1.12, B.1.13 und B.1.15) wurde die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt. Der Anteil positiver Zellen lag hierbei bei 42,1 % (TurboFect-Reagenz) und 33,1 % (GeneJuice-reagenz) (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Transfektion hat somit prinzipiell funktioniert, allerdings ist die Effizienz der beiden Ansätze eher gering und daher ungeeignet für weitere Transfektionen der HEK293-Zellen mit diesen Methoden. Auch eine weitere Optimierung der Transfektion in Bezug auf das DNA-Reagenz-Verhältnis und die verwendete Zelldichte ergab keine signifikante Verbesserung der Transfektionseffizienz. Ein deutlich besseres Ergebnis zeigte die Transfektion mittels Polyethylenimin. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte bei einem DNA-Reagenz-Verhältnis von 1:2 eine Transfektionseffizienz von über 90% erreicht werden (Abbildung 4.5).

Diese Ergebnisse wurden ebenfalls durchflusszytometrisch bestätigt (Abbildung 4.6). Es wurde gezeigt, dass der Anteil GFP-positiver Zellen nach 48 h bei über 90 % lag.

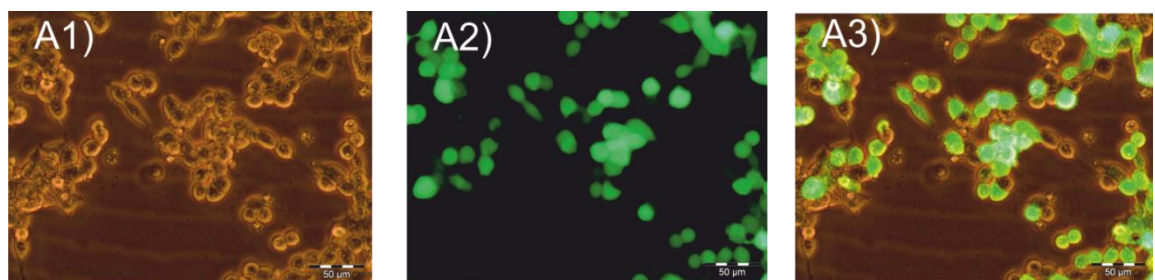


Abbildung 4.5: Mikroskopaufnahmen von pEGFP-N1-transfizierten HEK293-Zellen mittels PEI 1:2: A1): Hellfeldaufnahme, A2): Fluoreszenzaufnahme, A3): Überlagerung der Bilder A1 und A2 . Der Maßstab zeigt 50 µm.

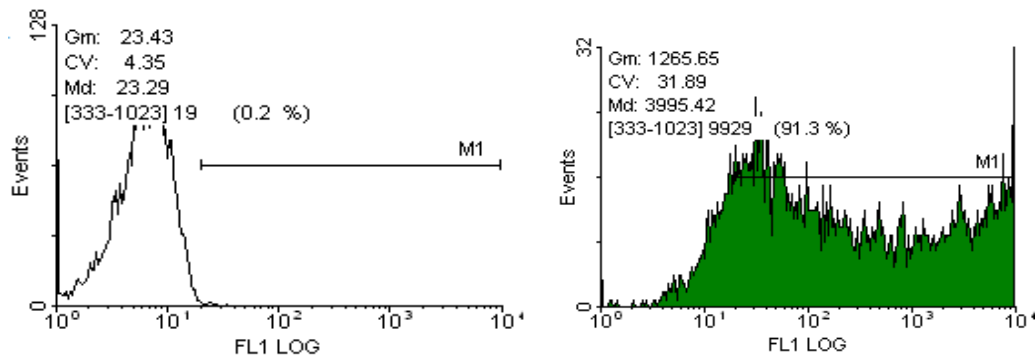


Abbildung 4.6: GFP-Fluoreszenzintensität der mit pEGFP-N1-transfizierten HEK-293-Zellen mittels PEI-Transfektion. Die grün gefärbte Fläche, welche unterhalb des Markers M1 liegt (rechts) stellt den Anteil GFP-positiver Zellen dar, die weiße Fläche die nicht transfizierten HEK-293-Zellen (links) als Negativkontrolle.

Eine Variation der DNA-Reagenz-Verhältnisse (1:1 und 1:3) bei der Transfektion mittels PEI zeigte, dass bei einem Verhältnis von 1:3 kein signifikanter Unterschied zum 1:2 DNA-Reagenz-Verhältnis bezüglich der Transfektionseffizienz erzielt werden konnte. Da aber PEI ab einer bestimmten Konzentration ebenfalls toxisch auf die Zellen wirken kann, wurde für weitere Transfektionen der HEK-293-Zellen bevorzugt mit einem geringeren PEI-Anteil gearbeitet. Die Transfektionseffizienz mit einem DNA-Reagenz-Verhältnis von 1:1 war deutlich schlechter. Durch die geringere Menge an vorhandenen PEI-Molekülen werden vermutlich weniger Polyplexe gebildet, welche von den Zellen aufgenommen werden. Somit werden, da nicht genügend Komplexe vorhanden sind, nicht alle Zellen transfiziert.

4.1.4 Fazit

Nach der Amplifikation des pEGFP-N1-Plasmids wurden die adhärenenten HEK293-Zellen mit dem Plasmid transient mittels Lipofektion und auch über Polyfektion erfolgreich transfiziert. Bei beiden Transfektionsmethoden konnte eine Transfektionseffizienz von über 90 % (Metafectene- und PEI-Reagenz) erreicht werden. Die Ergebnisse wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die optimale Zelldichte und das optimale DNA-Reagenz-Verhältnis für eine erfolgreiche Transfektion wurden für beide Reagenzien bestimmt. Beide Reagenzien zeigten eine vergleichbare, gute Transfektionseffizienz. Die Transfektion mittels PEI wird allerdings bevorzugt für transiente Transfektionen eukaryotischer Zellen verwendet, da diese Methode günstiger und einfacher durchführbar ist. Für weitere Transfektionen im Rahmen

dieser Arbeit werden die HEK293-Zellen deswegen mit dem PEI-Reagenz und einem DNA-PEI-Verhältnis von 1:2 transfiziert.

4.2 Transfektion der HEK293-Zellen zur Produktion des TGF- β 1

Aufgrund der in Kapitel 4.1 dargestellten Ergebnisse wurden die HEK293-Zellen über den PEI-Ansatz mit einem komplexeren Vektorkonstrukt, welches TGF- β 1 als Zielgen enthielt, transfiziert. Ziel war es, eine Produktionszelllinie welche TGF- β 1 als sezerniertes Protein produziert zu erhalten. Dafür wurden die Expression sowie die Sekretion des TGF- β 1 mittels unterschiedlicher Detektionsmethoden bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die nicht transfizierten HEK293-Zellen zunächst transient mittels Polyfektion transfiziert (Kapitel 4.2.2). Hierfür wurden die in Kapitel 4.1.3 optimierten Bedingungen für eine PEI Transfektion verwendet. Später wurden nicht transfizierte HEK293-Zellen in der Arbeitsgruppe Schambach der Medizinischen Hochschule Hannover mit demselben Plasmid stabil lentiviral transduziert um den Erfolg beider Methoden miteinander vergleichen zu können (Kapitel 4.2.3).

Die Sekretion eines Proteins ist unter anderem von dem verwendeten Signalpeptid abhängig, da dieses das jeweilige Protein für den Export aus der Zelle markiert. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden zwei Vektorkonstrukte erstellt, welche zwei verschiedene Signalpeptide enthalten: das von murinem IgG- κ sowie das der Luciferase aus *Gaussia princeps* (g.Luc). Nach der lentiviralen Transfektion der Zellen konnte jedoch lediglich die Expression des Zielproteins, nicht aber seine Sekretion bestätigt werden [1]. Für die vorliegende Arbeit wurde ein neuer Vektor mit dem Signalpeptid Interleukin 2 (IL2) konstruiert. Solche Signalpeptide, die von Interleukinen abgeleitet sind, sind für die industrielle Proteinproduktion sehr weit verbreitet [76, 84].

Neben dem Signalpeptid enthält der Vektor EGFP als Markergen und DHFR (Dihydrofolatreduktase) als Selektionsgen (Abbildung 4.7). Diese werden mit dem Ergebnis eines Fusionproteins gemeinsam mit dem TGF- β 1-Gen über die erhaltene IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle) transkribiert.

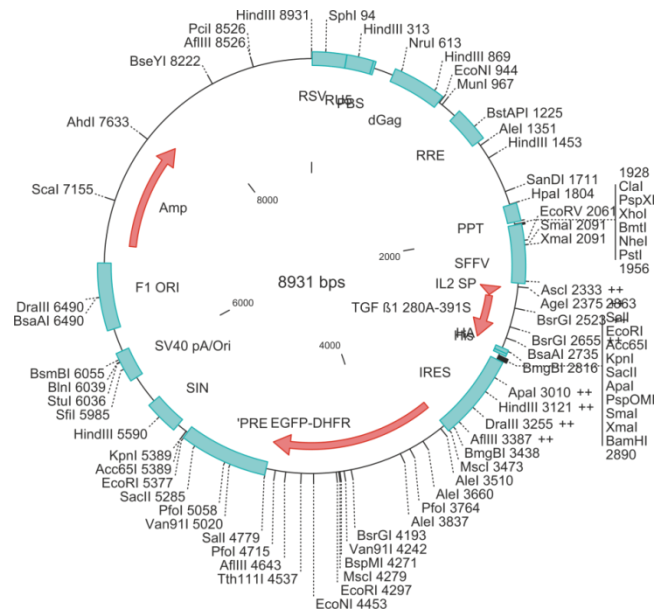


Abbildung 4.7: Schematische Karte des Vektors, der für die Erstellung der TGF- β 1 produzierenden Zelllinie verwendet wurde.

4.2.1 Amplifikation des pRRL PPT SF TGF- β 1-Plasmids

Um sicher zu stellen, dass in dem Plasmid tatsächlich das Zielgen TGF- β 1 vorhanden ist, wurde das Plasmid mittels PCR analysiert. Unter Verwendung der Primer-BLAST Online Software wurden zunächst zwei Primerpaare unterschiedlicher Längen (131 bp für Primerpaar 1 und 159 bp für Primerpaar 2) mit ungefähr gleichen Schmelzpunkten (57,3 °C) ausgewählt, welche für das TGF- β 1 spezifisch sind. Diese wurden anschließend von der Firma Invitrogen synthetisiert. (Eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primeren ist im Anhang in Tabelle A.4.2 gegeben).

Um die optimalen Anlagerungstemperaturen der jeweiligen Primerpaare zu ermitteln, wurde zunächst eine Gradienten-PCR mit fünf unterschiedlichen Temperaturen (zwischen 56,1 und 67,5 °C) durchgeführt (siehe Abschnitt B.5.3). Die richtige Anlagerungstemperatur ist für eine erfolgreiche PCR wichtig, da nur so eine Spezifität der Bindung an die Zielsequenz gewährleistet werden kann. Ist die Anlagerungstemperatur zu hoch, entsteht kein Produkt; ist sie zu niedrig, entstehen unspezifische Produkte. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

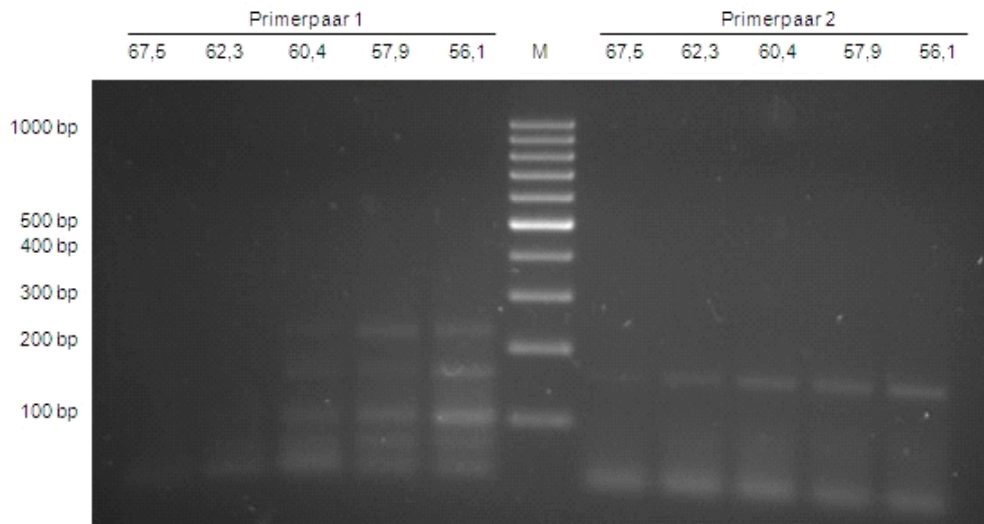


Abbildung 4.8: Agarosegel der Temperaturoptimierungsexperimente für die zwei Primerpaare. Die Temperaturen sind in °C angegeben.

Ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 150 bp trat sowohl bei Primerpaar 1 bei Temperaturen unter 62,3 °C sowie bei allen ausgewählten Temperaturen für das Primerpaar 2 auf. Deutlich zu sehen ist aber, dass das Primerpaar 2 spezifischer an das TGF- β 1-Gen bindet, da lediglich die dazugehörige Bande zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu weist das Primerpaar 1 mehrere Nebenprodukte auf, die Primerdimeren zugeordnet werden konnten (bei 100 und 200 bp). Außerdem scheint das Primerpaar 2 bei allen verwendeten Anlagerungstemperaturen an das TGF- β 1-Gen zu binden. Eine leicht verstärkte Bande tritt bei 56,1 °C auf. Diese Temperatur wurde als optimale Anlagerungstemperatur ausgesucht.

Um eine ausreichende Menge des erhaltenen Plasmids zu produzieren, wurde es in *E. coli* amplifiziert. Dazu wurden kompetente *E. coli* OneShot® TOP10-Zellen (Life Technologies) transformiert, in acht Schüttelkolben kultiviert, und das Plasmid anschließend mit dem QIAGEN Plasmid Purification Midi Kid aufgereinigt und in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) umgepuffert. Eine Quantifizierung mit dem Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000) ergab eine Plasmidkonzentration von über 20 µg/ml.

Mit der ermittelten, optimalen Anlagerungstemperatur des spezifischen Primerpaares wurde eine PCR-Analyse mit dem amplifizierten Plasmid für alle acht Kultivierungen durchgeführt. Abbildung 4.9 zeigt die Analyse der erhaltenen PCR-Produkte mittels Agarosegel. Bei allen Kultivierungen ist die erwartete Bande des Zielgens bei ungefähr 150 bp deutlich zu erkennen. Somit konnte das Vorhandensein des GOI bestätigt werden.

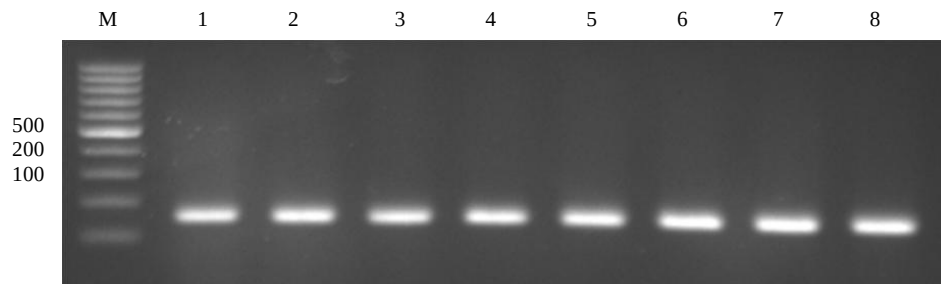


Abbildung 4.9: Agarosegelanalyse der Amplifikation des TGF- β 1-Gens. Die PCR-Proben wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. (M: Marker, 1-8 : PCR-Produkte aus den acht Kultivierungen).

4.2.2 Transiente Transfektion per PEI

Für die Polyfektion mit dem amplifizierten Plasmid mittels PEI wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 1 ml Medium in 6-Loch-Platten ausplattiert. Nachdem die Zellen die doppelte Zellzahl erreicht hatten, wurden sie mit einem DNA-Reagenz-Verhältnis von 1:2 transfiziert. Um zu überprüfen ob die Transfektion erfolgreich war, wurde 48 Stunden später die GFP-Fluoreszenz der Zellen mikroskopisch untersucht. Das Ergebnis in Abbildung 4.10 zeigt, dass eine GFP-Fluoreszenz der Zellen bereits 48 h nach der Transfektion sichtbar ist. Eine Transfektionseffizienz von über 70 % bestätigte die erfolgreiche Transfektion.

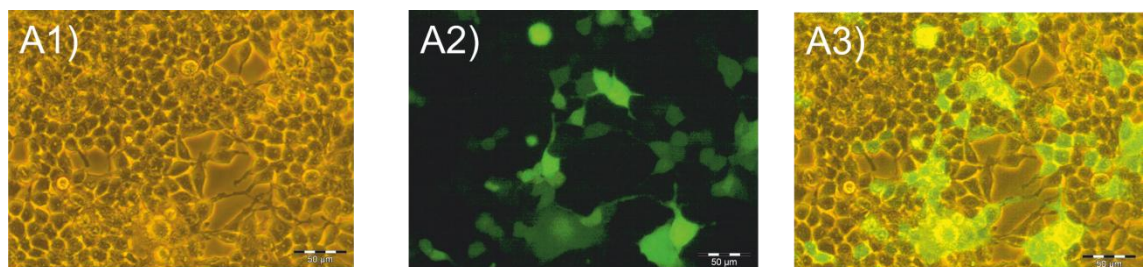


Abbildung 4.10: Mikroskopische Aufnahmen von pRRL PPT SF TGF β hiha iDHFRGFP -transfizierten HEK293-Zellen mittels PEI: A1) Hellfeldaufnahme, A2) Fluoreszenzaufnahme, A3) Überlagerung der Bilder A1 und A2. Der Maßstab zeigt 50 μ m.

Die Produktion des GFP-Gens bestätigt die erfolgreiche Transfektion, kann jedoch nicht direkt als Maß für die Produktion von TGF- β 1 genommen werden, obwohl beide Proteine zusammen in eine mRNA transkribiert werden. Die Expression bzw. die Sekretion des TGF- β 1 wurde ebenfalls bestimmt. Hierfür wurde die Transfektion in größerem Maßstab durchgeführt, um genügend Überstand für die Detektion zu

produzieren. Die Zellen wurden in T-175 cm² Flaschen transfiziert. Der erhaltene Überstand wurde 24, 48, und 72 Stunden nach der Transfektion von den Zellen abgetrennt und mittels Vivaspin Membran (MWCO: 3 kDa) aufkonzentriert. Der Nachweis der Expression bzw. der Sekretion erfolgte über Western Blot. Bei diesem Verfahren werden die zuvor in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteinbanden (siehe Abschnitt B.2.3) über einen Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Blot wurde entsprechend dem Protokoll in Abschnitt B.2.6 durchgeführt. Aufgetragen wurde neben dem aufkonzentrierten Zellkulturüberstand auch der Zellaufschluss (siehe Abschnitt B.1.16) sowie der unkonzentrierte Überstand des ersten, zweiten und dritten Tags nach der Transfektion. Nach Durchführung des Western Blots wurde die immunologische Detektion des Proteins durch die Verwendung eines Antikörpers gegen TGF-β1 durchgeführt (siehe Abschnitt B.2.6).

Zu erwarten war eine Monomerbande des TGF-β1 im Bereich von 12 kDa. Diese ist hauptsächlich bei den Zellaufschlüssen sowie den aufkonzentrierten Überständen zu erkennen, konnte allerdings nicht eindeutig dem TGF-β1 zugeordnet werden, da auf dem Western Blot weitere Banden zu sehen waren (Daten nicht gezeigt). Für eine eindeutige Bestätigung müssten die Proben erneut auf ein Gel aufgetragen, isoliert und sequenziert werden. Dass außerdem bei den nicht aufkonzentrierten Proben keine Proteinbande bei der erwarteten Größe nachweisbar war, lässt sich auf eine sehr geringere Proteinsekretion zurückführen.

Im Prinzip hat die Transfektion funktioniert. Eine EGFP-Produktion konnte mikroskopisch bestätigt und bestimmt werden (Abbildung 4.10). Die Produktion des TGF-β1 konnte allerdings nicht bestätigt werden. Da das Protein auch intrazellulär nicht eindeutig nachweisbar ist, lässt dies auf eine geringere Expression des Zielproteins schließen.

4.2.3 Stabile Transfektion per lentiviraler Transduktion

Da über eine transiente Transfektion keine zufriedenstellende Expression des TGF-β1 erreicht werden konnte, sollte geklärt werden, ob die Expressionsrate durch eine andere Transfektionsmethode verbessert werden kann. Zu diesem Zweck wurde mittels lentiviralen Gentransfers eine Zelllinie erstellt, die das Zielprotein stabil produzieren sollte. Die HEK293-Zellen wurden mit demselben Plasmid (siehe

Abbildung 4.7) von der Arbeitsgruppe Prof. Schambach (MHH) transduziert. Bei dieser Methode werden Plasmide bakteriellen Ursprung mit Hilfe von viralen Expressionsvektoren für die Transfektion der Säugetierzellen verwendet. Für die Erstellung dieser Vektoren werden die nicht essenziellen Gene, welche für die Reproduktion der Viren zuständig sind, aus diesen entfernt und das Zielgen eingefügt. Die Produktion der Viren findet dann in einer Packungszelllinie statt, von der die nicht essenziellen Gene zur Verfügung gestellt werden (die Gene werden transient oder stabil zum Genom der Zellen hinzugefügt). Anschließend findet die Transduktion der Wirtszelllinie mit dem hergestellten infektiösen Überstand der Packungszelllinie statt [77]. Die für diese Arbeit erstellte Produktionszelllinie wurde mit modifiziertem humanen Immundefizienz-Virus HIV-I transduziert. Dieser Virus tendiert dazu, das Transgen bevorzugt in aktive Transkriptionsbereiche des Wirtsgenoms zu integrieren, wodurch ein höheres Expressionslevel erreicht werden kann [78].

4.2.4 Lokalisierungs- und Expressionsnachweis

Nach der Transduktion der HEK293-Zellen musste zunächst auf DNA-Ebene untersucht werden, ob das Zielgen in das Genom der Zellen integriert wurde. Hierfür wurde die RNA aus 10^6 transduzierten Zellen isoliert (siehe Abschnitt B.5.1), das erhaltene Präparat wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 quantifiziert und anschließend mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt B.5.2).

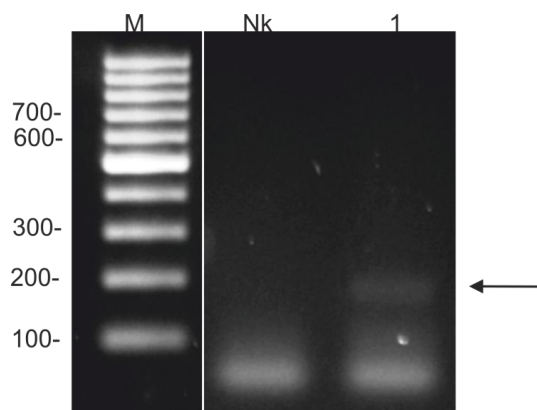


Abbildung 4.11: Ergebnisse der DNA-Isolierung aus den lentiviral transduzierten HEK293-Zellen. (M: Marker, Nk: Negativkontrolle (nicht transduzierte Zellen), 1: transduzierte Zellen) Angegeben sind die Größen in bp.

Nach Durchführen einer PCR wurden die PCR-Produkte per Agarosegel analysiert.

Es konnte eine Bande der erwarteten Größe des TGF- β 1-Abschnitts (150 bp) detektiert werden. Diese Bande ist bei dem Kontrollansatz, der mit nicht-transduzierten Zellen durchgeführt wurde, nicht vorhanden (Abbildung 4.11). Somit kann die Integration des TGF- β 1-Gens in die Zellen bestätigt werden. Für die Untersuchung der Expression auf Protein-Ebene wurde erneut ein Western Blot durchgeführt. Es wurde jeweils 1 ml Überstand mittels TCA-Fällung (siehe Abschnitt B.2.1) aufkonzentriert. Das Zellpellet wurde ebenfalls aufgetragen. Hierfür wurden 10^6 Zellen zunächst mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen, um Medienreste möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend fand nach einstündiger Inkubation der Zellen in einem Harnstoff-Puffer bei Raumtemperatur der Zellaufschluss mittels Ultraschall statt, um die intrazellulären Proteine zugänglich zu machen. Die Proteine wurden ihrer Größe entsprechend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch nach der Durchführung eines Western Blots unter Verwendung eines TGF- β 1-Antikörpers detektiert. In Abbildung 4.12 sind die Ergebnisse dargestellt.

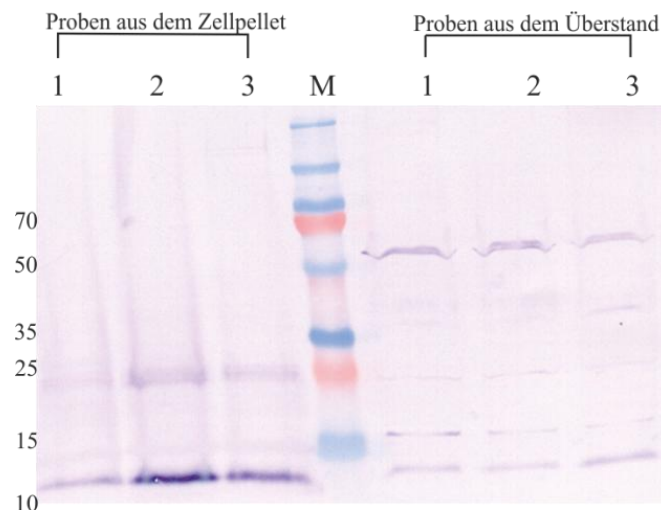


Abbildung 4.12: Ergebnisse des Western Blots der Zellaufschlüsse und Kultivierungsüberstände der lentiviral transduzierten HEK293-Zellen. (Die Zahlen 1,2 und 3 geben an, vor wie vielen Tagen die Transfektion stattgefunden hat).

Es ist zu erkennen, dass das Zielprotein nur im Zellaufschluss eindeutig sichtbar ist (unterhalb 15 kDa als Monomer sowie als Dimer bei ungefähr 25 kDa). Die Sekretion des Proteins kann zwar auch bestätigt werden, da eine Färbung bei den Proben aus dem Überstand ebenfalls beobachtet werden konnte, allerdings sind die Banden hier deutlich schwächer. Bei einem Western Blot mit nicht aufkonzentrierten Überständen konnte TGF- β 1 nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit konnte mit der Methode trotz des verwendeten Signalpeptids IL2 lediglich die Expression des Proteins, aber keine ausreichende Sekretion erreicht werden. Das verwendete

Signalpeptid ist jedoch nur einer von mehreren Faktoren, die einen Einfluss auf die Sekretion eines Proteins haben. Neben dem verwendeten Signalpeptid spielen die verwendete Zelllinie sowie das zu exprimierende Zielprotein ebenfalls eine entscheidende Rolle. Um den Einfluss dieser Faktoren untersuchen zu können, wurden CHO-Zellen mit demselben Plasmid und der gleichen Methode in der Arbeitsgruppe Prof. Schambach (MHH) transduziert. Es handelte sich hierbei um die serumfreie Suspensionszelllinie CHO^{SFS} (Klon II) von der Firma Cell Culture Service. Die Kultivierung dieser Zellen unter serumfreien Bedingungen bietet einen großen Vorteil bei der Proteinproduktion, da die Aufreinigung des Proteins erleichtert ist. Einen weiteren Vorteil bietet diese Zelllinie bei der Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen. Es handelt sich um DHFR-negative Zellen, welche somit durch eine Kotransfektion mit dem entsprechenden dhfr-Gen transfiziert werden können. Ist die Transfektion erfolgreich, so sind diese Zellen anschließend in der Lage, Hypoxanthin und Thymidin selbst zu produzieren. Durch einen Verzicht auf diese Mediumzusätze nach der Transfektion wird ein Selektionsdruck ermöglicht, durch den nur die erfolgreich transfizierten Zellen überleben und sich reproduzieren.

Neben dem Transgen für TGF- β 1 wurden sieben weitere Plasmide für sieben ausgewählte Zielproteine (ANGPL-5, BMP-2, BMP-4, VEGF, Activin-A, a-FGF und b-FGF) konstruiert, um auch den Einfluss des Transgens untersuchen zu können. Zusätzlich haben die Zielproteine einen His- und ein HA-tag, welcher C-Terminal an dem jeweiligen Zielprotein exprimiert wurde. Dies hat den Vorteil, dass die Detektion aller Proteine über einen gegen His- bzw. HA-tag gerichteten Antikörper erfolgen kann und nicht für jedes Protein ein für das Protein spezifischer Antikörper benötigt wird. Für jede Zelllinie wurden zwei Ansätze durchgeführt. Vom infektiösen Überstand der Packungszelllinie wurden zur Transduktion der CHO^{SFS}-Zellen 100 μ L bzw. 250 μ L verwendet. Nach der Transfektion wurden für alle Zelllinien Master- und Arbeitszellbänke angelegt.

Während der Kultivierung im Selektionsmedium (siehe Abschnitt B.1.1) wurde zweimal wöchentlich das Medium gewechselt und die Vitalität bestimmt (siehe Abschnitt B.1.9). Nach der vierten Passage erfolgte der Sekretionsnachweis mittels Western Blot mit einem His-tag-Antikörper. Hierfür wurde jeweils 1 ml Überstand per TCA-Fällung fünffach aufkonzentriert. Zusätzlich wurden Proben der Zellaufschlüsse aufgetragen. Diese dienten als Kontrolle, ob eine Expression des jeweiligen Proteins

intrazellulär stattfindet. Als negative Kontrolle wurden untransfizierte CHO^{SFS} Zellen verwendet. Das Ergebnis der Detektion des Western Blots (Abbildung 4.13 für Zellaufschlüsse und Abbildung 4.14 für Zellüberstände) zeigt, trotz des gleichen Vektoraufbaus, unterschiedlich starke Banden für die verschiedenen Proteine. In nur fünf Ansätzen konnte das entsprechende Protein nachgewiesen werden. Bei ANGPL-5, BMP-2, BMP-4 konnten weder in den aufkonzentrierten Kulturüberständen noch in den aufgeschlossenen Zellproben His-tag Proteine detektiert werden (Abbildung 4.13 in Spuren 4-9 sowie Abbildung 4.14 in Spuren 4-9). Bei den restlichen Proben sind alle Zielproteine intrazellulär nachweisbar. Die Proben der aufkonzentrierten Überstände zeigten allerdings unterschiedliche Ergebnisse. Nur bei VEGF, a-FGF und b-FGF (Abbildung 4.14 Links in den Spuren 1-2 und 6-9) ist die Sekretion des jeweiligen Proteins unabhängig von der Menge des bei der Transfektion verwendeten infektiösen Überstands (100 und 250 µL). Bei TGF-β1 und Activin A ist die Sekretion des Proteins nur aus den Ansätzen mit 100 µL nachweisbar (Abbildung 4.14 links in Spur 1 und 2 sowie rechts in Spur 3 und 4). Insgesamt aber sind die Banden der sezernierten Proteine deutlich schwächer als die für die intrazellulären Proteine. Die Bande für das TGF-β1 liegt bei 25 kDa (Dimer). Eine leichte Bande bei ungefähr 15 kDa wird dem monomeren TGF-β1 zugeordnet. Laut Literatur müsste die TGF-β1 Momomerbande bei ungefähr 12,5 kDa liegen. Da das Zielprotein zusätzlich einen His- und einen HA-tag (Insgesamt 15 Aminosäuren) besitzt, erhöht sich jedoch das Gewicht des Proteins.

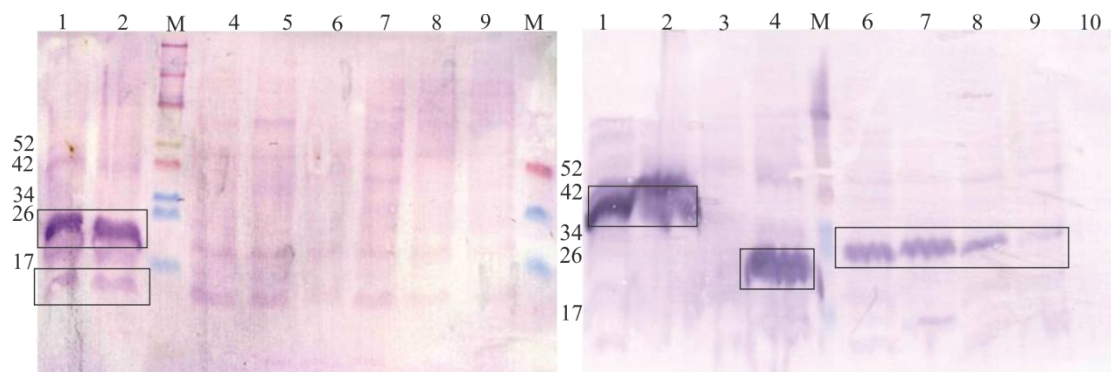


Abbildung 4.13: Ergebnis des Western Blots der Zellaufschlüsse. Links: (1: TGF-β1 100, 2: TGF-β1 250, 3: Marker, 4: ANGPL-5 100, 5: ANGPL-5 250, 6: BMP-2 100, 7: BMP-2 250, 8: BMP-4 100, 9: BMP-2 250, 10: Marker) Rechts: (1: VEGF 100, 2: VEGF 250, 3: Activin-A 100, 4: Activin-A 250, 5: Marker, 6: a-FGF 100, 7: a-FGF 250, 8: b-FGF 100, 9: b-FGF 250, 10: untransfizierte CHOSFS Zellen als negative Kontrolle.

EXPERIMENTELLER TEIL

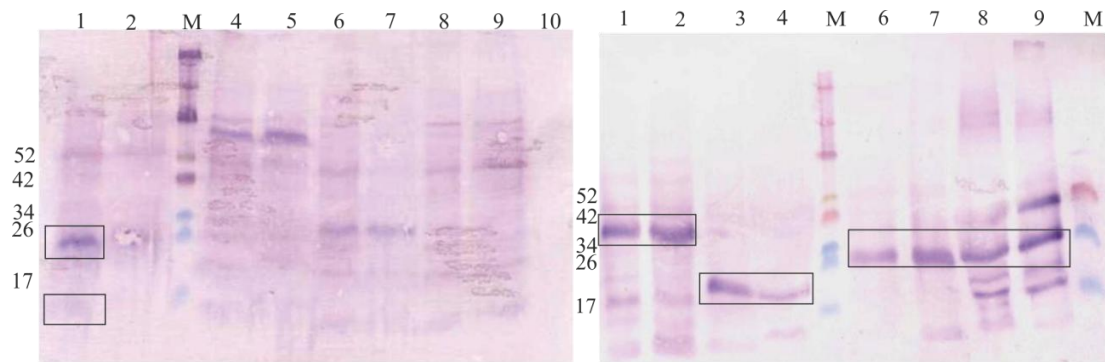


Abbildung 4.14: Ergebnis des Western Blots der aufkonzentrierten Überstände. Links: 1: TGF- β 1 100, 2: TGF- β 1 250, 3: Marker, 4: ANGPL-5 100, 5: ANGPL-5 250, 6: BMP-2 100, 7: BMP-2 250, 8: BMP-4 100, 9: BMP-2 250, 10: untransfizierte CHOSFS Zellen als negative Kontrolle. Rechts: 1: VEGF 100, 2: VEGF 250, 3: Activin-A 100, 4: Activin-A 250, 5: Marker, 6: a-FGF 100, 7: a-FGF 250, 8: b-FGF 100, 9: b-FGF 250, 10: untransfizierte CHOSFS Zellen als negative Kontrolle.

Um eine quantitative Aussage über die Expression des TGF- β 1 machen zu können, wurde eine intrazelluläre Färbung mittels Durchflusszytometrie entsprechend dem Protokoll in Abschnitt B.4.1 durchgeführt. Hierfür wurde eine Kombination aus einem mouse-anti-His-tag und einem goat-anti-mouse-PE Antikörper und 10^6 Zellen der jeweiligen Zelllinien (100 und 250 μ L-Ansatz) sowie als negative Kontrolle die gleiche Menge an nicht transfizierten CHO^{SFS} Zellen verwendet. Zuerst wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Durch die Fixierung werden die Zellen stabilisiert und über die Messzeit haltbar gemacht. Die Permeabilisierung der Zellen ermöglicht es den Antikörpern, in das Innere der Zellen zu gelangen. Nach einer einstündigen Inkubation in der primären Antikörperlösung und der anschließenden Kopplung der primären Antikörper mit den fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörpern, wurden die Proben durchflusszytometrisch untersucht. Für die graphische Darstellung wurde ein eindimensionales Histogramm verwendet, in welchem die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen wurde (Abbildung 4.15). Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Anteils erfolgreich transduzierter Zellen für beide Zelllinien (55,8 % für TGF- β 1¹⁰⁰ bzw. 52,2 % für TGF- β 1²⁵⁰). Allerdings weisen die beiden Zelllinien ein sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten auf. Die TGF- β 1¹⁰⁰ Zelllinie zeigt ein geringeres Wachstum. Eine Vitalität von mehr als 50 % konnte nach der sechsten Passage nicht erreicht werden. Die maximal erreichte Zelldichte lag bei $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml, während die maximale Zelldichte der untransfizierten Zellen bei $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml liegt (Daten nicht gezeigt). Die Transfektion der Zellen mittels dieser Methode hat sehr viele Veränderungen der Zellen auf

molekularbiologischer Ebene zur Folge. Diese Veränderungen können unter anderem eine Erklärung für das heterogene Wachstumsverhalten der Zellen sein. Es finden sich in der Literatur keine Hinweise darauf, ob auch das TGF- β 1 selbst einen zusätzlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der CHO-Zellen haben könnte.

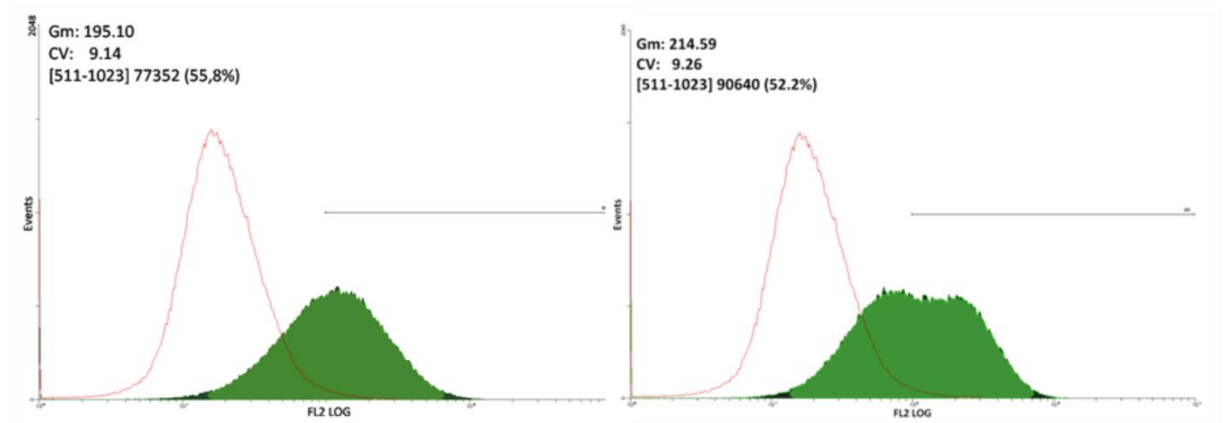


Abbildung 4.15: Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der TGF- β 1 positiven Zellen (Bereich der grünen Kurve unterhalb des Markers M1) im Vergleich zu CHO-SFS nicht transduzierten Zellen als Negativkontrolle (weiß) für die Zelllinien TGF- β 1100 (links) und TGF- β 1250 (rechts).

Die Zellen der zweiten Zelllinie, TGF- β 1²⁵⁰ zeigten ebenfalls eine geringere Zelldichte als die untransfizierte CHO^{SFS}-Zellen (10^6 Zellen/ml), allerdings konnte eine Vitalität von über 80% während der Kultivierung über sieben Passagen konstant gehalten werden. Wie aus den Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14 hervorgeht, konnte bei dieser Zelllinie lediglich die Expression, nicht aber die Sekretion des Proteins detektiert werden. Um dieses Ergebnis präzisieren zu können, wurden die Zellen der TGF- β 1²⁵⁰-Zelllinie in 100 ml Schüttelkolben kultiviert. Zur Bestimmung der Expression wurde eine Probe zu Beginn und am Ende der Kultivierung (vier Tage später) entnommen und eine intrazelluläre Färbung mit der Kombination aus einem mouse-anti-His-tag und einem goat-anti-mouse-PE Antikörper und 10^6 Zellen der jeweiligen Proben durchgeführt. Die in

Abbildung 4.16 gezeigten Ergebnisse bestätigen die kontinuierliche Produktion des TGF- β 1 während der Kultivierung. Es konnte festgestellt werden, dass der prozentuale Anteil TGF- β 1-produzierender Zellen im Verlauf der Kultivierung zugenommen hat. So waren es am Anfang der Kultivierung 58 % und am Ende der Kultivierung 77 % produzierende Zellen.

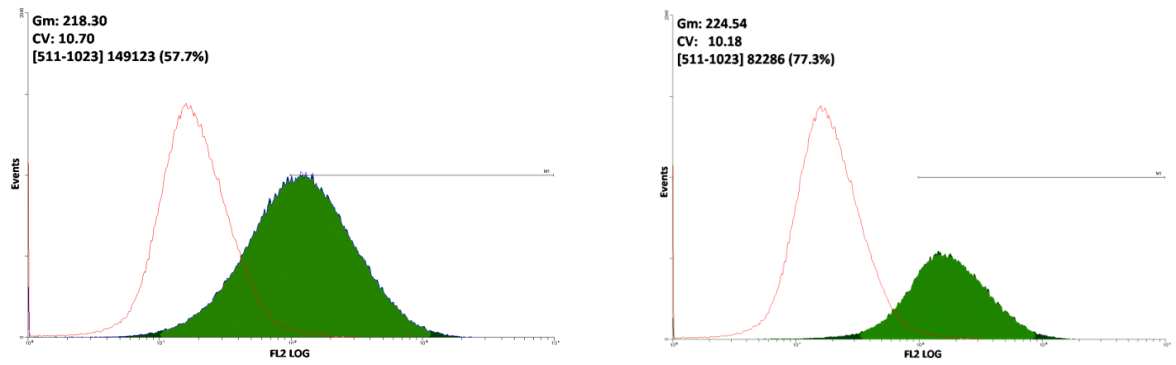


Abbildung 4.16: Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils der TGF-β1250 positiver Zellen (Bereich der grünen Kurve unterhalb des Markers M1) im Vergleich zu untransfizierten CHOFS-Zellen (weiß). Anfang der Kultivierung (links) und Ende der Kultivierung (rechts).

Parallel dazu wurde die Sekretion des TGF-β1 über Western Blot mit Anti-His-tag Antikörper untersucht. Hierfür wurden jeweils 1 ml Kulturüberstand und der Aufschluss der entsprechenden Menge Zellen (10^6 Zellen) (zu Beginn und am Ende der Kultivierung) per TCA-Fällung aufkonzentriert (Abbildung 4.17).

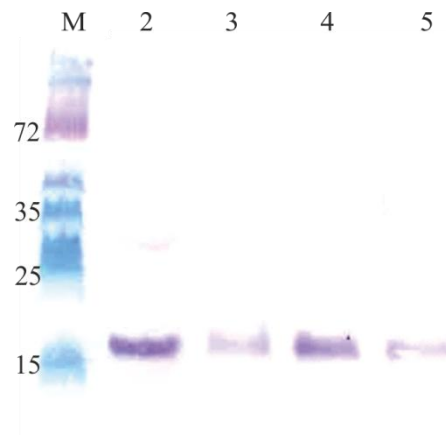


Abbildung 4.17: Ergebnisse des Western Blots der durchgeführten Kultivierung für CHO-TGF-β1250. (M: Marker, 2: Zellaufschluss zu Beginn der Kultivierung, 3: Zellüberstand zu Beginn der Kultivierung, 4: Zellaufschluss am Ende der Kultivierung, 5: Zellüberstand am Ende der Kultivierung).

Der Nachweis des TGF-β1 gelang sowohl für den Zellaufschluss (Spur 2 und 4) als für den Überstand (Spur 3 und 5). Allerdings kann aufgrund der Stärke der Banden nicht auf eine verbesserte Sekretion des Proteins im Verlauf der Kultivierung geschlossen werden. Ein Dimer bei ungefähr 25 kDa, wie es in den Abbildungen 14 und 15 sichtbar ist, war ebenfalls zu erwarten. Dass dieses nicht sichtbar war, kann damit erklärt werden, dass das TGF-β1 durch die geringere Menge an Protein bei reduzierenden Bedingungen (unter Benutzung von Mercaptoethanol und SDS) hauptsächlich als Monomer vorliegt.

4.2.5 Fazit

Ziel der in diesem Kapitel erläuterten Arbeiten war die Produktion und Sekretion des Wachstumsfaktors TGF- β 1 in einer eukaryotischen Zelllinie. Zunächst wurde ein passender Vektor konstruiert und eine geeignete Transfektionsmethode ermittelt. Weiterhin war es notwendig, eine Zelllinie zu etablieren, die das Zielprotein bei ausreichender Expression produziert und in das Medium sekretiert.

Zunächst wurde ein Vektorkonstrukt für die Produktion von TGF- β 1 erstellt und in *E. coli* produziert. Die Sekretion des Proteins wurde für dieses Plasmid durch Verwendung des Signalpeptids von Interleukin-2 (in Folge TGF- β 1-Plasmid 1 genannt) erreicht. HEK293-Zellen wurden mit dem Plasmid mittels PEI-Ansatz transfiziert. Da das verwendete Plasmid das Markergen EGFP enthält, konnte durch den fluoreszenzmikroskopischen Expressionsnachweis des EGFP-Proteins auf eine erfolgreiche Transfektion geschlossen werden. Verifiziert wurde der Transkriptionsnachweis des Zielgens zunächst auf DNA-Ebene. Die Integration des TGF- β 1-Gens in die transienten Zellen wurde mittels PCR und Gelelektrophorese untersucht. Die Analyse der PCR-Produkte ergab eine Bande bei 150 bp, was der Größe des TGF- β 1-Gens entspricht. Zusätzlich wurde der Nachweis der Expression des TGF- β 1 auf Protein-Ebene mittels Western Blot durchgeführt. Es konnte nur eine minimale Expression des TGF- β 1 nachgewiesen werden.

Eine mögliche Abhängigkeit der Expression des Zielproteins von der Transfektionsmethode wurde durch Verwendung einer weiteren Transfektionsmethode untersucht. Nicht transfizierte HEK293-Zellen wurden lentiviral mit dem TGF- β 1-Plasmid 1 transduziert. Die Transduktion der Zellen mit dem HIV-1 basierten Virus erzielte eine höhere Expression. Die Expression des Zielproteins konnte mittels Western Blot eindeutig bestätigt werden. Allerdings wurde das Protein nur in geringen Mengen sekretiert.

Die Sekretion eines Proteins ist neben dem Signalpeptid auch von der Zelllinie und dem Zielgen selbst abhängig. Um diese beiden Aspekte zu untersuchen, wurde die CHO^{SFS}-Zelllinie, welche sich besonders für lentivirale Transduktionen eignet, ebenfalls mit dem TGF- β 1-Plasmid 1 lentiviral transduziert. Parallel wurde der Einfluss des Zielproteins auf die Expression untersucht. Hierfür wurde für weitere sieben Gene/Proteine (ANGPL-5, BMB-2, BMB-4, VEGF, Activin-A, a-FGF und b-

FGF) jeweils ein Vektor konstruiert und in CHO^{SFS}-Zellen eingebracht. In Parallelkultur wurde für jedes der acht Zielproteine Expressionsverhalten und Wachstum der Zellen bestimmt. Die Expression der Proteine wurde mittels Western Blots überprüft. Trotz identischer Vektorkonstrukte und gleicher Zelllinie wurden erhebliche Unterschiede beobachtet. Dies bestätigt, dass eine starke Abhängigkeit vom GOI/Zielprotein besteht. Nur bei fünf Zelllinien konnte eine Expression bzw. Sekretion des jeweiligen Proteins bestätigt werden. Erneut wurde TGF- β 1 hauptsächlich intrazellulär und nur in geringen Mengen im Überstand nachgewiesen. Zudem zeigten alle transduzierten Zellen ein schlechteres Wachstumsverhalten als nicht transduzierte, welches unter anderem auf die verwendete lentivirale Transfektionsmethode zurückgeführt werden kann.

4.3 Strategien zur Entwicklung eines neuen Expressionssystems

Ausgehend von vier grundlegenden Überlegungen wurden folgende Strategien zur Verbesserung der Produktion von TGF- β 1 verfolgt:

1. Entwicklung eines optimierten Expressionsvektors für TGF- β 1, welcher besser für Transfektionen in eukaryotischen Systemen geeignet ist.

Eine Expression des TGF- β 1 sowohl über eine lentivirale Transduktion, als auch über eine transiente Transfektion war mit Hilfe des verwendeten Expressionsvektors zwar möglich, jedoch mit einer sehr geringeren Ausbeute des Proteins in sezernierter Form behaftet. Daher soll ein neuer Expressionsvektor zur Produktion des TGF- β 1 konstruiert werden.

2. Adaption der adhärenenten HEK293-Zelllinie an serumreduzierte Bedingungen und Kultivierung in Suspension.

Diese Zelllinie hat sich unter Verwendung des GFP-Plasmids als geeignet für die transiente Transfektion mit einer Transfektionseffizienz von über 90 % erwiesen (Kapitel 4.1.3). Die Zellen sind leicht zu transfizieren und in der Lage, die meisten posttranslationalen Prozesse, die für die Aktivität des Zielproteins wichtig sind, durchzuführen. Für einen Scale-up ist die Kultivierung der Zellen

in Suspension essentiell. Außerdem wird durch die hohen Proteinanteile der Serumzusätze in Zellkulturmedien die Aufreinigung des Zielproteins erschwert. Daher werden in diesem Kapitel die durchgeführten Strategien zur Adaption der HEK293-Zellen an serumreduzierte Bedingungen und Kultivierung in Suspension beschrieben.

3. Testung der CHO-K1 Zelllinie als zweite Produktionszelllinie und als Alternative zur CHO^{SFS}-Zelllinie.

Eine hohe Zelldichte und stabiles Wachstum der Zellen ist für eine erfolgreiche Transfektion eine Grundvoraussetzung. Da die bisher verwendete CHO^{SFS}-Zelllinie diese Voraussetzung nicht ausreichend erfüllen konnte (Kapitel 4.2.4), wurde in Vorversuchen das Wachstumsverhalten der Zelllinien CHO^{SFS} und CHO-K1 vergleichend untersucht. Dabei zeigten die CHO-K1-Zellen ein stabileres Wachstum und wurden daher für weitere Transfektionen verwendet.

4. Transiente Transfektion der Zelllinien HEK293 und CHO-K1 mittels neuem Vektorkonstrukt.

Im Gegensatz zur lentiviralen Transduktion, die einen hohen Zeitaufwand (unter anderem durch Erstellung des Expressionsvektors und Sortierung der Zellen) benötigt, ist der transiente Transfektionsprozess (Kapitel 3.6.3) erheblich schneller durchführbar und somit für Screeningexperimente besser geeignet. Die kurze Transfektionsdauer (1-3 Tage) ermöglicht eine schnelle Evaluierung der Ergebnisse zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Weitere Transfektionen der adaptierten HEK293-Zellen und CHO-K1-Zellen werden deshalb im Folgenden transient durchgeführt. (Kapitel 4.4.3 und Kapitel 4.5.2).

4.3.1 Konstruktion des Expressionsvektors pOSG-102-TGF- β 1

Transiente Transfektion hat gegenüber stabiler Transfektion nicht nur den Vorteil einer sehr schnellen Durchführung, sondern benötigt auch vergleichsweise unkomplizierte Vektorkonstrukte. Entsprechende Vektoren bestehen aus einem viralen Promoter, einem Gen für eine Antibiotikum-Resistenz, dem Replikationsursprung der DNA sowie dem Gen des Zielproteins. Der in dieser Arbeit verwendete Expressions-

vektor zur Produktion von TGF- β 1 wurde auf Basis des StarGate[®]-Klonierungssystem (IBA GmbH, Göttingen) konstruiert.

Das Kit besteht aus zwei Vektoren (Eingangs- und Akzeptorvektor) sowie den benötigten Restriktionsenzymen und arbeitet nach dem Restriktions-Ligations-Prinzip. Im ersten Schritt (Abbildung 4.18, A) wird das Zielgen mit geeigneten Primern und Erkennungssequenzen, welche von den verwendeten Enzymen benötigt werden, mittels PCR amplifiziert. Anschließend wird mit Hilfe geeigneter Kombinasen (StarCombinase 1) das PCR-Produkt in den Eingangsvektor (Generierung des Donorvektors) integriert (Abbildung 4.18, B) und dieser Donorvektor in *E. coli* amplifiziert. Der Eingangsvektor (Abbildung 4.23) verfügt über eine Klonierungsstelle (*Cloning Site*), Restriktionsschnittstellen (XbaI und HindIII) und über eine Kanamycin-Resistenz (Selektionsmarker).

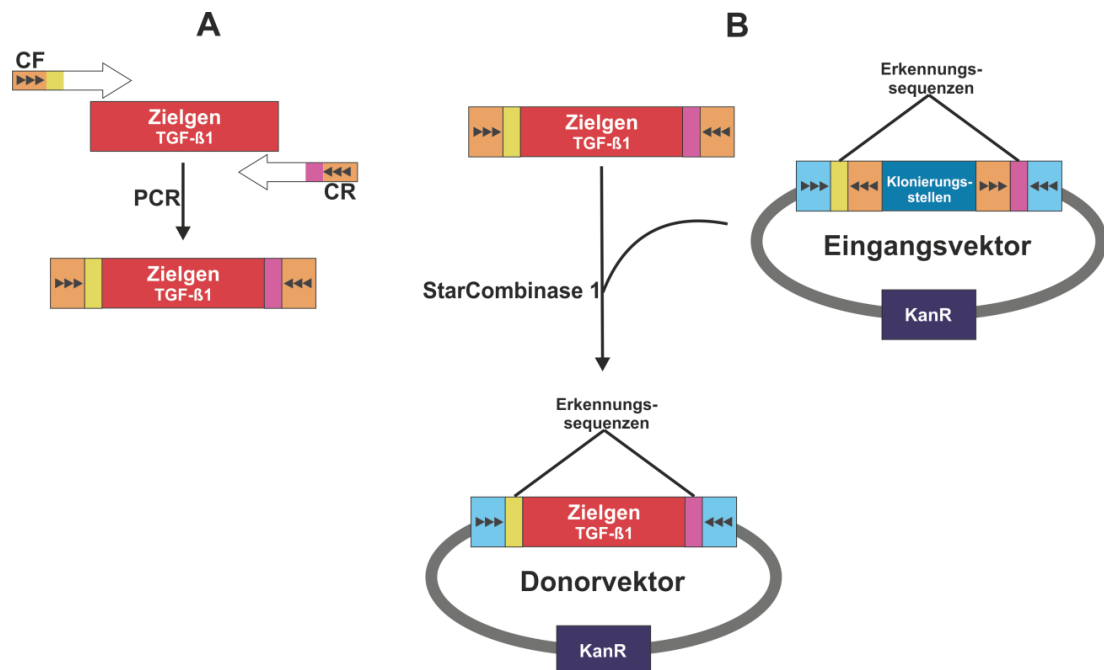


Abbildung 4.18: Schematische Darstellung der Generierung des Donorvektors. A: Das Zielgen TGF- β 1 wird im ersten Schritt mittels PCR und geeigneten Primern mit den Erkennungssequenzen flankiert. B: PCR-Produkt und Eingangsvektor werden an spezifischen Restriktionsschnittstellen (orange-markiert) mittels StarCombinase 1 spezifisch geschnitten und anschließend ligiert. CF: Forward-Primer; CR: Reverse-Primer. Abbildung adaptiert von der StarGate-Instruction manual der Firma iba, www.stargate.com.

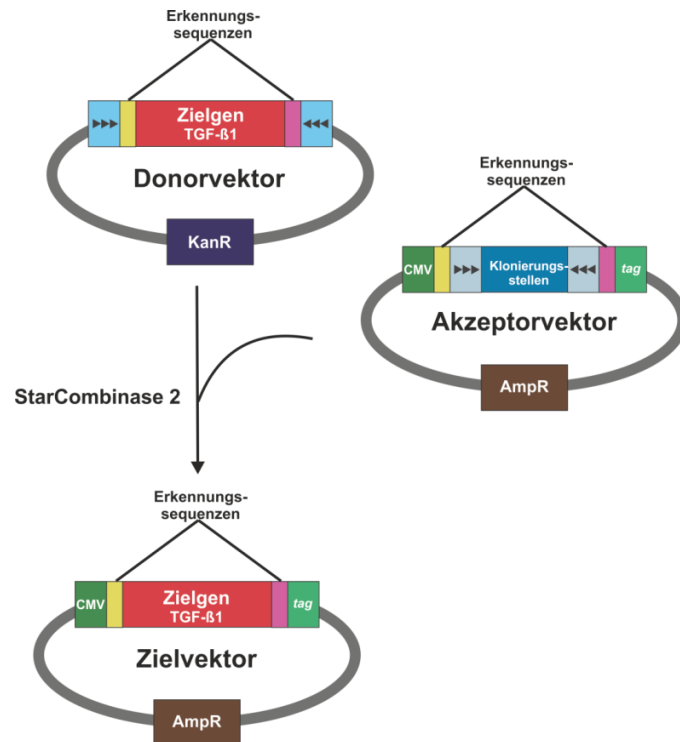


Abbildung 4.19: Schematische Darstellung der Generierung des Zielvektors. Das Zielgen aus dem Donorvektor wird erneut über das Restriktions-Ligations-Prinzip mit Hilfe von StarCombinase 2 in den Akzeptorvektor eingefügt. Der Zielvektor beinhaltet das Zielgen und kann als eukaryotischer Expressionsvektor verwendet. Abbildung adaptiert von der StarGate-Instruction manual der Firma iba, www.stargate.com.

Nach der Amplifikation und Aufreinigung des Donorvektors wird das Zielgen im zweiten Schritt vom Donorvektor nach demselben Prinzip in den Akzeptorvektor übertragen (Abbildung 4.19). Anschließend erfolgt die Amplifikation des Akzeptorvektors in *E. coli* sowie die Aufreinigung des Vektors. Die wesentlichen Elemente des in dieser Arbeit für eukaryotische Zellen verwendeten Akzeptorvektor, pOSG-IBA (Abbildung 4.20) sind der CMV-Promoter (aus dem humanen Cytomegalievirus), welcher eine effiziente Expression in eukaryotischen Systeme auf hohem Level ermöglicht [13, 67], das Gen für Ampicillin-Resistenz (bakterieller Selektionsmarker) und der bakterielle und eukaryotische Replikationsursprung der DNA (*Origin of Replication*, oriP und CoIE1 ori). Die Expressionskassette ist bei diesem Vektor so konstruiert, dass das eingefügte Zielgen als Fusionsprotein mit einer N-terminalen BM40-Signalsequenz gebildet wird, um eine Sekretion zu ermöglichen. Zwischen Signalsequenz und Zielgen befindet sich eine *Cleavage site*, über welche die Signalsequenz abgespalten wird. C-terminal ist das Fusionsprotein mit einem Twin-Strep-tag (3 kDa) versehen, welcher eine schnelle und einfache Einschnitt-Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie ermöglicht. Der Vektor besitzt

zusätzlich ein Intron in der 5'-UTR. Introns als RNA-Prozessierungselement steigern die Genexpression durch eine effizientere Transkription, erhöhte RNA-Stabilität und ein beschleunigtes Ausschleusen der RNA ins Cytoplasma [32, 71]. Zudem sorgen die am Exon-Intron-Grenzkomplex beteiligten Proteine dafür, dass die Translation verbessert wird [37, 68].

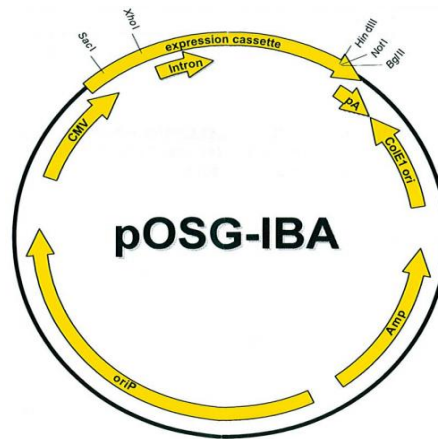


Abbildung 4.20: Schematischer Aufbau eines pOSG-IBA-120 Vektors (übernommen von der Firma IBA-Solutions for Life Sciences³).

4.3.1.1 Amplifikation des TGF- β 1 mittels PCR

Um das TGF- β 1-Gen zur Klonierung in den Eingangsvektor bereitzustellen, wurde die TGF- β 1-Gensequenz aus dem bereits in Kapitel 4.2 bereits beschriebenen Vektor amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden basierend auf den Sequenzen des TGF- β 1 mittels *star primer designer* entworfen.

Optimierungen

Um die optimalen Anlagerungstemperaturen für das Primerpaar zu ermitteln, wurden zunächst mehrere Optimierungsversuche mittels PCR durchgeführt. Hierfür wurden mit einer Gradienten-PCR (49-70 °C) unterschiedliche Plasmidkonzentrationen (2-10 ng) und verschiedene Zyklenzahlen (25-35 Zyklen) getestet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden per Agarosegel analysiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Nur bei einer Plasmidkonzentration von 10 ng und einer Zyklenanzahl von 35 konnten Banden der erwarteten Größe bei ca. 335 bp nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.21). Die Anlagerungstemperatur hatte dabei keinen Einfluss, da bei allen verwendeten Temperaturen Banden nachgewiesen werden konnten.

³www.stargate.com

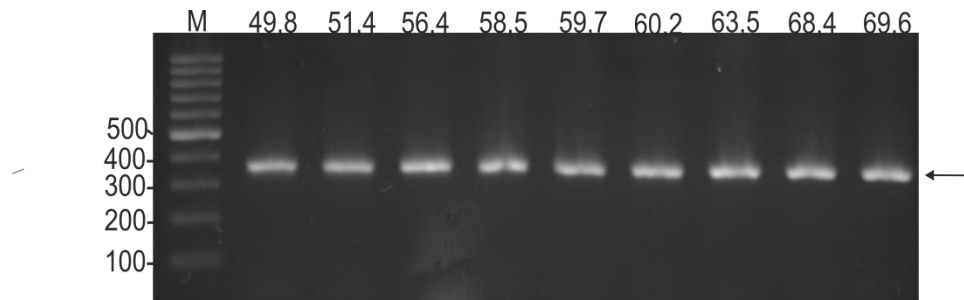


Abbildung 4.21: Agarosegel des Optimierungsexperiments für 10 ng Template und 35 Zyklen. Die Proben wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. (M: Marker; angegeben sind die Temperaturen in °C und die Größen in bp).

Für die folgenden Amplifikationen wurde eine Zyklenanzahl von 35, eine Temperatur von 58 °C sowie eine DNA-Menge von 10 ng eingesetzt.

4.3.1.2 Generierung des Donorvektors pENTRY-IBA-51-TGF- β 1

Um das TGF- β 1-Gen zu amplifizieren und anschließend den Donorvektor pENTRY-IBA-51-TGF- β 1 zu generieren, wurde die PCR unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Für die PCR wurde Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Die Polymerase bietet eine hohe Temperaturstabilität und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche eine Korrekturaktivität (*proof reading*) erlaubt. Das PCR-Produkt der erwarteten Größe bei 335 bp wurde in allen Ansätzen erfolgreich amplifiziert (Abbildung 4.22).

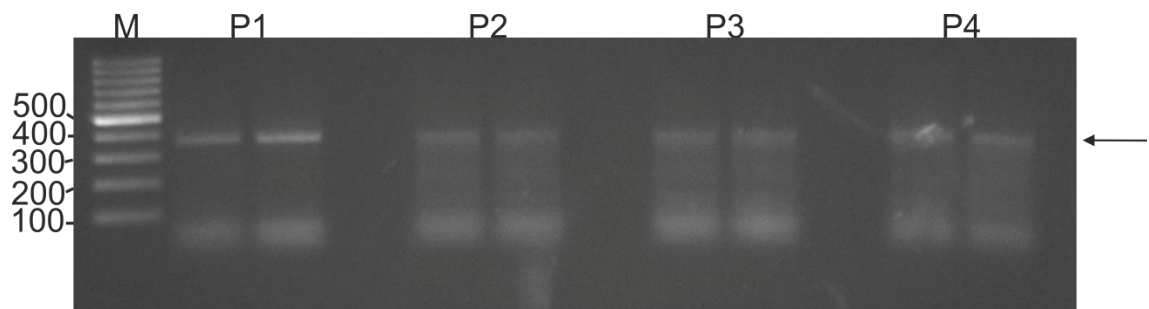


Abbildung 4.22: Amplifikation des TGF- β 1-Gens mittels PCR unter optimierten Bedingungen. P 1-4: Proben der PCR-Produkte. Die Proben wurden doppelt aufgetragen und auf einem 1,5%igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt.. (M: Marker; angegeben sind die Temperaturen in °C und die DNA-Fragmentgrößen in bp).

Die DNA des TGF- β 1-Gens wurde anschließend aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) aufgereinigt (siehe Abschnitt B.5.9) und densitometrisch quantifiziert (siehe Abschnitt B.2.2).

Entsprechend den Herstellerangaben (siehe Abschnitt B.5.12) wurden TGF- β 1-DNA zusammen mit dem pENTRY-51-IBA-Eingangsvektor (Abbildung 4.23) und der entsprechenden Enzym-Lösung (StarCombinase 1) zur Generierung des Donorvektors gemischt und für 1 h bei 30 °C inkubiert.

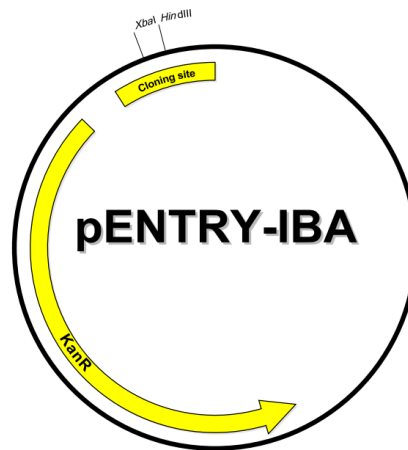


Abbildung 4.23: Vektorkarte des Eingangsvektors pENTRY-51. (übernommen von der Firma IBA-Solutions for Life Sciences⁴).

Zur Amplifikation des Plasmids wurden kompetente *E. coli* OneShot[®] TOP10-Zellen (Life Technologies) transformiert. Zur Kontrolle der Transformation wurden die Bakterien auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Insgesamt 17 Einzelkolonien wurden entnommen und im 100 ml Schüttelkolben mit kanamycinhaltigem LB-Medium für 12 h bei 37 °C kultiviert. Mittels des QIAGEN Plasmid Purification Midi Kits (Qiagen GmbH) wurde das Plasmid aufgereinigt.

Restriktionsverdau

Anschließend wurde ein analytischer Restriktionsverdau aller Amplifikationsansätze mit XbaI und HindIII durchgeführt (siehe Abschnitt B.5.6). Erwartet wurde ein Fragment der Größe des PCR Produktes (335 bp) plus 40 Basenpaare (Bereich aus dem Plasmid vor und nach des GOI). Dies ergibt eine Gesamtgröße von 375 bp. Abbildung 4.24 zeigt die Ergebnisse des Restriktionsverdaus.

⁴www.stargate.com

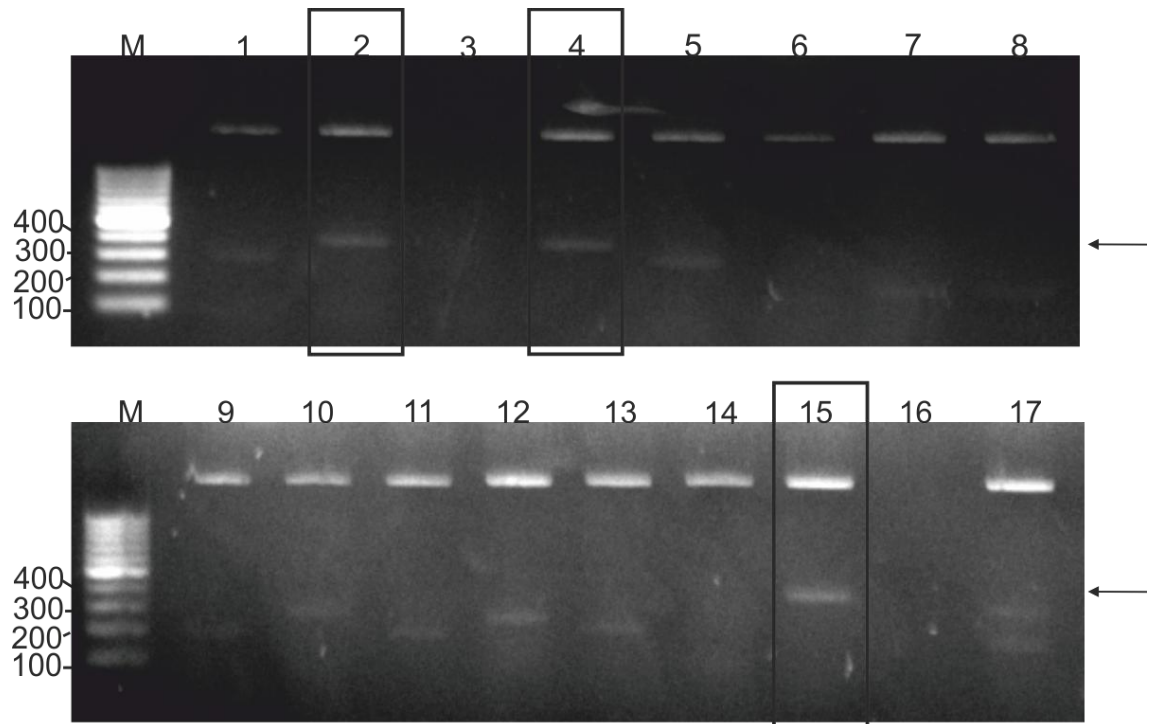


Abbildung 4.24: Analytischer Restriktionsverdau der aufgereinigten Plasmide. Die aufgereinigten Plasmide wurden mit XbaI und HindIII geschnitten und die verdauten Proben auf einem 1,5 %igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Positiv sind die Kulturen 2,4 und 15, welche die erwartete Bande bei 400 bp aufwiesen. M: Marker; 1-17: Probe des Restriktionsanalyse der Kulturen 1 bis 17.

In drei Ansätzen wurde das Zielfragment TGF- β 1 erfolgreich in den Vektor integriert (Bande bei 375 bp in Probe 2, 4 und 15, Abbildung 4.24). Um mögliche Mutationen erkennen zu können, wurden die Plasmide sequenziert (siehe Abschnitt B.5.10). Die Auswertung der Sequenzdaten ist in Abbildung 4.25 zusammengefasst. Mittels Sequenzalignment wurden die Sequenzdaten der Proben 2, 4 und 15 sowie die Sequenzen von TGF- β 1 miteinander verglichen. Mutationen der Zielsequenz konnten bei Klon K4 an der Base 2717 (Abbildung 4.25, B) und bei Klon K15 zwischen den Basen 2683 und 2702 (Deletion) (Abbildung 4.25, C) nachgewiesen werden. Das Plasmid aus Klon K2 ist frei von Mutationen und wurde für die Generierung des Zielvektors verwendet.

EXPERIMENTELLER TEIL

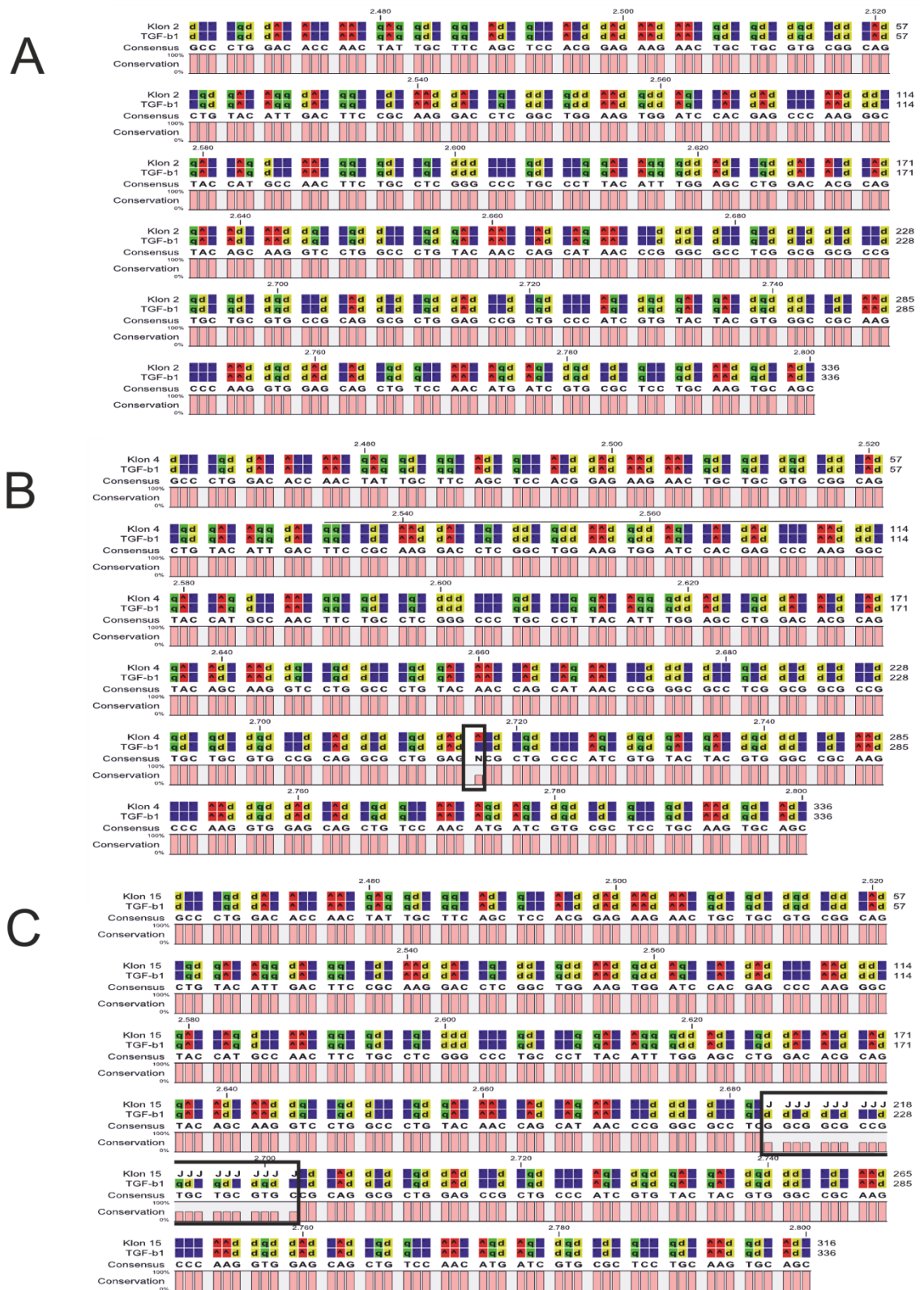


Abbildung 4.25: Alignment der Nukleinsäuresequenzen der positiven Klone. Aufgelistet ist die TGF-β1-Sequenz (2464 bis 2800 bp) aus dem Plasmid TGF-β1-DHFR-EGFP sowie die drei untersuchten Klone K2, K4 und K15. Das Plasmid aus Klon K2 ist mit TGF-β1-Sequenz identisch und wurde im weiteren Verlauf verwendet. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit dem CLC-sequence Viewer von CLC bio, a QIAGEN Company ausgewertet.

4.3.1.3 Generierung des Zielvektors pOSG-IBA-102-TGF- β 1

Ausgehend vom Donorvektor wurde der Zielvektor pOSG-IBA-102-TGF- β 1 generiert. Die Klonierung erfolgte analog zu Kapitel 3.3.1.2 für 1 h bei 37 °C (siehe Abschnitt B.5.12). Zur Kontrolle der Transformation wurden die *E. coli*-Zellen auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und inkubiert. Ein Wechsel der Antibiotikaresistenz sorgt dafür, dass der Donorvektor (Kanamycin-Resistenz) nicht weiter transformiert wurde (Abbildung 4.26).

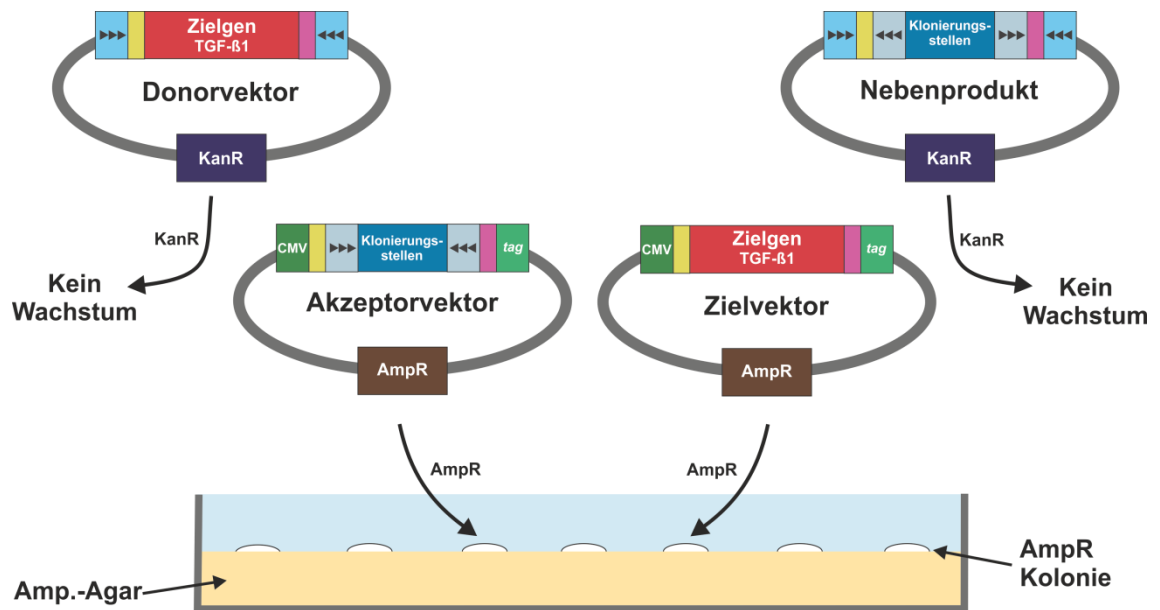


Abbildung 4.26: Schematische Darstellung der Transformation des Zielvektors pOSG-IBA-102-TGF- β 1. Abbildung adaptiert von der StarGate-Instruction manual der Firma iba, www.stargate.com.

Das Plasmid wurde mit dem QIAGEN Plasmid Purification Midi Kit (Qiagen GmbH) aufgereinigt. Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau mit XhoI und HindIII durchgeführt. Erwartet wurde ein Fragment der Größe von 465 bp für den unveränderten Akzeptorvektor bzw. von 800 bp für den Zielvektor (TGF- β 1-Gen (335 bp plus 465 bp)). Abbildung 4.27 zeigt das erwartete Fragment mit einer Größe von 800 bp und bestätigt die erfolgreiche Klonierung.

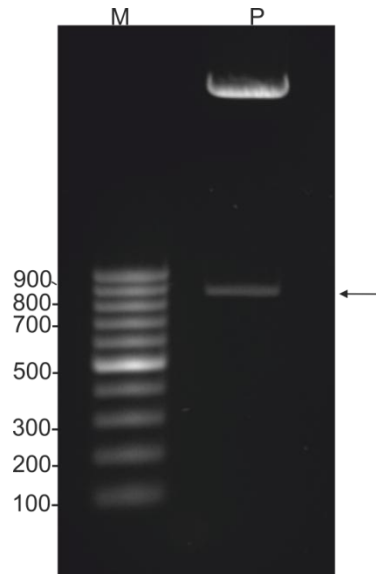


Abbildung 4.27: Analytischer Restriktionsverdau des aufgereinigten TGF- β 1-Zielpasmids. Das Plasmid wurde mit XhoI und HindIII geschnitten und die Fragmente auf einem 1,5 %igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. M = Marker, Spur P = Probe.

4.3.2 Fazit

Das Zielgen TGF- β 1 wurde erfolgreich als Fusionsprotein in ein Vektorkonstrukt integriert. Das Konstrukt beinhaltet die erforderlichen Bausteine (Kapitel 4.3.1) für eine erfolgreiche transiente Transfektion des Zielgens in eukaryotische Systeme. Die N-terminale Signalsequenz (BM40) soll die Sekretion des Zielproteins und das C-terminale Twin-Strep-Tag die Aufreinigung des Proteins über eine affinitätschromatographische Methode ermöglichen (Abbildung 4.28). Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus stellen durch die Übereinstimmung der erwarteten und der tatsächlich detektierten DNA-Fragmente eine Bestätigung für die erfolgreich durchgeführte Transformation dar. Eine Bestätigung, dass das Plasmid mutationsfrei ist, erfolgte durch seine Sequenzierung.

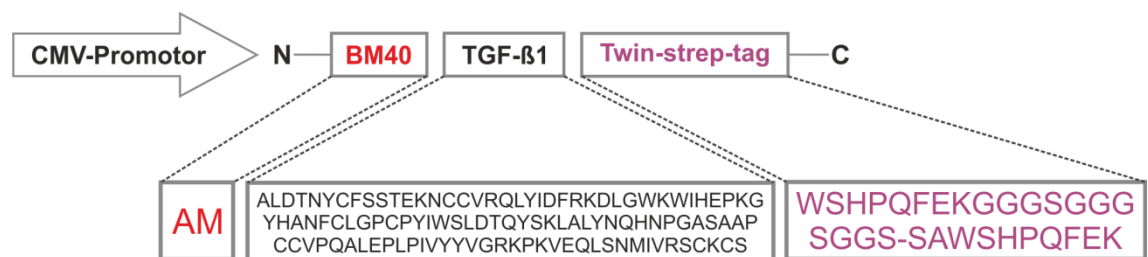


Abbildung 4.28: Vereinfachte Darstellung der Expressionsregion des Zielvektors mit den wichtigsten Elementen und die dazugehörigen Aminosäuresequenzen.

4.4 HEK293-Zellen (human embryonic kidney)

Nach der Bereitstellung des Plasmids (siehe Kapitel 4.3) wurde die Transfektion der HEK293-Zellen zur Produktion von TGF- β 1 durchgeführt. Die Ergebnisse von Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 zeigten eine erfolgreiche transiente Transfektion HEK293-Zellen. Diese Zellen werden üblicherweise als adhärenente Kulturen geführt. Da aber für einen Scale-up die Kultivierung der Zellen in Suspension essentiell ist, werden in diesem Kapitel erste Strategien zu Kultivierung der HEK293-Zellen in Suspension gezeigt (Kapitel 4.4.1), bevor deren Transfektion mit dem TGF- β 1 Plasmid im darauf folgenden Kapitel erläutert wird. Darüber hinaus werden die Zellen auf möglichst serumfreie Kultivierung adaptiert (4.4.2). Dieser Schritt soll die spätere Aufreinigung des gewünschten Zielproteins erleichtern. Anschließend werden die Zellen mit dem pOSG-IBA-102-TGF- β 1 transient transfiziert (Kapitel 4.4.3).

4.4.1 Adaption an Kultivierung in Suspension

Für die Kultivierung der Zellen in Suspension wurden die Zellen in Schüttelkolben (100 ml) mit einer Zelldichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml und einem maximalen Arbeitsvolumen von 50 ml kultiviert. Nach vier Tagen in der Kultur mussten die Zellen passagiert werden, da die Zellen mit weiterhin zunehmender Zellzahl zur Aggregatbildung tendierten.

Zu Beginn der Kultivierung wurden die Zellen mit einer Drehzahl von 130 rpm in Suspension gehalten. Die Drehzahl wurde im Laufe der Passagen auf 160 rpm erhöht um die Aggregatbildung zu vermindern. In Abbildung 4.29 sind lichtmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen vor und während der Adaption im Verlauf der Kulturpassagen dargestellt. Nach der dritten Passage (Abbildung 4.29, B-3) wurde eine Erhöhung des Anteils der Suspensionszellen beobachtet, wohingegen der Anteil der Zellaggregate abnahm. Eine deutliche Abnahme der Aggregationsbildung wurde ab der vierten Passage beobachtet (Abbildung 4.29, B-4 und B-5). Die Vitalität lag über die gesamten Passagen über 90%. Die Erhöhung der Drehzahl hatte demzufolge keinerlei negative Auswirkung auf die Zellen.

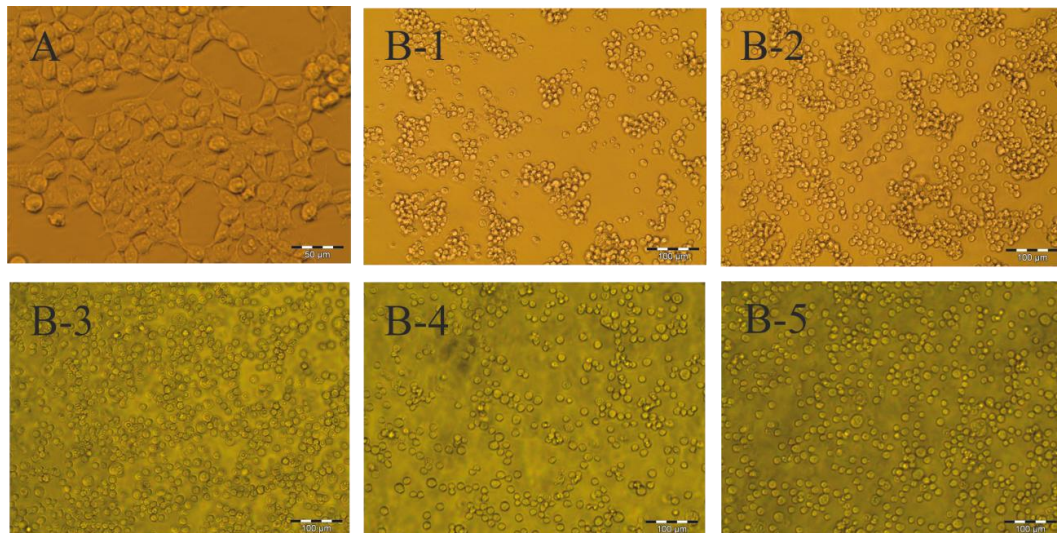


Abbildung 4.29: Lichtmikroskopische Aufnahmen der HEK293-Zellen vor (A) und während der Adaption an Suspensionsbedingungen (B). Die Zahlen 1-5 geben die Zahl der Passagen an. Der Maßstab zeigt 50 µm (A) und 100 µm (B 1-5).

Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde daraufhin charakterisiert und mit der Ursprungszelllinie verglichen. Hierfür wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Über einen Zeitraum von acht Tagen wurden beide Zelllinien kultiviert und die Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.30 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Suspensionszelllinie im Vergleich zur Ursprungszelllinie ein vergleichbares Wachstumsverhalten aufweist. Ein negativer Einfluss der Umstellung der Zellkultivierung auf das Wachstum der Zellen ist hiermit auszuschließen. Von der gewonnenen Zelllinie wurden anschließend Masterzellbänke und Arbeitszellbänke erstellt, die für die nächsten Versuche verwendet wurden.

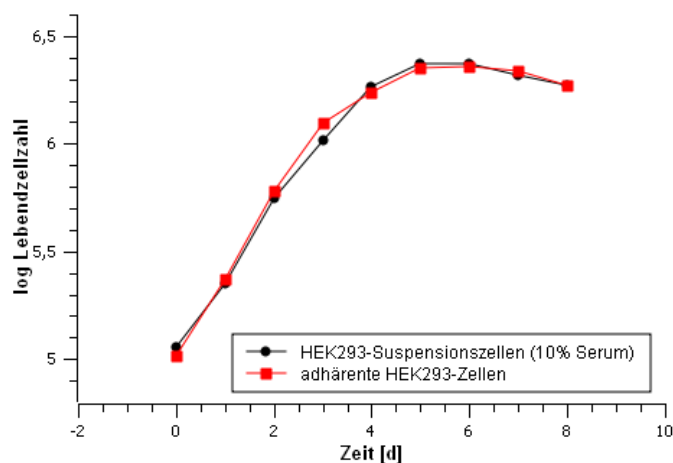


Abbildung 4.30: Charakterisierung von HEK293-Zellen kultiviert im Schüttelkolben und in der T-Flasche. Beide Zelllinien wurden in 50 ml DMEM-Medium mit einem Serumanteil von 10% kultiviert. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus einer zweifachen Bestimmung.

4.4.2 Adaption an serumreduzierte Kultivierung

Für ein schnelles Wachstum vieler Zelllinien ist das Kultivieren in serumhaltigem Medium essentiell. Entsprechende Medien beinhalten eine komplexe Mischung von Hormonen und Wachstumsfaktoren, welche die Aufreinigung der Zielproteine technisch sehr aufwändig macht. Die Reduzierung des Serumgehalts wäre für eine kostengünstige und schnelle Aufreinigung somit von Vorteil. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Abwesenheit des Serums die Effizienz der ausgesuchten transienten Transfektionsmethode nicht beeinflusst. Chemischen Methoden (z.B. die CaPO_4 -Methode) können in Abwesenheit des Serums schlechtere Ergebnisse aufweisen [21]. Welche Rolle das Serum genau für den Erfolg der Transfektion spielt, ist noch nicht geklärt. Ein Einfluss des Serums auf die in dieser Arbeit verwendete Transfektion mit PEI ist jedoch nicht bekannt.

Zur Adaption der Zellen an serumreduzierte Bedingungen gibt es zwei mögliche Adaptionsarten. Bei der direkten Adaption werden die Zellen in ein serumfreies Medium überführt und unter den neuen Bedingungen kultiviert. Zahlreiche Medien wurden zu diesem Zweck entwickelt. Sie sind allerdings preislich teuer und für eine Kultivierung und anschließende Transfektion im großen Maßstab ungeeignet. Eine kostengünstigere Variante bietet die sequentielle Adaptionsmethode (siehe Abschnitt B.1.7), bei der der Serumanteil in dem verwendeten Medium stufenweise reduziert wird. Der Anteil wird so weit abgesenkt, dass der Gehalt möglichst gering ist, jedoch die Vitalität der Zellen nur geringfügig beeinflusst wird.

Zur Adaption wurden die HEK293-Zellen aus dem Kapitel 4.4.1, welche in Suspension kultiviert werden, verwendet. Die Zellen wurden in Schüttelkolben (50 ml) in einem Arbeitsvolumen von 25 mL und mit einer Animpfdichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml kultiviert. Der Serumanteil betrug 10 %. Nachdem die Zellen eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ml erreicht hatten, wurden sie in neues Medium mit 7,5 % Serumanteil umgesetzt. Der Serumanteil wurde nach vier weiteren Passagen auf 5 % reduziert, da ab diesem Zeitpunkt die Vitalität der Zellen bei über 90 % konstant gehalten werden konnte. Eine Übersicht des reduzierten Serumanteils sowie die Anzahl der Passagen während der Kultivierung in einem Medium bestimmten Serumanteils sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst. Es wurden insgesamt drei Zelllinien mit einem Serumgehalt von 5, 2,5 und 1 % des Gesamtvolumens gewonnen. Für alle diese Zelllinien wurden Master- und Arbeitszellbänke erstellt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 4.1: Darstellung der Arbeitsschritte zur Serumanteilreduzierung für die Kultivierung von HEK293-Zellen.

Reduzierschritt	Serumanteil [%]	Anzahl der Passagen	Vitalität [%]
1	7,5	4	≥ 95
2	5	4	≥ 90
3	2,5	8	≥ 90
4	1	8	≥ 90

Weiter gearbeitet wurde mit der Zelllinie mit dem geringsten Serumanteil (1 %). Um zu überprüfen, wie sich das Wachstumsverhalten mit der geringeren Menge an essentiellen Proteinen, die unter anderem für die Proliferation wichtig sind, ändert, wurde nach zwei weiteren Passagen der Kultivierung unter reduziertem Serumanteil eine Wachstumskurve aufgenommen. Die Zellen wurden hierbei in 50 ml Schüttelkolben und 25 ml Arbeitsvolumen bei 160 rpm kultiviert. Die Zelllinie mit dem Serumanteil von 1 % wurde mit der Ausgangszelllinie (HEK293-Zellen in Suspension und 10 % Serumanteil) verglichen (Abbildung 4.31).

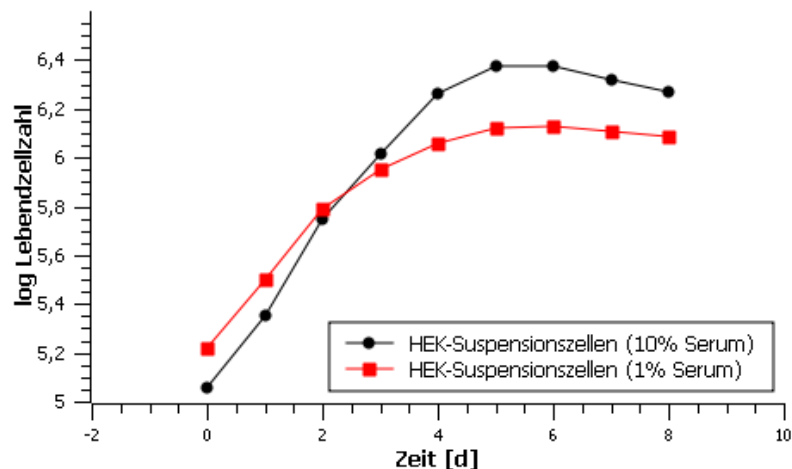


Abbildung 4.31: Charakterisierung von HEK293-Zellen kultiviert mit unterschiedlichen Serumanteilen. Beide Zelllinien wurden in DMEM-Medium mit einem Serumanteil von 1% (rote Kurve) sowie 10% (schwarze Kurve) kultiviert.

Es ist zu erkennen, dass die HEK293-Suspensionszellen ein stärkeres Wachstum bei der Kultivierung der Zellen mit höherem Serumanteil aufweisen. Auch die maximale Zelldichte liegt in diesem Fall deutlich höher. Während der Kultivierung war ebenfalls zu beobachten, dass die Zellen, die mit geringerem Serumanteil kultiviert wurden, zu Aggregatbildung tendieren (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt war bereits nach dem

dritten Kultivierungstag zu bemerken und verstärkte sich bis zum sechsten Tag. Dies ist vermutlich die Ursache für die Verschlechterung der Vitalität der Zellen.

4.4.3 Transfektion der adaptierten Zellen

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob die Adaption einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz und die Vitalität der Zellen hat. Hierfür wurden die Zellen mit dem pEGFP-N1-Plasmid unter den in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen optimierten Bedingungen für eine PEI-Transfektion in 6-Lochplatten transfiziert. Als Kontrolle wurden die nicht adaptierten adhärenenten HEK293-Zellen parallel unter den gleichen Bedingungen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz mikroskopisch untersucht (Abbildung 4.32). Die erzielte Transfektionseffizienz von 80% bei suspendierten sowie 91 % bei adhärenenten HEK293-Zellen zeigt, dass die Adaption an die neue Bedingungen zu wesentlich geringen Transfektionseffizienz der Zellen führte.

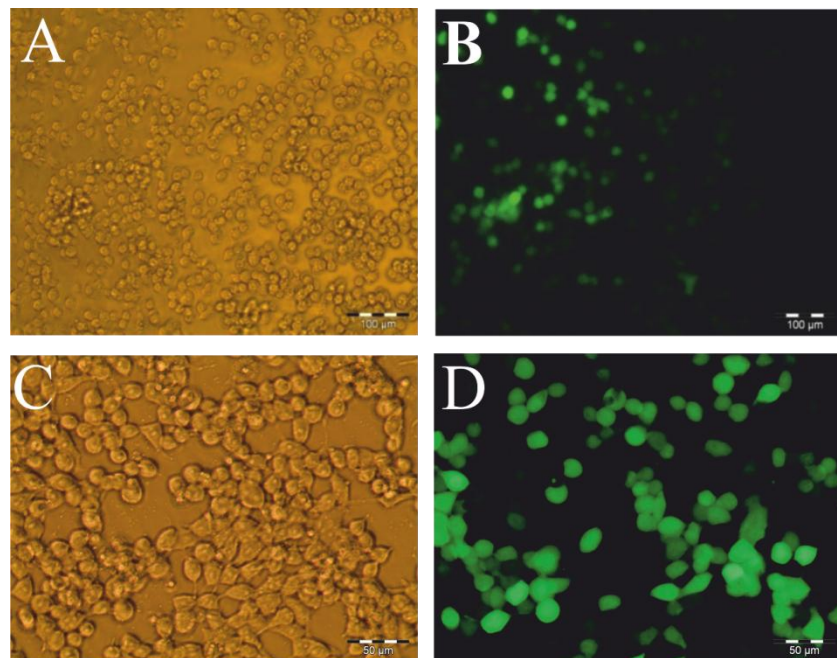


Abbildung 4.32: Mikroskopische Aufnahmen mittels PEI transfizierter HEK293-Zellen :Oben: adaptierte Suspensionszellen (1% Serumanteil), Unten: adhärenente Zellen (10% Serumanteil). A und C Hellfeldaufnahme, B und D Fluoreszenzaufnahme. Der Maßstab zeigt 100 µm (A und B) und 50 µm (C und D).

In einem weiteren Schritt wurden die adaptierten Zellen mit dem entwickelten Plasmid (Kapitel 4.3.1) zur Produktion des TGF- β 1 mittels PEI transfiziert. Das Plasmid wurde in kompetente *E. coli* OneShot® TOP10-Zellen amplifiziert. Die

erhaltenen Kolonien wurden verwendet um 2 L-Flüssigkultur anzupflanzen. Das Plasmid wurde mittels QIAGEN Plasmid Purification Mega Kit (siehe B.5.8) aufgereinigt. Die Quantifizierung mit dem Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 ergab eine Plasmid-Gesamtmenge von 3,9 mg, welche für die geplanten Transfektionsexperimente ausreichend ist.

Die HEK293-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml und einem Arbeitsvolumen von 30 ml in Schüttelkolben kultiviert. Die Transfektion wurde mit einem DNA-Reagenz-Verhältnis von 1:2 durchgeführt. Die Kultivierung wurde über sechs Tagen durchgeführt. Der Nachweis der Sekretion des Zielproteins erfolgte mittels Western Blot der Kulturüberstände mit einem TGF- β 1-spezifischen Antikörper. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.33 dargestellt. Dazu wurden während der Kultivierung jeweils 500 μ L Überstand pro Tag entnommen und mittels TCA-Fällung aufkonzentriert. Als Negativkontrolle wurde eine äquivalente Menge Überstand der untransfizierten HEK293-Zellen (Abbildung 4.33, N) aufgetragen. Das kommerzielle TGF- β 1 (Dianova) diente als Positivkontrolle (Abbildung 4.33, P) aufgetragen. Der Western Blot bewies, dass die Zellen das Zielprotein sezernieren. Die Bande für das TGF- β 1 als Monomer liegt bei ungefähr 15 kDa. Die weitere Bande unterhalb von 35 kDa ist dem TGF- β 1-Dimer zuzuordnen. Die Proteinproduktion war ab dem vierten Tag messbar (Abbildung 4.33, 4). Anschließend nahm die Sekretion wieder ab. Die unterschiedlichen Größen des exprimierten und kommerziellen TGF- β 1 (Abbildung 4.33, 4 und P) wurden durch einen unterschiedlichen Glykosylierungsgrad und eine unterschiedliche Wirtszelllinie (Das kommerzielle TGF- β 1 wurde aus CHO-Zellen isoliert) verursacht.

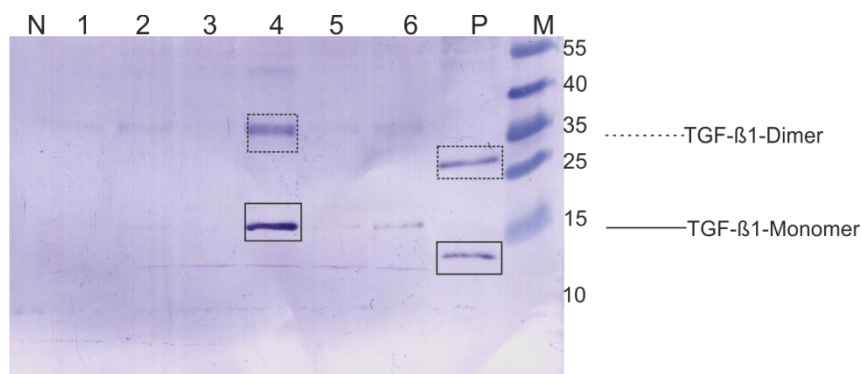


Abbildung 4.33: Ergebnis des Western Blots der Überstände während der sechs Tage Kultivierung der adaptierten HEK293-Zellen. Die Zahlen 1-6 geben an, wie viele Tage zuvor die Transfektion stattgefunden hat. (N: Negativkontrolle; P: Positivkontrolle; M: Marker).

Die Transfektion führte zu einer Wachstumsinhibierung und zu einer Verschlechterung der Vitalität der Zellen (<50 %). Das könnte bedeuten, dass die Zellen durch die zusätzliche Proteinproduktion am Anfang der Kultivierung mehr Energie verbraucht haben, was einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum zur Folge hatte. Die Zellen sind während der Produktion des TGF- β 1 nicht gewachsen und die Zelldichte blieb konstant. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm die Sekretion des TGF- β 1 ab. Es lässt sich vermuten, dass dieses zum einen auf Grund eines Verlusts der übertragenen DNA-Moleküle durch die Zellteilung entstand. Zum anderen waren die TGF- β 1-produzierenden Zellen aufgrund des höheren Energiebedarfs nicht mehr in der Lage, sich zu teilen.

4.4.4 Fazit

HEK293-Zellen konnten erfolgreich in Suspension kultiviert werden. Ein Vergleich des Wachstumsverhaltens der adaptierten Zellen mit der Ursprungszelllinie zeigte ein ähnliches Wachstumsverhalten sowie ähnliche maximal erreichbare Zelldichten. Daraufhin wurden die Zellen in Medium mit reduziertem Serumanteil kultiviert um eine spätere Aufreinigung des Zielproteins zu erleichtern. Hierfür wurde die sequentielle Adaptionmethode verwendet. Insgesamt wurden drei Zelllinien mit einer Adaption an einen Serumgehalt von 5, 2,5 und 1 % des Gesamtvolumens etabliert. Die adaptierte Zelllinie zeigte im Vergleich zur Ursprungszelllinie ein schwächeres Wachstum und die maximale Zelldichte war niedriger.

Der Einfluss der Adaption auf die Transfektionseffizienz wurde anhand der transienten Transfektion mittels PEI untersucht. Zunächst wurden die Zellen mit einem GFP-Plasmid transfiziert. Es konnten über die lichtmikroskopischen Aufnahmen geringere Unterschiede zwischen der adaptierten Zelllinie und die Ursprungszelllinie bezüglich der Transfektionseffizienz beobachtet werden. Die zweite Transfektion für die Produktion des TGF- β 1 wurde ebenfalls mittels PEI-Methode durchgeführt. Hierfür wurde das optimierte Plasmid pOSG-IBA-102-TGF- β 1 verwendet. Die erfolgreiche Sekretion des Zielproteins wurde mittels Western Blot bestätigt. Das geringe Wachstumsverhalten während der Transfektion der Zellen zeigte, dass die Adaptionszeit (3 Monate) der Zellen an die neuen Kultivierungsbedingungen (Suspensionskultur, serumreduzierte Bedingungen) noch nicht ausreichend ist, um eine stabile

Zelllinie zu entwickeln, welche für Transfektionszwecke verwendet werden kann. Es ist eine längere Adaptionszeit notwendig, bevor eine weitere Transfektion durchgeführt werden kann. Eine optimale Nährstoffversorgung resultiert in höheren Produktionsraten und Zelldichten und führt somit zu einer gesteigerten Ausbeute des Zielproteins. Für weitere Arbeiten sollte das verwendete Plasmid, welches eine Expression bzw. Sekretion des TGF- β 1 erzielen konnte, für die Transfektion einer stabileren Zelllinie verwendet werden.

Als alternative Wirtszelllinie zur Proteinproduktion wurde für weitere Arbeiten die CHO-K1-Zelllinie genutzt. Besonders für stabile Transfektionen ist diese Zelllinie sehr gut geeignet. Bei transienten Transfektionen ist die Produktivität zwar niedriger, ihr Einsatz ist dennoch sinnvoll, da diese Zellen eine gute Adaptionsfähigkeit an serum- und proteinfreie Medien besitzen.

4.5 CHO-K1 (Chinese hamster ovary)

In den bisherigen Arbeiten (Kapitel 4.2.4) wurde die CHO^{SFS} Zelllinie (Cell Culture Service) verwendet (ein speziell für serumfreie Suspensionskultur (SFS) entwickelter Subklon der Zelllinie CHO/dhfr DUKX B11). Eine Alternative zu dieser Zelllinie, stellt die in diesem Kapitel verwendete CHO-K1-Zelllinie dar. Diese Zelllinie wurde an der Universität Bielefeld an Suspensionskultur und proteinfreies Medium adaptiert.

4.5.1 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens

Zum Vergleich des Wachstumsverhaltens beider Zelllinien wurden die CHO-K1 Zellen und die CHO^{SFS} Zellen in 250 ml Schüttelkolben über zehn Tage kultiviert. Hierbei wurden Wachstum und Vitalität über eine tägliche Zellzahlbestimmung mit dem Cedex-Cellcounter (Roche Diagnostics AG) verfolgt. Die CHO^{SFS}-Zellen wurden in ProCHO5 Medium (LONZA), die CHO-K1-Zellen parallel in Pro CHO5 sowie in TC42 (TeutoCell) kultiviert.

Die Ergebnisse (Abbildung 4.34) zeigen insgesamt, dass das Wachstum der CHO^{SFS} Zellen deutlich langsamer verlief. Die maximale Zelldichte wurde am sechsten Tag erreicht und lag bei $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml, danach nahm die Vitalität der Zellen schnell ab.

CHO-K1 Zellen erzielten hingegen eine deutlich höhere Zelldichte ($20 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit dem TC42 Medium und $9 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit dem Pro CHO5 Medium). Die Vitalität der Zellen konnte über die erste fünf Tage der Kultivierung bei ca. 99 % konstant gehalten werden. Eine Abnahme der Vitalität war erst ab dem siebten Tag zu erkennen.

Die CHO-K1 Zellen erzielten insgesamt bessere Ergebnisse bezüglich der maximalen Zelldichte und der Vitalität. Dies war unabhängig davon, in welchen Medium sie kultiviert wurden. Aus diesem Grund wird diese Zelllinie bevorzugt für weitere Arbeitsschritte verwendet, da ein stabiles Wachstum der Zellen eine wichtige Voraussetzung ist, um eine erfolgreiche Transfektion der Zellen zu erzielen.

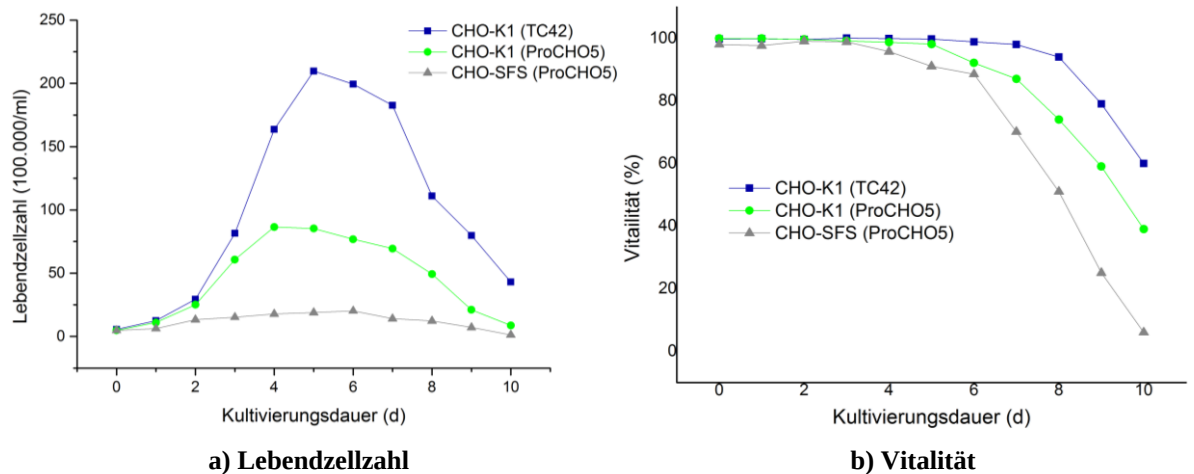


Abbildung 4.34: Lebendzellzahl und Vitalität der CHO-SFS-Zelllinie und der CHO-K1-Zelllinie. Die CHO-SFS Zellen wurden in ProCHO5 Medium kultiviert und die CHO-K1-Zelllinie wurde parallel in ProCHO5 und TC42 Medium kultiviert.

4.5.2 Transiente Transfektion der CHO-K1 Zellen

Screening nach einer geeigneten Transfektionsmethode

Es wurden verschiedene Ansätze zur transienten Transfektion der CHO-Zellen mittels Lipofektion (Lipofektamin) bzw. Polyfektion (PEI 25 kDa) (siehe Abschnitt B.1.11 und B.1.15) mit unterschiedlichen DNA-Reagenz-Verhältnis getestet. Aufgrund der einfachen und schnellen Durchführbarkeit wurde erneut das pFGP-Plasmid eingesetzt (Kapitel 4.1). Es wurde stets das 6-Loch-Platten-Format und eine Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml verwendet. Die Untersuchung der Transfektionseffizienz erfolgte schließlich mikroskopisch nach 48 h. Die GFP-Fluoreszenz war insgesamt gering

ausgeprägt. Das beste Ergebnis wurde mittels PEI-Transfektion mit einem DNA-Reagenz-Verhältnis von 1:3 nach 48 h erzielt (Abbildung 4.35) und wird demzufolge für weitere Arbeiten als Transfektionsmethode zur Transfektion der CHO-Zellen verwendet. Eine Übersicht der verwendeten DNA-Reagenz-Verhältnisse und der Ergebnisse gibt Tabelle 3.2.

Tabelle 4.2 Übersicht der getesteten Varianten zur transienten Transfektion der CHO-Zellen. Die Stärke der GFP-Expression wurde mit: -: für keine Expression +: gering, ++: medium bewertet.

Transfektionsmethode/ Transfektionsreagenz	DNA-Reagenz- Verhältnis	GFP-Expression
Lipofektion/ Lipofektamin	1:1	-
	1:2	-
	1:3	+
	1:4	-
Polyfektion/ PEI (25 kDa)	1:1	-
	1:2	+
	1:3	++
	1:4	+

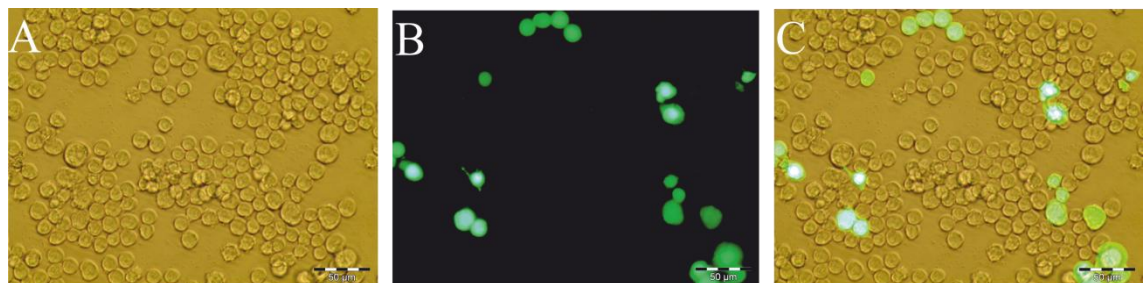


Abbildung 4.35: Mikroskopische Aufnahmen von pEGFP-N1-transfizierten CHO-K1-Zellen. Die Transfektion wurde mittels PEI-Transfektion mit einem Verhältnis von 1:3 durchgeführt. Die Mikroskopaufnahmen wurden 48 Stunden nach der Transfektion erstellt. A: Hellfeldaufnahme, B: Fluoreszenzaufnahme, C: Überlagerung der Bilder A und B. Der Maßstab zeigt 50 µm.

4.5.3 Transfektion der Zellen mit dem pOSG-102-IBA-TGF- β 1-Plasmid

Small Scale Optimierung der Transfektion der CHO-Zellen mittels PEI

Zur Überprüfung, ob mittels PEI-Transfektion der CHO-Zellen zur Produktion des TGF- β 1 mit dem optimierten Plasmid aus Kapitel 4.1 ebenfalls positive Ergebnisse erzielen werden können, wurden die Zellen im Schüttelkolben mit einem Arbeitsvo-

lumen von 150 ml und eine Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml kultiviert. 24 h nach dem Animpfen wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml und 100 % Vitalität mit PEI-Reagenz und einem DNA-Reagenz Verhältnis von 1:3 transfiziert. Hierzu wurde eine Plasmidkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Zur Verfolgung der Sekretion des TGF- β 1 wurde täglich eine Probe aus dem Zellkulturüberstand entnommen und ein Nachweis per Western Blot durchgeführt. Es wurde jeweils 1 ml Überstand und der Aufschluss der entsprechenden Zellmenge per TCA-Fällung aufkonzentriert. Eine Detektion des TGF- β 1 gelang jedoch weder extra- noch intrazellulär (Ergebnisse nicht gezeigt). Ursachen dafür könnten eine zu geringe verwendete Plasmidkonzentration oder eine nicht erfolgreiche bzw. nicht ausreichende DNA-Reagenz-Komplexbildung sein. Die Komplexbildung ist von zwei Hauptfaktoren abhängig: von der verwendeten Komplexbildungslösung, in der der Komplex gebildet wird sowie von der Inkubationszeit zur Bildung des Komplexes aus DNA und Reagenz. Zur Untersuchung dieser Aspekte wurden die Zellen erneut mit vier unterschiedlichen Transfektionsansätzen transfiziert. Die Ansätze sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Übersicht der getesteten Varianten bezüglich des verwendeten Mediums für die Komplexbildung und die Inkubationszeit für die transiente Transfektion der CHO-Zellen.

Komplexbildung	Inkubationszeit [min]
in TC42-Medium	
(TF1 ₅)	5
(TF1 ₂₀)	20
in 150 mM NaCl-Lsg.	
(TF2 ₅)	5
(TF2 ₂₀)	20

Zwei Ansätze wurden zur Komplexbildung ausgewählt: Eine Komplexbildung in TC42 Medium, in dem anschließend auch die Transfektion stattfindet (im Folgenden wird diese Methode als TF1_t bezeichnet). Als Alternative wurde als Komplexbildungslösung 150 mM NaCl verwendet (TF2_t). Die erfolgreiche Transfektion von CHO-Zellen mit dieser Lösung wurde bereits in der Literatur beschrieben [21]. Zum Vergleich wurden zwei unterschiedliche Inkubationszeiten zur Komplexbildung gewählt (5 und 20 min). Die vier Ansätze wurden als TF1₅, TF1₂₀, TF2₅ und TF2₂₀ bezeichnet. Außerdem wurde insgesamt die Plasmidkonzentration auf 2 $\mu\text{g/ml}$ erhöht.

Somit betrug die Gesamtmenge des verwendeten Plasmids pro Schüttelkolben 300 µg (für 150 ml Arbeitsvolumen). Die Transfektion wurde einen Tag nach dem Animpfen der Zellen bei einer maximalen Zelldichte von 10^6 Zellen/ml durchgeführt.

4.5.4 Expressionsnachweis

Für den Expressionsnachweis wurden ab dem zweiten Tag nach der Transfektion täglich Proben des Zellüberstands der einzelnen Kultivierungen entnommen und mit TCA aufkonzentriert. Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung 4.36 dargestellt. Es wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt: Eine Transfektion mit geringer Inkubationszeit führte bei dem TF1-Ansatz nicht zur Sekretion des Zielproteins in dem Medium (Abbildung 4.36, TF1₅). Bei dem TF2-Ansatz mit geringer Inkubationszeit konnte das TGF-β1 nur am zweiten Tag nach der Transfektion detektiert werden (Abbildung 4.36, TF2₅). Eindeutig bessere Ergebnisse wurden bei den Transfektionen mit längerer Inkubationszeit zur Komplexbildung erzielt. Eine Bande des sezernierten Zielproteins als Monomer bei ungefähr 15 kDa konnte ab dem dritten Tag nach der Transfektion sowohl bei dem TF1-Ansatz als auch bei dem TF2-Ansatz nachgewiesen werden (Abbildung 4.36, TF1₂₀ und TF2₂₀). Die Bande war jedoch bei dem TF2-Ansatz (Komplexbildung in 150 mM NaCl-Lösung) deutlich intensiver.

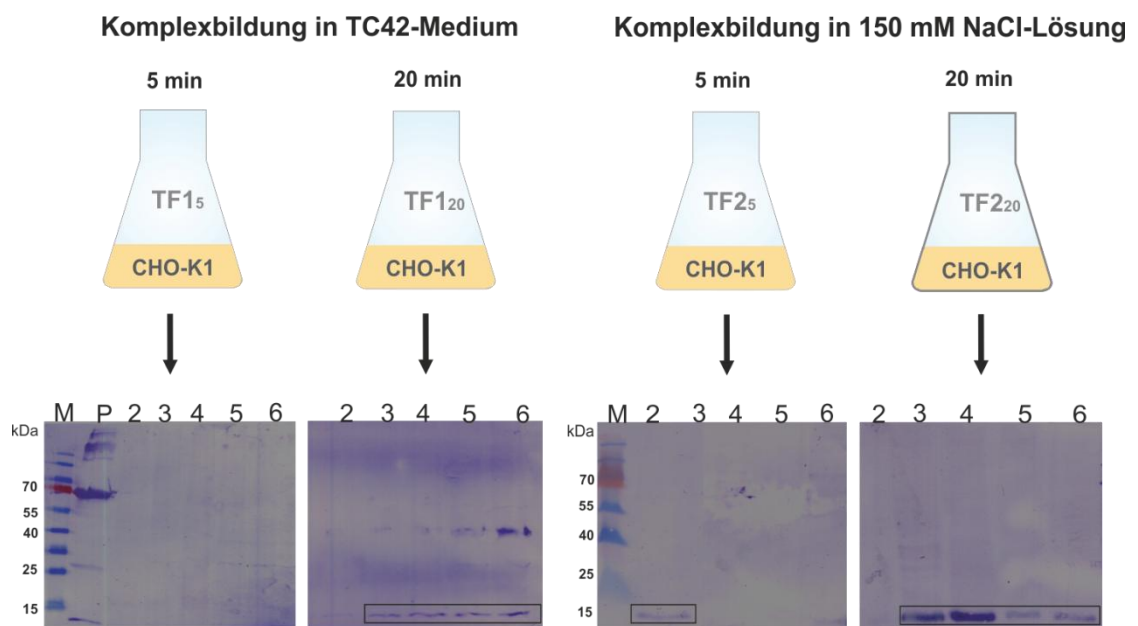


Abbildung 4.36: Western Blots der Überstände der transienten Transfektion der CHO-K1-Zellen mittels PEI-Methode. Die Zahlen 1-6 geben an, wie viele Tage zuvor die Transfektion stattgefunden hat. (P: Positivkontrolle; M: Marker).

Tabelle 4.4 zeigt eine Übersicht der optimalen Transfektionsbedingungen zur Expression des TGF- β 1 in CHO-K1-Zellen in sezernierter Form.

Tabelle 4.4: Übersicht über die als optimal getesteter Variante für die transiente Transfektion der CHO-K1-Zellen.

Transfektionsmethode	Polyfektion per PEI (25 kDa)-Reagenz
Plasmidskonzentration	2 $\mu\text{g/ml}$
DNA-PEI-Verhältnis	1:3
Komplexbildung	in 150 mM NaCl ₂
Inkubationszeit zur Komplexbildung	20 min
Animpfdichte	5·10 ⁵ Zellen/ml
Zelldichte direkt vor der Transfektion	1·10 ⁶ Zellen/ml

4.5.5 Aufreinigung des TGF- β 1

Nach erfolgreicher Detektion des sezernierten TGF- β 1 wurde das extrazelluläre TGF- β 1 aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte auf Grund des an das Protein gekoppelten Twin-strep-tags (3 kDa) mittels Affinitätschromatographie. Das Twin-strep-tag ist eine erweiterte Variante des Strep-tags (1 kDa) und hat eine hohe Affinität zu Strep-Avidin (Abbildung 4.37, A). Zur Aufreinigung des Proteins wurde die Strep-Tactin® Superflow®-Säule verwendet. Die Säule ist mit einem Derivat des Strep-Avidin, dem Strep-Tactin, modifiziert, welches eine höhere Affinität zum Strep-tag bzw. zum Twin-strep-tag besitzt (Abbildung 4.37, B).

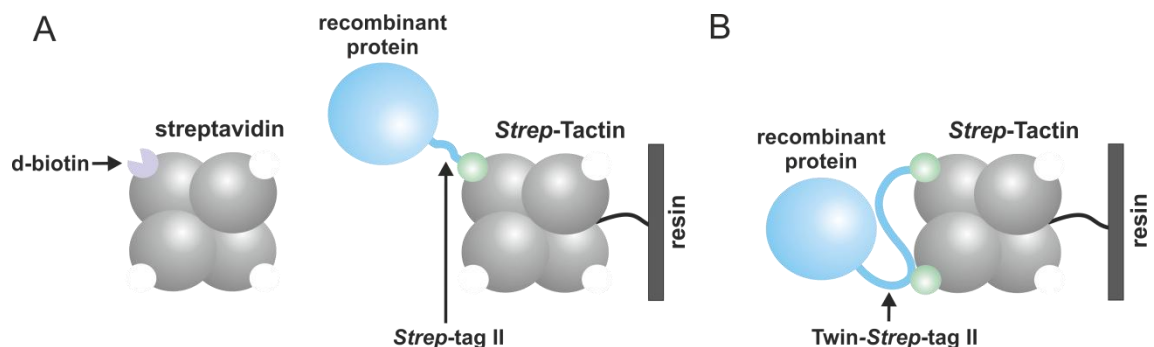


Abbildung 4.37: Schematische Darstellung der Proteinaufreinigung mittels Twin-strep-tag. Abbildung adaptiert von dem Strep-Tactin® Superflow®-Säule Manual der Firma iba.

Zur Aufreinigung des TGF- β 1 wurde eine weitere Transfektion der CHO-K1 Zellen mit den in Tabelle 3-4 angegebenen Parametern in 500 ml Schüttelkolben mit 250 ml Arbeitsvolumen durchgeführt. Der Zellkulturüberstand wurde nach sechs Tagen abgenommen, da aufgrund der Vorversuche ermittelt wurde, dass nach diesem Zeitpunkt die Konzentration des TGF- β 1 abnimmt (siehe Abbildung 4.36, TF2₂₀). Bei geringen Proteinkonzentrationen wird der Überstand oft aufkonzentriert und anschließend aufgereinigt. Häufig wird jedoch ein Verlust des Produktes durch die verwendeten Aufkonzentrationseinheiten verursacht. Um dies zu umgehen, wurde das WET-FRED-System (IBA GmbH) verwendet (Abbildung 4.38). Dieses System ermöglicht eine direkte Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand in einem gekühlten Zustand (das System wurde im Kühlschrank aufgebaut). Das System funktioniert nach dem Prinzip des hydrostatischen Drucks. Aufgrund des Höhenunterschieds und der zusätzlichen Druckbildung (Abbildung 4.38, 4) können bis zu 2 L Kulturüberstand (Abbildung 4.38, 1) über einen Schlauch mit Saugfilter mit einer kontrollierbaren Geschwindigkeit auf die Säule übertragen werden (Abbildung 4.38, 3). Die Säule wird mit Hilfe von unterschiedlichen Adaptern an einer Schott-Flasche befestigt, in der der Durchlauf gesammelt werden kann. Neben der Möglichkeit der Aufreinigung in einer gekühlten Atmosphäre ist die Aufreinigung mit Hilfe dieser Methode sehr kostengünstig, da hierfür (in Gegensatz zu der FPLC-Anlage) keine großen Puffermengen benötigt werden.

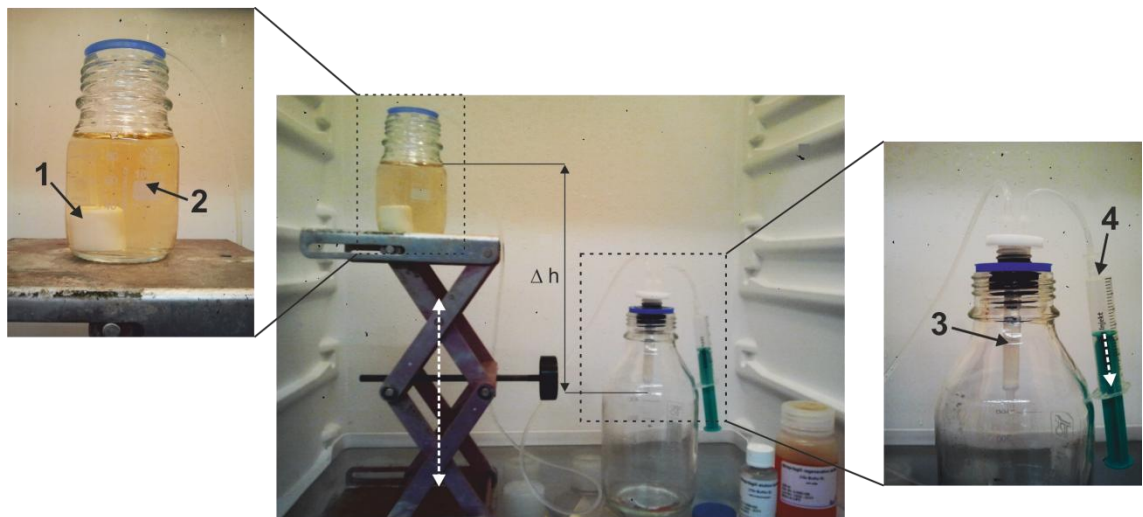


Abbildung 4.38: Darstellung des Aufbaus des WET FRED-Systems zur Aufreinigung von Kulturüberständen. 1: Last drop Filter, 2: unaufgereinigter Kulturüberstand, 3: die Strep-Tactin® Superflow®-Säule, 4: Spritze zum Aufbau des Unterdrucks.

Aufreinigung

Der Kulturüberstand (250 ml) wurde mit 30 ml zehnfach konzentriertem, gekühltem Bindungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH=8) verdünnt. Das Beladen der Säule mit dem Kulturüberstand wurde mit Hilfe des WET FRED-System durchgeführt. Anschließend erfolgte nach mehreren Waschschritten die Elution mit 2,5 mM biotinartigem Trispuffer. Eine ausführliche Beschreibung der Aufreinigungsschritte sowie der verwendeten Puffer ist im Abschnitt B.6.1 aufgeführt. Die bei der Aufreinigung erhaltenen Fraktionen der Wasch- und Elutionsschritte wurden per SDS-PAGE analysiert. Die Bande bei ca. 15 kDa kann durch den Vergleich mit dem Western-Blot (Abbildung 4.36) TGF- β 1 zugeordnet werden. Das TGF- β 1, welches beim ersten Elutionsschritt eluiert wurde (Abbildung 4.39, Spur E1), liegt noch verunreinigt vor. Die vorhergehenden Waschschriffe müssen folglich optimiert werden. Beim zweiten und dritten Elutionsschritt (Abbildung 4.39, E2 und E3) konnte reines TGF- β 1 gewonnen werden. Die beiden Fraktionen wurden vereint und in PBS umgepuffert, mit dem Spektrometer NanoDrop ND-1000 quantifiziert und einem Aktivitätstest unterzogen (siehe Abschnitt 4.5.6). Die Quantifizierung ergab eine Gesamtmenge von 0,525 μ g aus dem aufgereinigtem Überstand (250 mL).

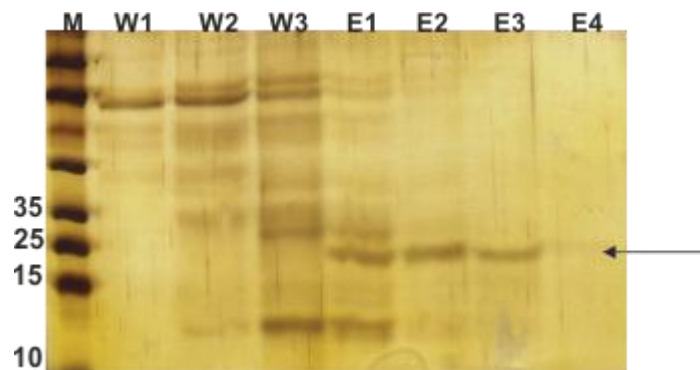


Abbildung 4.39: Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel (15%) der TGF- β 1-Aufreinigung. M: Marker, W1-3: Waschfraktionen, E1-3: Elutionsfraktionen. Die Proben wurden per TCA-Fällung fünffach aufkonzentriert.

4.5.6 Testung der biologischen Aktivität von TGF- β 1

Das TGF- β 1 ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor mit verschiedenen in der Literatur beschriebenen Wirkungen, welche laut Literatur zum Teil widersprüchlich sind. So kann das TGF- β 1 abhängig von Zelltyp inhibitorisch oder stimulierend auf die Zellproliferation wirken. Für die Entwicklung eines Assays zur Testung der

Bioaktivität des produzierten TGF- β 1, wurde seine proliferationshemmende Wirkung auf die Lungenkrebszellen A-549 (*human lung carcinoma*) betrachtet. Die Wirkung des TGF- β 1 auf diese Zellen wurde bereits untersucht [24]. Die Testung der Bioaktivität wurde sowohl direkt über Zellzahlbestimmung also auch indirekt mittels CellTiterBlue-Assay®Cell viability Assay (CTB-Test) durchgeführt.

4.5.6.1 Indirekte Messung der A-549 Proliferation in Anwesenheit von TGF- β 1

Im ersten Experiment wurde zur Überprüfung der biologischen Aktivität des TGF- β 1 die Proliferation der A-549 Zellen in Gegenwart des Wachstumsfaktors mit dem CTB-Test untersucht. Mit Hilfe des CTB-Tests wird die Anzahl lebender Zellen durch Messung des Reduktionspotenzials bestimmt (genauere Durchführung siehe Abschnitt B.1.10). Als Positivkontrolle wurde kommerzielles TGF- β 1, welches ebenfalls rekombinant aus CHO-Zellen isoliert wurde, verwendet. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Experiment in Abwesenheit des TGF- β 1 durchgeführt.

Bestimmung der Arbeitskonzentration des TGF- β 1 für die Testung

Um die Wirkung des TGF- β 1 auf die A-549-Zellen zu untersuchen, wurden zunächst unterschiedliche Arbeitskonzentrationen (0-150 ng/ml) von TGF- β 1 ins Medium hinzugegeben. Für die Testung wurde das 96-Loch-Platten-Format verwendet (200 μ l Medium und eine Zelldichte von 4000 Zellen pro Kavität) Zur Bestimmung der Viabilität wurde der CTB-Test nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse des CTB-Tests für alle eingesetzten Konzentrationen sind in Abbildung 4.40 dargestellt.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.40 zeigen durch den Vergleich mit der Negativkontrolle (0 ng/ml-TGF- β 1), dass der Zusatz des TGF- β 1 die Proliferation der A-549 inhibierte. Das kommerzielle und das produzierte TGF- β 1 zeigen hierbei ein vergleichbares Ergebnis bezüglich der Wirkung auf die Zellen. Deutlich ist auch die Zunahme dieser Wirkung bei höheren eingesetzten Konzentrationen (Vergleich 50 und 100 ng/ml TGF- β 1). Einen signifikanten Unterschied zeigen allerdings Kulturen mit den Konzentrationen von 100 und 150 ng/ml nicht mehr. Für weitere Untersuchungen wurde eine TGF- β 1-Konzentration von 100 ng/ml verwendet.

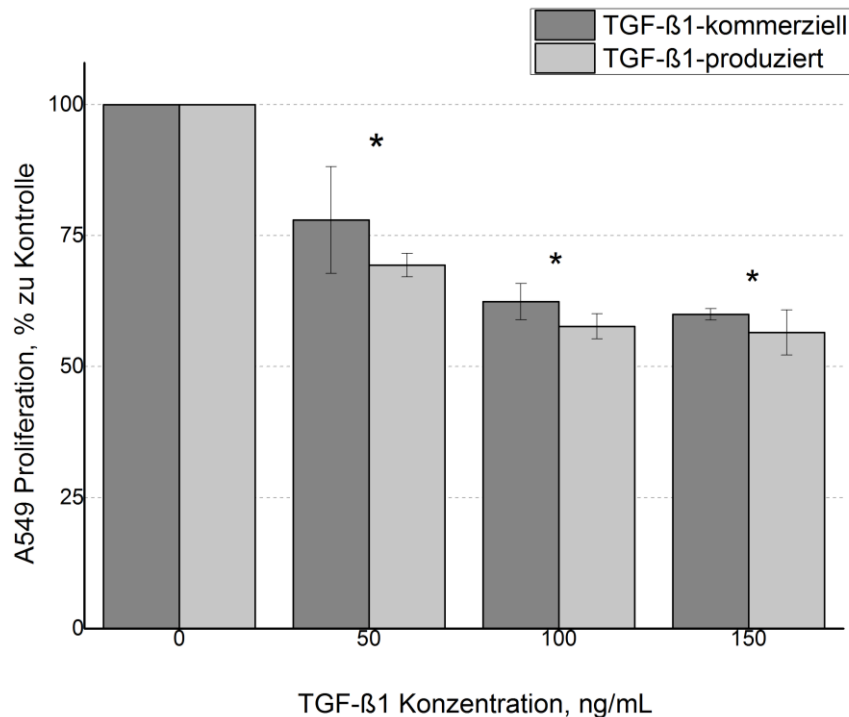


Abbildung 4.40: Ergebnis des CTB-Tests der A-549 Proliferation zur Testung der Bioaktivität des TGF-β1. Die Proliferation der A-549-Zellen wurde sowohl in Gegenwart des TGF-β1 (kommerziell und produziert) als auch ohne Zugabe des TGF-β1 untersucht. (* $p < 0,01$).

4.5.6.2 Direkte Messung der A-549 Proliferation in Anwesenheit von TGF-β1

Neben der indirekten Testung der proliferationshemmenden Wirkung des TGF-β1 auf die A-549 Zellen, wurde diese Wirkung zusätzlich direkt bestimmt. Hierfür wurden die A-549 Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen parallel mit kommerziellem TGF-β1, dem produzierten TGF-β1 sowie ohne TGF-β1 als Negativkontrolle kultiviert. Das TGF-β1 wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml ins Medium hinzugegeben. Das Wachstum der Zellen wurde über tägliche Zellzahlbestimmung in Zählkammern mittels Trypanblau-Ausschluss verfolgt. Die A-549 Zellen zeigten ein stärkeres Wachstum in Abwesenheit von TGF-β1 als Zellen, die mit TGF-β1 (kommerziell und produziert) kultiviert wurden (Abbildung 4.41). Die Wachstumskurven der beiden Kulturen mit dem zugesetzten TGF-β1 verlaufen nahezu identisch. Der Effekt des TGF-β1 wurde ab dem 3. Tag der Kultur sichtbar und wurde bis Tag 5 immer deutlicher.

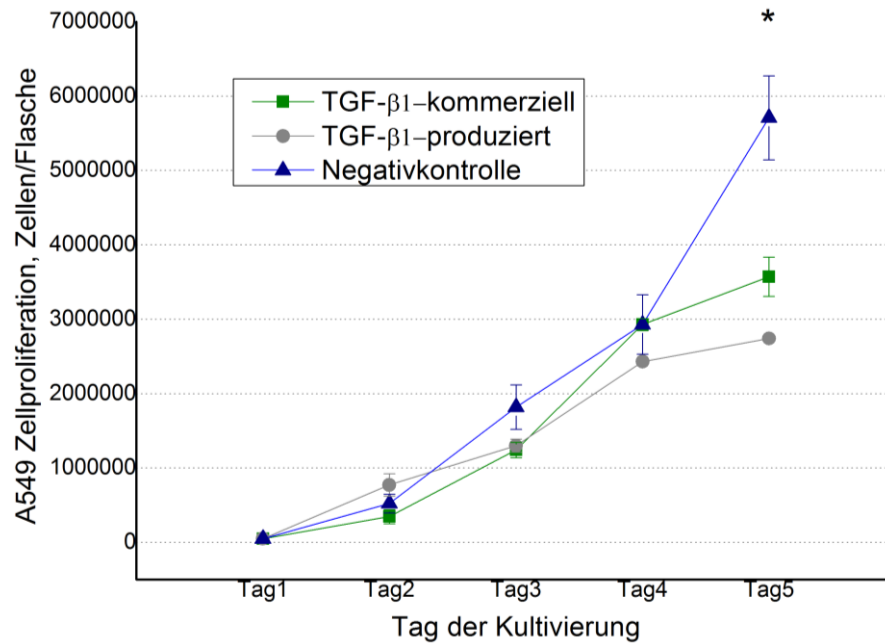


Abbildung 4.41: Proliferation von A-549 Zellen in Anwesenheit des TGF-β1. Dargestellt sind die Wachstumskurven in Medium mit zugesetztem kommerziellen TGF-β1 (grüne Kurve), dem produzierten TGF-β1 (graue Kurve) und in Medium ohne Zusatz von TGF-β1 (Negativkontrolle, blaue Kurve).

Morphologie

Darüber hinaus wurde die Morphologie nach einer fünftägigen Kultivierung der Zellen mit und ohne Zusatz des TGF-β1 evaluiert. In Abbildung 4.42 sind Phasenkontrast-Aufnahmen von A-549 Zellen am fünften Kultivierungstag dargestellt. Eine anschließende Zellfärbung wurde mit Calcein AM-Reagenz (siehe Abschnitt B.1.17) durchgeführt. Im Fluoreszenzmikroskop sind nur lebende Zellen als grün-fluoreszierende Zellen sichtbar. Die Ergebnisse der Zellfärbung sind in Abbildung 4.43 zusammengefasst. Im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 4.43, A) ist eine Inhibierung des Wachstums der Zellen mit dem Zusatz von TGF-β1 sichtbar (Abbildung 4.43, B mit dem kommerziellen TGF-β1 und C mit dem produzierten TGF-β1). Sowohl die Ergebnisse der Phasenkontrastmikroskopie (Abbildung 4.42) als auch der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 4.43) nach Zellfärbung zeigen deutlich, dass die Zellen in Abwesenheit des TGF-β1 ein besseres Wachstumsverhalten aufweisen. Dies bestätigt die Ergebnisse der indirekten und die direkten Bestimmung der TGF-β1-Aktivität.

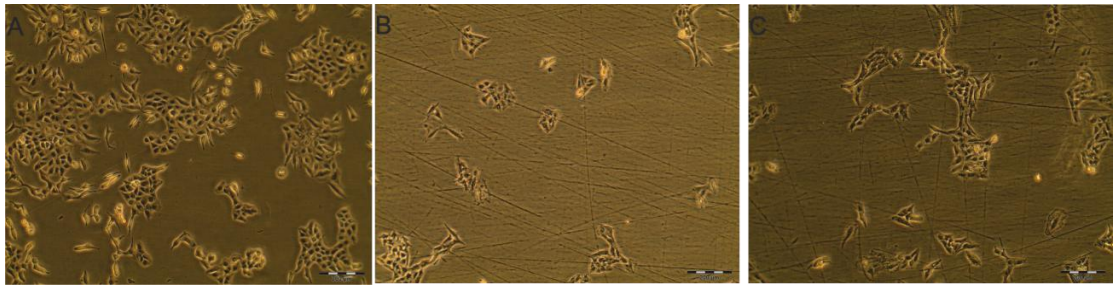


Abbildung 4.42: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A-549 Zellen. Die Aufnahmen wurden am fünften Tag der Kultivierung aufgenommen. A) Kultivierung ohne TGF- β 1, B) Kultivierung mit kommerziellem TGF- β 1, C) Kultivierung mit dem produzierten TGF- β 1. Der Maßstab zeigt 200 μ m.

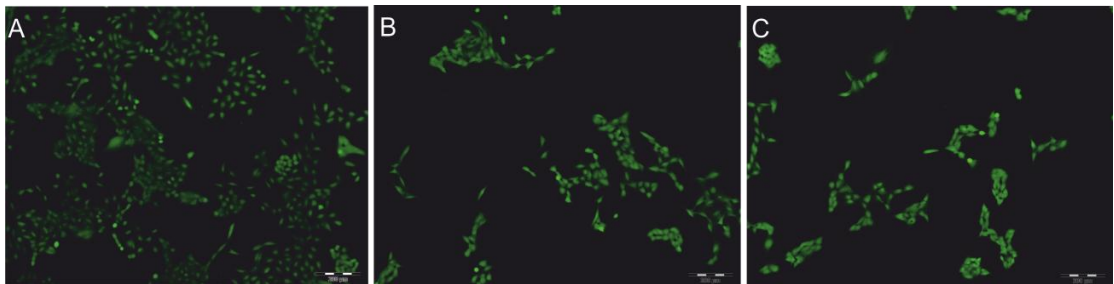


Abbildung 4.43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Calcein-Zellfärbung der A-549 Zellen. Die Färbung wurde am fünften Tag der Kultivierung mit und ohne Zusatz des TGF- β 1 durchgeführt. A) Ohne Zusatz des TGF- β 1, B) mit Zusatz von kommerziellem TGF- β 1, C) mit Zusatz von produziertem TGF- β 1. Der Maßstab zeigt 200 μ m.

Die Ergebnisse der Testung der biologischen Aktivität zeigen, dass das produzierte TGF- β 1 eine vergleichbare Bioaktivität zu dem kommerziell erhältlichen TGF- β 1 der Firma Dianova aufweist. Sein Effekt als proliferationsinhibierender Wachstumsfaktor auf die A-549 Zellen konnte sowohl indirekt mittels CTB-Test als auch direkt über die tägliche Zellzahlbestimmung während der Kultivierung und zusätzlich mittels mikroskopischer Beobachtungen bestätigt werden.

4.5.7 Fazit

In diesem Kapitel sollte untersucht werden, ob die CHO-K1-Zelllinie für die Produktion des TGF- β 1 mittels transienter Transfektion geeignet ist. Nach einem Screening mit Hilfe eines EGFP-Plasmids zur Bestimmung der optimalen Transfektionsparameter (Transfektionsreagenz, Zelldichte, Plasmidkonzentration sowie DNA-Reagenz-Verhältnis) wurden die Zellen mittels PEI-Transfektionsmethode mit dem pOSG-102-IBA-TGF- β 1-Plasmid transfiziert. Erst nach weiteren Optimierungen bezüglich der verwendeten Komplexbildungslösung zur Bildung des DNA-PEI-Komplexes und der Inkubationszeit, konnte das TGF- β 1 in

sezernierter Form detektiert werden. Eine Abhängigkeit der Produktbildung konnte für beide Parameter beobachtet werden. So wurde das beste Ergebnis über eine indirekte Transfektion bei der Komplexbildung in 150 mM NaCl und einer Inkubationszeit von 20 min erreicht. Das mit Twin-strep-getagte Protein, welches sich durch eine geeignete affinitätschromatographische Methode aufreinigen ließ, wurde auf seine Aktivität getestet. Die biologische Aktivität konnte sowohl indirekt mittels CTB-Test als auch direkt über eine Zellzahlbestimmung bestätigt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Ziel dieser Arbeit im Rahmen des Exzellenzclusters Rebirth war die Entwicklung einer mammalischen Produktionszelllinie zur rekombinanten Produktion von TGF- β 1 unter Verwendung einer transienten Transfektionsmethode. Als Ausgangszelllinien wurden die HEK293- und die CHO-K1-Zelllinie verwendet und ihre Produktivität untersucht.

Für die HEK293-Zellen konnten die Bedingungen für eine optimale transiente Transfektion ermittelt werden. Dazu wurden Zelldichte, DNA-Reagenz-Verhältnis und die Konzentration des verwendeten Plasmids optimiert. Die Verwendung eines GFP-Plasmids hat sich für ein Vorab-Screening als besonders geeignet erwiesen. Sowohl über Lipofektion als auch über die Polyfektion-Transfektionsmethode konnte eine Transfektionseffizienz der Zellen von über 90 % (Metafectene- und PEI-Ansatz) erzielt werden. Dies wurde mikroskopisch und durchflusszytometrisch anhand der GFP-Fluoreszenzintensität überprüft und bestätigt (Kapitel 4.1).

Die so ermittelten optimalen Parameter wurden für die Transfektion der Zellen zur Produktion des TGF- β 1 übernommen. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Axel Schambach vom Institut für Experimentelle Hämatologie der Medizinischen Hochschule Hannover wurde hierfür ein Expressionsvektor konstruiert, mit dem das TGF- β 1 als Fusionsprotein mit EGFP als Selektionsmarker erfolgreich produziert werden konnte (Kapitel 4.2). Die erfolgreiche Transfektion konnte durch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des EGFP-Proteins bestätigt werden. Der Transkriptionsnachweis des TGF- β 1-Gens erfolgte mittels PCR und Gelelektrophorese. Das Protein wurde mittels Western Blot lokalisiert und so intrazellulär nachgewiesen.

Eine Abhängigkeit der Expression bzw. der Sekretion des TGF- β 1 von der Transfektionsmethode wurde durch virale Transduktion der HEK293-Zellen mit demselben Plasmid untersucht. Auf diese Weise konnte eine Verbesserung der Expression des Zielproteins erzielt werden. Da die Vermittlung der Sekretion von weiteren Faktoren, wie der verwendeten Zelllinie und dem Zielgen abhängig ist, wurden diese beiden Faktoren gesondert untersucht. Die CHO^{SFS}-Zelllinie wurde lentiviral mit dem Plasmid für TGF- β 1 transduziert. Parallel wurde für weitere sieben Gene ein Vektor konstruiert und ebenfalls in CHO^{SFS}-Zellen eingebracht. Die Ergebnisse der Expressi-

onsnachweise zeigten eine Abhängigkeit der untersuchten Faktoren auf die Sekretion des Zielproteins. So konnte trotz eines identischen Vektorkonstrukts nur für fünf der sieben Zelllinien eine Sekretion des jeweiligen Proteins bestätigt werden. Das TGF- β 1 wurde nur in sehr geringen Mengen im Überstand nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Expressions- und Sekretionsuntersuchungen zeigten, dass es für alle weiteren Arbeiten notwendig war, ein neues Vektorkonstrukt zu entwickeln, welches besser für die transiente Transfektion geeignet ist. Dafür wurde das Zielgen erfolgreich in ein neues Vektorkonstrukt integriert. Das TGF- β 1 wurde als Fusionsprotein mit der N-terminalen Signalsequenz BM40 (für die Sekretion des Zielproteins) und einem C-terminalen Twin-Strep-Tag (für die Aufreinigung des Proteins über eine Affinitätschromatographische Methode) aufgebaut.

Darüber hinaus wurden die adhärenenten HEK293-Zellen erfolgreich an Suspensionsbedingungen adaptiert. Diese Zellen konnten dann in Medium mit reduziertem Serumanteil kultiviert werden. Mit Hilfe der sequentiellen Adaptionsmethode wurden drei Zelllinien für die Kultivierung mit einem Serumgehalt von 5, 2,5 und 1% des Gesamtvolumens etabliert. Nach einer Gesamtadaptionszeit von drei Monaten konnte durch die Transfektion der Zellen mit dem EGFP-Plasmid eine nur geringfügige Senkung der Transfektionseffizienz der Zellen im Vergleich zu der Ursprungszelllinie festgestellt werden. Eine weitere Transfektion der Zelllinie zur Produktion des TGF- β 1 mit Hilfe des neuen Vektors war bezüglich der Expression und Sekretion erfolgreich. Für weitere Arbeiten mit den adaptierten Zelllinien empfiehlt sich allerdings eine Verlängerung der Adaptionszeit, da die Transfektion zur Verschlechterung des Wachstums der Zellen aufgrund des zusätzlichen höheren Energiebedarfs zur Produktion des TGF- β 1 führte.

Um ein Scale-up realisieren zu können, wurde als weiterer Schritt die für industrielle Prozesse geeignete Zelllinie CHO-K1-Zellen transfiziert. Diese an suspendierte und serumfreie Bedingung adaptierte Zelllinie zeigt ein stabiles Wachstum und ist für Transfektionen gut geeignet. Es wurden sämtliche Transfektionsparameter zur transienten Transfektion mittels PEI-Methode untersucht und optimiert. Dabei stellten sich zwei Aspekte als besonders bedeutsam heraus: die verwendete Lösung zur DNA-PEI-Komplexbildung und die benötigte Inkubationszeit zur Bildung des Komplexes. Durch Optimierung dieser beiden Parameter konnte die Expression bzw. die Sekretion

des TGF- β 1 erheblich gesteigert werden. Kultivierungen im Labormaßstab (250 mL) konnten erfolgreich durchgeführt werden.

Über eine Affinitätschromatographie wurde das mit dem Twin-Strep-Tag versehene Protein erfolgreich aufgereinigt. Für die Aufreinigung des Zielproteins aus dem Kulturüberstand wurde das WET FRED-System etabliert. Diese Methode bietet auf Grund des geringen Verbrauchs an Puffern (im Gegensatz zur standardmäßig eingesetzten FPLC-Anlage) eine kostengünstige und einfache Aufreinigungsmethode des Zielproteins (Kapitel 4.5.5).

Als letzter Schritt wurden Aktivitätsassays entwickelt, mit denen die Funktionalität des hergestellten und aufgereinigten TGF- β 1 bewiesen werden konnte. Diese basieren auf der proliferationsinhibierenden Wirkung von TGF- β 1 auf A549 Zellen. Neben der indirekten Bestimmung der Bioaktivität des TGF- β 1 mittels CTB-Test, wurde die Bioaktivität auch direkt über die tägliche Bestimmung der Zellzahl während der Kultivierung in TGF- β 1-haltigem Medium untersucht. Die Ergebnisse der Testungen zeigten, dass das produzierte TGF- β 1 eine mit dem kommerziell erhältlichen TGF- β 1 vergleichbare Bioaktivität aufweist (Kapitel 4.5.6).

Ausblick

Aufgrund der hervorragenden Ergebnisse im Labormaßstab, empfiehlt sich für zukünftige Arbeiten zur Produktion von TGF- β 1 die Verwendung der kostengünstigeren und zeitsparenden transienten Transfektionsmethode mittels PEI-Reagenz. Die Eignung dieser Methode für ein Upscaling auf Reaktormaßstab muss allerdings noch überprüft werden.

In Bezug auf die zu verwendende Zelllinie sollte CHO-K1 eingesetzt werden, da mit Hilfe dieser Zelllinie ein kompletter Prozess mit Produktion, Aufreinigung und Testung des TGF- β 1 erfolgreich durchgeführt werden kann. In Bezug auf die Expressionsstärke des TGF- β 1 sollte evaluiert werden, inwieweit sich eine Optimierung der noch nicht untersuchten Transfektionsparameter (Variieren der Zelldichte, Transfektionszeit nach Animpfen und Erhöhung der Plasmidkonzentration) positiv auf die Expression auswirkt. Ob eine Übertragbarkeit auf den Reaktormaßstab gegeben ist, sollte ebenfalls untersucht werden. Hierfür wurde die geeignete Menge an TGF- β 1-Plasmid in Rahmen dieser Arbeit produziert und kann zu diesem Zweck verwendet

werden. Für die Produktion des TGF- β 1 in HEK239-Zellen müssen weitere Untersuchungen und Arbeitsschritte bezüglich einer Adaption an suspensions- und serumfreie Bedingungen etabliert werden. Dies wäre sehr zu empfehlen, da die HEK-Zellen eine große Transfektionseffizienz bei transienter Transfektion zeigten. Es bietet sich diesbezüglich an, bereits adaptierte HEK-Zellen mit einem stabilen Wachstum für Transfektionszwecke zu verwenden. Dieser Vorgang würde die lange Adaptionzeit vermeiden, welche für die Optimierung der Transfektion investiert werden muss.

Die Strategien dieser Arbeit bieten eine gute Grundlage für eine erfolgreiche transiente Transfektion von TGF- β 1 in CHO-K1-Zellen im größeren Maßstab und liefern zahlreiche Hinweise im Hinblick auf mögliche weitere Optimierungen.

A. Material

A.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Einmalsterilpipetten 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Einwegspritzen (2 ml, 10 ml)	B. Braun Melsungen AG
Einmalhandschuhe Semperguard	Semperit AG Holding, Wien, Österreich
Eppendorfhütchen	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Kryoröhrchen 1,6 mL	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Nitrilhandschuhe	Ansell Healthcare, LLC, USA
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
Spritzen 10 ml, 20 ml, 50 ml	Termo Europe NV, Leuven, Belgien
Sterilfilter (Minisart, 0,25 µm)	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Spritzenvorsatzfilter	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Zellkulturflaschen, T 25, T75, T175	Sarstedt AG & Co, Numbrecht
Vivaspin 2, 6, 20	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
96-, 24-, 6-Lochplatten	Nunc ThermoFischer, Langenselbold
Zentrifugentubes (15 ml, 50 mL)	Corning, Inc, USA

A.2 Geräte

Gerät / System	Hersteller, Land
Autoklav Systec V-150	Systec GmbH, Wettengel
Cleanbench MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Cedex	Roche Diagnostik AG, Risch, Schweiz
Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Beckmann-Coulter, Florida, USA
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Feinwaage MC 1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Inkubatorschrank	Thermo Electron Corporation, Erlangen
iCycler	Bio-Rad, München
Kryobehälter MVE	MVE Cryogenics
Kühl -und Gefrierschrank	Siemens AG, Laatzten
Magnetrührer RCT b	IKA Werke GmbH, Staufen
SDS-PAGE Gelsystem	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Mikropipetten	Research®, Eppendorf AG, Hamburg
NanoDropND-1000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR Detection System	Bio-Rad, München
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex-Mixer VM-300	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
pH – Elektrode	Leighton Buzzard, Großbritannien
Strep-Tactin® Superflow®-Säule	IBA GmbH, Göttingen
Wasserbad	Memmert, GmbH & Co. KG, Schwabach
Waage (CP8201, Isocal AC211 S)	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
WET-FRED-System	IBA GmbH, Göttingen
Zählkammer, Neubauer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifuge, Multifuge 3s	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

A.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	ABgene, Hamburg
Ammoniumperoxidisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
AP-Konjugat Substrat	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
beta - Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
DNA 100 bp Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
dNTPs	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Dithiothreitol (DTT)	Gibco, Karlsruhe
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol (96 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Formaldehydlösung (36.5%)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
GeneJuice	Novagen (Merck KGaA), Darmstadt
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG
Insulin	Lonza, Basel, Schweiz
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lipidos	Lonza, Basel, Schweiz
Magnesiumchlorid Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Metafectene	Biontex Laboratories GmbH, Martinsried/Planegg

A. Material

Chemikalien	Hersteller
Methanol (MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat(NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd	Sigma-AldrichGmbH, München
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Polyethylenimin, linear, 25MW	Polysciences Inc., Eppelheim
Polyvinylpyrrolidon(PVP)	Merck KGaA, Darmstadt
ProCHO5	Lonza, Basel, Schweiz
protein molecular weight marker	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Safe GelStain	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend, 37 %)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Saponin	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Silbernitrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TurboFect	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

A.4 Biomoleküle, Kits und Fertigmedien

Produkte	Hersteller
BSA	Invitrogen, Carlsbad, USA
CellTiter Blue Assay	Promega GmbH, Mannheim
DMEM	Life Technologies, Darmstadt
Page Ruler #0661 unstained ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Page Ruler #0671 prestained ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Page Ruler #1841 prestained ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TC42	TeutoCell AG, Bielefeld
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Venlo, NL
Qiagen Plasmid Mega Kit	Qiagen, Venlo, NL
QIAquick Gel Extraction	Qiagen, Venlo, NL
StarGate Cloning System	IBA GmbH, Göttingen
Go-Taq DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
Hind III	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
human TGF- β 1	Peptide GmbH, Hamburg
human TGF- β 1	Dianova GmbH, Hamburg
Q5 High Fidelity Polymerase	New England Biolabs., UK
XbaI	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Xho I	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

A.4 .1 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Mouse-anti-human-TGF- β 1 (CYT-75344)	Dianova GmbH, Hamburg
Goat Anti-Mouse IgG AP-conjugate	BD Biosciences Pharmingen, USA
Mouse-anti-His-Tag	Santa Cruz Biotechnology, USA

A.4.2 Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Hersteller
GFP forward	acttttgatatggtcttca	Invitrogen, USA
GFP reverse	gtctttagttcccgatc	Invitrogen, USA
TGF- β forward 2	gcctggacacacagtacagc	Invitrogen, USA
TGF- β reverse 2	gatcatgttgacagttgc	Invitrogen, USA
Klonierungsprimer	agcggctcttcaatggccctggacaccaatatt*g	IBA, Göttingen
TGF- β forward		
Klonierungsprimer	agcggctcttctdcccgtgcacttgcaggagc*g	IBA, Göttingen
TGF- β reverse		
pENTRY-IBA forward	gcgaaacgatcctcgaag	IBA, Göttingen
sequencing Primer		

A.5 Puffer

Die Puffer für die Aufreinigung des TGF- β 1 über die Strep-Tactin® Superflow®-Säule sind direkt im Abschnitt B.6.1 angegeben.

Western Blot

Transfer-Puffer:

0,3 g Tris, 1,5 g Glycin, 20 ml Methanol

PBS- Puffer:

8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,27 g KH₂PO₄ auf 100 mL ddH₂O, pH 7,4

Blockpuffer:

5 g Magermilchpulver, 500 μ l Tween 20, auf 100 mL 1x PBS

0,5 % PBST:

500 μ l Tween 20, ad 100 ml 1 x PBS

A. Material

AP-Puffer:

100 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, ad 25 ml ddH_2O , pH 9,5

Färbelösung:

250 μl Farbreagenz A, 250 μl Farbreagenz B, ad 25 ml AP-Puffer

Agarosegelelektrophorese

50 x TAE Laufpuffer:

242 μl Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5 M), ad 25 ml ddH_2O

SDS PAGE

10 x TGS-Puffer:

3 g Tris, 140 g Glycin, 10 g SDS, ad 1 l ddH_2O , pH 8,3

2 x SDS Probenpuffer:

20 mg Bromphenolblau, 58 mg EDTA-Natriumsalz, 5 g SDS, 0,315 g Tris-HCl, ad 80 ml ddH_2O

15 %-iges Trenngel:

1,8825 ml Rotiphorese Gel 40, 1,4 ml 1 M Tris (pH 8,8), 1,2175 ml ddH_2O , 10 μl TEMED, 0,5 ml (1 %) SDS, 10 μl (25 %) APS

6 %-iges Sammelgel:

0,75 ml Rotiphorese Gel 40, 0,63 ml 1 M Tris (pH 6,8), 3,77 ml ddH_2O , 0,3 (1 %) SDS, 10 μl TEMED, 10 μl (25 %) APS

einfacher Laemmli-Puffer:

800 μl 2 x SDS Probenpuffer, 100 μl Glycerin (55 %ig), 100 μl β -Mercaptoethanol

modifizierter Laemmli-Puffer:

400 mg SDS, 1,5 ml Glycerin (55 %ig). 2,5 ml β -Mercaptoethanol, 388 mg DTT, Spatelspitze Bromphenolblau

A. Material

Silberfärbung

Farmers-Reducer:

Spatelspitze $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Spatelspitze $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 100 mL ddH₂O

Silberentfärber/-fixierer:

450 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, 450 ml ddH₂O

Silbernitratlösung:

Spatelspitze AgNO_3 , 100 ml ddH₂O

Färbelösung:

300 µL Formaldehyd, 100 mL 2,5 %- Na_2CO_3 -Lsg

Durchflusszytometrische intrazelluläre Färbung

Blockpuffer:

2% FCS in PBS

Permeabilisierungspuffer:

0,1 % Saponin in 2 % FCS in PBS

Fixierungslösung:

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

A.6 Medien

Ampicillin-Stammlösung:

100 mg Ampicillin, ad 1 ml ddH₂O

DMEM:

13,5 g DMEM, 3,7 g Natriumhydrogencarbonat, 1 ml P/S, ad 1 l ddH₂O

Glycin-Stammlösung:

50 mg Glycin, ad 20 ml 1 x PBS

A. Material

Hypoxanthin-Stammlösung:

27,22 mg Hypoxanthin, ad 1,2 ml 1 M NaOH

Kanamycin-Stammlösung:

50 mg Kanamycin, ad 1 ml ddH₂O

LB-Agar:

5 g Hefeextrakt, 1 g Natriumchlorid, 10 g Trypton, 15 g Agar-Agar, ad 1 l ddH₂O, pH 7,6

LB:

5 g Hefeextrakt, 1 g Natriumchlorid, 10 g Trypton, ad 1 l ddH₂O, pH 7,6

ProCHO5:

138,15 g ProCHO5, 10 mL Insulin, 3,5 mL Lipidos, 10,5 g Natriumhydrogencarbonat, 100 mL L-Glutamin (100 x), 50 mL P/S, 50 mL Glycin, ad 5 l ddH₂O, pH 7

ProCHO5 +Hypoxanthin und Thymidin:

300 µl Hypoxanthin-Stammlösung, 200 µl Thymidin-Stammlösung, ad 500 ml ProCHO5

TC42:

5 ml P/S, 20 ml L-Glutamin (100 x), ad 500 ml TC42

A.7 Software

Software	Hersteller
Alpha Ease FC	Alpha Innotech,
Cedex 2.2 Software Package	Roche Diagnostic AG, Risch, Schweiz
cell ^B Imaging	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster
CLC Sequence Viewer 6	CCL bio, Aarhus, Dänemark

A. Material

Corel DrawVersion x	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Intas-Capture-Software	Intas Science Imaging
Microsoft(Word, Excel, Paint, Power-Point)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop 1000 V3.7.1	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Origin Version x	OriginLab Corporation, Northampton, USA
StarPrimer D'Signer 3.0.0.3	IBA GmbH, Göttingen
WINMDI 2.9	Joseph Trotter, USA

A.8 Bakterienstämme und Zelllinien

A.8.1 Bakterienstämme

Stamm	Bezogen von
One-shot <i>E. coli</i> TOP10	IBA, Göttingen

A.8.2 Zelllinien

Zelllinie	Bezogen von
A549-Zelllinie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ), Braunschweig
CHO-K1	Universität Bielefeld
CHO ^{SFS}	Cell Cultur Service, Hamburg
HEK 293-Zelllinie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ),

B. Methoden

B.1 Zellkulturmethoden

B.1.1 Kultivierung von CHO- Suspensionszellen

Die CHO-Zellen werden in Schüttelkolben in Suspension gehalten. Die Kultur wird bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubationsschrank kultiviert und bei 160 rpm geschüttelt. Die Kultur wird zweimal pro Woche in frisches ProCHO5-Medium (CHO^{SF5}) bzw. TC42-Medium (CHO-K1) passagiert. Dazu werden die Zellen 5 min bei 180 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in frischem Medium bei einer Zelldichte von 400.000 Zellen/ ml resuspendiert.

B.1.2 Kryokonservierung

Nach der Zellzählung werden für eine erneute Kultivierung geeignete Zellportionen 5 min bei 180 g abzentrifugiert und in einer entsprechenden Menge an Gefriermedium (mit 10 % Vol. DMSO) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wird auf Kryoröhrchen verteilt und in einer vorgekühlten Gefrierbox bei -80 °C eingefroren. Nach einem Tag werden die Kryoröhrchen in einen Kryotank überführt, wo sie in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei – 196 °C gelagert werden.

B.1.3 Revitalisierung

Zur Revitalisierung der Zellen wird das entsprechende Kryoröhrchen aus dem Kryotank entnommen, in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in 2 ml kaltem Medium aufgenommen. Das im Kryomedium enthaltene DMSO, welches die Kristallbildung während der Kryokonservierung verhindert, wird durch Zentrifugieren bei 180 g entfernt. Das Zellpellet wird dann in warmem Medium aufgenommen, in das entsprechende Kultivierungsgefäß überführt und die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

B.1.4 Kultivierung von adhärenenten HEK293-Zellen

Die Kultivierung erfolgt im Inkubationsschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in T-Flaschen unterschiedlicher Größe in DMEM mit 10 % FKS. Zum Passagieren werden die Zellen, nach dem Absaugen des alten Mediums, mit PBS gewaschen und es wird 1 ml Trypsin/ 25 cm² zugegeben. Nach 3 Minuten Inkubation bei 37 °C wird die Flasche geschüttelt und unter dem Mikroskop überprüft. Wenn sich die Zellen abgelöst haben, wird Medium zugegeben. Zur Zellzahlbestimmung wird eine Probe entnommen. Die restlichen Zellen werden bei 180 g für 5 Minuten abzentrifugiert und mit einer Zelldichte von 80.000 Zellen/ cm² in frischem Medium neu ausgesiedelt. Die Zellen werden alle 3–4 Tage passagiert.

B.1.5 Kultivierung von HEK293-Suspensionszellen

Die adaptierten HEK293-Zellen, welche in Suspensionskulturen kultiviert werden, werden in Schüttelkolben bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubationsschrank und bei 160 rpm kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in DMEM mit 10% FKS. Die Kultur wird nach vier Tagen in frisches DMEM-Medium passagiert. Dazu werden die Zellen zentrifugiert (180 g, 5 min). Das Zellpellet wird in frisch vorgewärmtem Medium bei 200.000 Zellen/ ml resuspendiert.

B.1.6 Adaption von adhärenenten HEK293-Zellen zu Suspensionszellen

Die Zellen werden mit einer Zelldichte von 400.000 Zellen/ ml im Schüttelkolben kultiviert und bei einer Drehzahl von 160 rpm in Suspension gehalten. Sobald die Zelldichte über 1 Mio Zellen/ ml erreicht, werden die Zellen wieder auf 400.000 Zellen/ ml passagiert. Ist die Viabilität nach 4 Wochen über 90 % können die Zellen als erfolgreich adaptiert angesehen werden.

B.1.7 Adaption von HEK293-Suspensionszellen an serumreduzierte Kultivierungsbedingungen

Für die Adaption der HEK293-Zellen an eine serumreduzierte Kultivierung wird in dieser Arbeit die sequenzielle Adaptionmethode verwendet. Hierfür wird der

Serumanteil im Kulturmedium stufenweise reduziert. Der Anteil des Serums wird soweit abgesenkt, bis der Gehalt möglichst gering ist, die Vitalität der Zellen jedoch nur geringfügig beeinflusst wird.

Die Zellen werden in Schüttelkolben (50 ml) in einem Arbeitsvolumen von 25 mL und mit einer Animpfdichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ ml kultiviert. Zu Beginn der Kultivierung beträgt der Serumanteil 10 % des Gesamtvolumens. Nachdem die Zellen eine Zelldichte von 10^6 Zellen/ ml erreicht haben, werden sie in neues Medium mit 7,5 % Serumanteil umgesetzt. Der Serumanteil wird nach vier weiteren Passagen auf 5 % reduziert, wenn bis zu diesem Zeitpunkt eine Zellviabilität von über 90 % konstant gehalten werden kann. Eine weitere Senkung des Serumgehalts wird weiter durchgeführt, bis ein Serumanteil von 1 % des Gesamtvolumens erreicht wird. Tabelle 4.1 gibt eine Zusammenfassung der Reduzierschritte und Anzahl der jeweiligen Passagen wieder.

B.1.8 Kultivierung von A549 Zellen

Die A549-Zellen werden in T25-Flaschen bei 37 °C und 95 % CO₂ kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in DMEM (10 % FKS). Zum Passagieren der Zellen wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen. Danach wird 1 mL Trypsin/ 25 cm²-Flaschenfläche zugegeben. Nach fünf Minuten Inkubation im Inkubator wird die Flasche geschüttelt und 1 mL Kultivierungsmedium zugegeben. Die Zellen werden anschließend gezählt und bei 400 g für drei Minuten abzentrifugiert und mit einer Zelldichte von 80 000 Zellen/ cm² in frischem Medium ausgesät,

B.1.9 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Neubauer-Zählkammer

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer kann die Zellzahl am Mikroskop bestimmt werden. Die Zellsuspension wird mit einer 5 %igen Trypanblau-Lösung 1:1 vermischt. Der blaue Farbstoff kann in die toten Zellen diffundieren, da bei diesen die Zellmembran zerstört ist. Die toten und lebenden Zellen in den Großquadraten der

Zählkammer werden separat gezählt und anschließend mit dem Faktor 5000 multipliziert. Dieses ergibt dann die Zellzahl pro ml.

B.1.10 Cell Titer Blue-Assay

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

Durchführung: Der Assay wird in 96-Loch-Platten durchgeführt nachdem sie mit der gewünschten Zelldichte (hier 4000 Zellen/ Kavität) ausgesät werden. Nach einer entsprechenden Kultivierungsdauer wird in jede Kavität 10 % Gesamtvolumen an Cell Titer Blue-Reagenz gegeben und für ungefähr 3 – 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Fluoreszenz wird bei 560 nm (Anregung) und 590 nm (Emission) bestimmt.

B.1.11 Transfektion mit Lipofectamin

Es werden 400.000 HEK-Zellen/ mL in je 1 mL Medium pro Kavität in 24-Loch-Platten ausgesät. Insgesamt werden zwei Transfektionsansätze mit Reagenz:DNA-Verhältnissen von 1:3 und 1:5 angefertigt. Zunächst wird die benötigte Menge des Transfektionsreagenzes sowie die DNA (je 1 µg) in je 0.1 mL Medium verdünnt, zusammengemischt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur unter Bildung des Transfektionskomplexes inkubiert. Das Gemisch wird nun tropfenweise zu den Zellkulturen gegeben, welche dabei leicht geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung sicherzustellen.

Für die Transfektion von CHO-K1-Zellen werden 500.000 CHO-K1-Zellen in 1 mL Medium in einer 6-well-Platte ausgesät. Anschließend werden die jeweiligen Mengen an Lipofectamin (1 mg/ml) in 45 µl serumfreiem Medium verdünnt. Insgesamt werden vier Transfektionsansätze mit unterschiedlichen Reagenz:DNA-Verhältnissen von 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 angefertigt. Danach folgt die Zugabe von 1 µg DNA. Der jeweilige Ansatz wird gut durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wird der Transfektionsmix stufenweise zu den Zellen unter ständigem Rühren gegeben.

B.1.12 Transfektion mit TurboFect

Für die Transfektion mit Turbofect werden 50.000 HEK-Zellen in 1 mL Medium in einer 24-Loch-Platte ausgesät. 1 µg DNA wird nun in 100 µL serumfreiem Medium verdünnt. Nach gründlichem vortexen werden 2 µL des TurboFect-Reagenzes hinzugefügt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µL des Transfektionsmixes werden zu den Zellen gegeben.

B.1.13 Transfektion mit GeneJuice

Es werden 300.000 HEK-Zellen in 3 mL Medium in einer 6 well Platte ausgesät. 3 µL GeneJuice werden mit 100 µL serumfreiem Medium verdünnt. Der Ansatz wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird 1 µg DNA hinzugefügt, der Ansatz durch vortexen vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsmix wird anschließend langsam zu den Zellen gegeben.

B.1.14 Transfektion mit Metafectene

Es werden 40.000 HEK-Zellen/ mL pro Kavität in je 1 mL Medium in 24-Loch-Platten ausgesät. Insgesamt werden zwei Transfektionsansätze mit Reagenz:DNA-Verhältnissen von 1:2 und 1:4 angefertigt. Zunächst wird die benötigte Menge des Transfektionsreagenzes sowie die der DNA (je 1 µg) in 0.5 mL Medium verdünnt, zusammengemischt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur unter Bildung des Transfektionskomplexes inkubiert. Das Gemisch wird nun tropfenweise zu den Zellkulturen gegeben, welche dabei leicht geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung sicherzustellen.

B.1.15 Transfektion mit Polyethylenimin

Für die Transfektion mit Polyethylenimin werden 400.000 HEK-Zellen in 1 mL Medium in einer 6 Loch-Platte ausgesät. Anschließend werden 1 μ L (1:1), 2 μ L (1:2) und 3 μ L (1:3) Polyethylenimin (1 mg/mL) in 45 μ L serumfreiem Medium verdünnt. Es folgt die Zugabe von 1 μ g DNA. Der Ansatz wird gut durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Transfektionsmix zu den Zellen gegeben.

Für die Transfektion von CHO-K1-Zellen werden diese einen Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von 500.000 Zellen/ mL kultiviert. Am nächsten Tag wird zunächst die Zellzahl bestimmt. Bei der doppelten Zelldichte wird die Transfektion durchgeführt. Hierfür wird ein DNA:Reagenz-Verhältnis von 1:3 und eine Plasmidkonzentration von 2 μ g/mL verwendet. Die Komplexbildung wird in TC42 und parallel auch in 150 mM NaCl-Lösung mit verschiedener Inkubationszeit durchgeführt (Abbildung B.1).

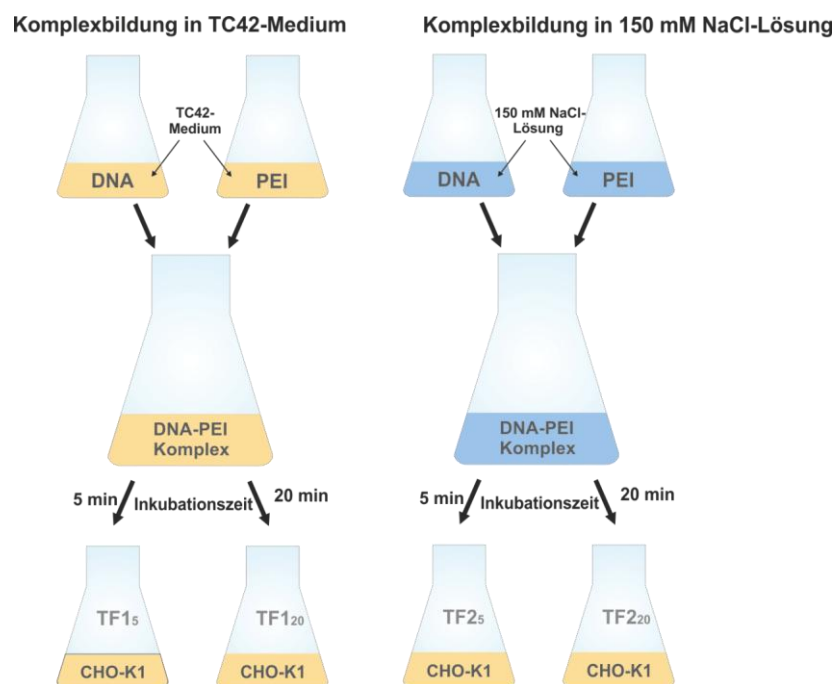


Abbildung B.1: Schematische Darstellung der Transfektionsvariation bezüglich der Komplexbildung und der Inkubationszeit.

B.1.16 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die Zellsuspension wird für zehn Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird mit PBS gewaschen und anschließend in einem Triton-x haltigen Puffer resuspendiert, dem auf 1/1000 Volumen Triton X zugegeben wurde. Die Behandlung mit Ultraschall wird unter Eiskühlung für abwechselnd achtmal je 30 Sekunden und je 30 Sekunden Pause (Cycle: 0.5, Amplitude: 100 %) durchgeführt. Die aufgeschlossenen Zellen werden für 20 min bei 10.000 g zentrifugiert.

B.1.17 Calcein-AM-Färbung

Bei dieser Färbung wird der Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) für die Detektion von lebenden Zellen verwendet. Nachdem Arbeitslösungen angesetzt werden (Calcein-AM-Arbeitslösung: Stocklösung 1:30 mit PBS verdünnen und Färbelösung: Calcein-AM-Arbeitslösung, Medium, PI-Lösung 10:100:0,5) werden folgende Schritte durchgeführt:

- Medium aus den entsprechenden Kavitäten absaugen.
- Zellen mit 50 µL PBS waschen.
- 100 µL der Farblösung in die entsprechenden Kavitäten hinzugeben und für 30 min (37 °C, 5 % CO₂) inkubieren (unter Lichtausschluss)

Die Fluoreszenzmessung wird bei Ex= 485 nm/Em= 520 nm und mit NB-Filter durchgeführt.

B.2 Proteinchemische Methoden

B.2.1 TCA-Fällung

Je 900 µL der Probe werden für die TCA-Fällung mit 100 µL TCA (100 %) versetzt. Die Proben werden 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Lösung für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet in 40 µL Laemmli-Puffer resuspendiert.

B.2.2 Densitometrie

Aufgrund von störenden Komponenten in Puffern kann der DNA Gehalt nicht über eine UV-Messung bei 280 nm oder eine der klassischen Quantifizierungsmethoden erfolgen. Hier wird die Densitometrie-Methode angewandt. Neben den zu quantifizierenden Proben werden 5 und 10 µl eines DNA-Markers in einem Agarosegel aufgetragen. Das Gel wird digitalisiert und mittels der Software Alpha Ease FC wird die Intensität der Banden bestimmt. Eine Quantifizierung ist hier durch den Vergleich mit der Bandenstärke des Markers möglich.

B.2.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch denaturierende Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli. Durch Vernetzung von Acrylamid mit N,N-Methylenbisacrylamid entsteht ein Polyacrylamidgel. TEMED ist ein organisches Amin, das die Radikalbildung initiiert. APS liefert die Startradikale, die für die Polymerisationsreaktion nötig sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden stets 12 %ige Trenngele und 6 %ige Sammelgele verwendet. Das Trenngel wird zuerst gegossen und zum Polymerisieren mit Isopropanol überschichtet. Dieses wird nach der Polymerisation wieder entfernt. Die Proben werden mit Lauffpuffer versetzt und 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 Laufront das Ende des Gels erreicht hat.

B.2.4 Silberfärbung

Das Gel wird bis zur vollständigen Entfärbung in Silberentfärber/Fixierer geschwenkt. Der Silberentfärber enthält Eisessig und Ethanol und ermöglicht somit das Ausfallen der Proteine, welches das Diffundieren der Proteine verhindert. Das Gel wird danach einmal kurz mit ddH₂O gewaschen und anschließend für 2,5 min in Farmers Reducer geschwenkt. Es wird bis zur vollständigen Entfärbung mit ddH₂O gewaschen. Danach wird das Gel für 25 min in Silbernitrat-Lösung inkubiert. In diesem Schritt werden die Ag⁺-Ionen an die Proteine angelagert. Das Gel wird danach in 2,5 %-iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Durch die Zugabe von alkalischer Formalde-

hyd-Lösung werden die Ag^+ -Ionen zu elementarem Silber reduziert, dadurch werden braune Banden sichtbar. Durch Überführen des Gels in 5 %-ige Essigsäure wird die Färbung gestoppt. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt bei 0,1 bis 1 ng pro Bande.

B.2.5 Coomassie-Färbung

Die Gele werden über Nacht in der Coomassie Lösung inkubiert. Der Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Proteine an und wird diese damit unspezifisch färben. Anschließend wird der ins Gel eingelagerte Farbstoff durch Waschen mit Wasser entfärbt. Dieser Vorgang wird wiederholt bis sich das gewünschte Banden-Hintergrund-Verhältnis eingestellt hat.

B.2.6 SemiDry Western Blot und Immunodetektion

Bei dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine PVDF-Membran immobilisiert, um anschließend immunologisch nachweisbar zu sein. Dabei wird ein Sekundärantikörper verwendet, welcher durch Katalysierung einer Farbstoffbildungsreaktion die Detektion ermöglicht.

- schwenken der PVDF-Membranen für 20 min in Methanol
- Membran anschließend min. 5 min in Transferpuffer waschen
- auf die Anode der Blotting-Apparatur ein in Transferpuffer getränktes Whatman-Paper legen
- darüber die PVDF-Membran und das SDS-PAGE-Gel platzieren
- ein weiteres feuchtes Whatman-Paper verschließt das Sandwich
- die Blots werden mit Transferpuffer befeuchtet und die Apparatur wird verschlossen

Das Blotting erfolgt für 45 min bei 15 V. Die Entwicklung der Membran erfolgt anschließend folgendermaßen:

- Membran 5 min in ddH_2O waschen
- 1 h in Blockpuffer (0,5 g Magermilchpulver in 10 ml PBS, pH 7,4) inkubieren
- 1 h mit der primären Antikörperlösung inkubieren

- 3 mal 5 min waschen mit PBST-Puffer
- 1 h in der sekundären Antikörperlösung (goat-anti-mouse IgG-(H+L)-alkaline-phosphataseconjugate) 1:3000 in TBS mit 0,5 % Tween 20) inkubieren
- 3 mal 5 min waschen mit TBST-Puffer
- 2 mal 10 min waschen mit TBS-Puffer
- 5 min waschen mit AP Puffer (aus AP Conjugate Substrate Kit von BioRad)
- Bandenentwicklung durch Zugabe der Farbentwicklungslösung (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) auslösen
- Farbentwicklung anschließend mit ddH₂O stoppen

B.2.7 Proteinquantifizierung mittels ELISA

- 10 µl der zu analysierenden Proben werden in 90 µl Na₂CO₃/NaHCO₃ Puffer aufgenommen und in 96-Loch-Platten (Polystyrene) aufgetragen
- über Nacht bei 4 °C inkubieren
- die Platte drei Mal mit reichlich 1 x PBS waschen
- Zugabe der primären Antikörperlösung und 1 h bei 37 °C inkubieren
- waschen der Proben mit 0,1 % PBST (3 mal)
- Zugabe der sekundären Antikörperlösung und 1 h bei 37 °C inkubieren
- erneutes waschen der Proben mit 0,1 % PBST (3 mal)
- Zugabe der Färbereagenzien A und B
- Reaktion nach 10 min mit 100 µl 1 M H₂SO₄ stoppen

B.2.8 Proteinquantifizierung mittels Nanodrop

Bei dem Nanodrop handelt es sich um ein Spezialphotometer zur Bestimmung der Lichtabsorption in sehr kleinen Volumina von 1-2 µL. Zunächst werden zur Initialisierung des Gerätes 2 µL dest. Wasser auf den Probenhalter pipettiert. Anschließend erfolgt eine Nullpunkteinstellung mit dem verwendeten Lösungsmittel. Danach kann die Probe am Nanodrop vermessen werden. In dieser Arbeit wird jeweils eine dreifache-Bestimmung durchgeführt und der Mittelwert aus allen erhaltenen Werten gebildet.

B.3 Mikrobiologische Methoden

B.3.1 Bakterientransformation

Es werden kompetente *E. coli* OneShot[®] TOP10-Zellen der Firma Life Technologies verwendet und nach dem folgenden Protokoll transformiert:

- 10 ng DNA mit 50 µL kompetenten Zellen versetzen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 5 min Hitzeschock bei 37 °C
- 2 min auf Eis inkubieren

Bei Ampicillinresistenz wird die Zellsuspension auf Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Bei bestehender Kanamycinresistenz werden die Bakterien in vorgewärmten 900 µL LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C für 45 min im Heizblock inkubiert. 100 µL der Zellsuspension werden auf Agar-Platten mit Kanamycin ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

B.3.2 Kultivierung von *E.coli* zur Vektoramplifikation

Die auf den Ampicillin bzw. Kanamycin versetzten Platten gewachsenen Kolonien werden verwendet, um 100 ml Schüttelkolbenkulturen anzusetzen. Es wird 18 h bei 130 rpm und 37 °C kultiviert. Aus den durch Zentrifugation geernteten Bakterien werden anschließend die Plasmide aufgereinigt (siehe Abschnitt 5.7 und Abschnitt 5.8)

B.4. Durchflusszytometrische Methode

B.4.1 Intrazelluläre Färbung

Bei der intrazellulären anti-his-tag-Färbung dringt der primäre, gegen den his-tag gerichtete Antikörper in die Zellen ein und bindet an den his-tag des rekombinanten Proteins. Durch einen sekundären PE-gelabelten Antikörper, der an den primären

Antikörper bindet, können Zellen, die his-getaggte Proteine enthalten, mit dem Durchflusszytometer detektiert werden. Folgende Schritte werden durchgeführt:

- Zellen in Block-Puffer waschen und für 5 min bei 200 g zentrifugieren
- Zellpellet in 500 µl Fixier-Lösung resuspendieren
- 20 min bei 4 °C inkubieren
- die Zellen dreimal mit 300 µl Permeabilisierungslösung waschen
- Zellen anschließend in 100 µl primärer Antikörperlösung resuspendieren
- 30 min bei 4 °C inkubieren
- die Zellen zweimal mit 300 µl Permeabilisierungslösung waschen
- 3 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- die Zellen in 100 µL sekundärer Antikörperlösung resuspendieren
- 30 min bei 4 °C inkubieren.
- Zellen zweimal mit Permeabilisierungslösung waschen
- Zellpellet in 500 µl Permeabilisierungslösung resuspendieren und in Probenröhrchen überführen
- Proben dann am Durchflusszytometer vermessen

B.4.2 Messung der Expressionsstärke von EGFP

Zur Bestimmung der EGFP-Fluoreszenzintensität werden 48 h nach der Transfektion pro Messung $2 \cdot 10^6$ Zellen abzentrifugiert (5 min, 180 xg) und zunächst in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer mit einem vorgeschriebenen Protokoll vermessen. Als Negativkontrolle werden untransfizierte Zellen verwendet und nach demselben Protokoll behandelt.

B.5 Molekularbiologische Methoden

B.5.1 RNA-Isolierung

- 1 ml Zellsuspension in Eppi geben (ca. 2 Mio Zellen)
- Zellen zentrifugieren 10 min bei 5000 rpm

- Medium vollständig entfernen
- Zellpellet in 1 ml RNA tidy G resuspendieren, auf Eis stellen (oder einfrieren)
- 20 sec mit Homogenisator homogenisieren
- unlösliches Material durch Zentrifugieren bei 12.000 g für 10 min bei 4 °C abtrennen
- klare homogenisierte Lösung in ein neues Tube überführen
- Zugabe von 200 µl Chloroform (pro 1 ml Lyselösung zu Beginn)
- Tube für 15 s kräftig schütteln (bei RT für 2-3 min inkubieren)
- zentrifugieren für 15 min bei 12.000 g und 4 °C
- wässrige Phase in neues Tube überführen
- fällen von RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol (pro 1 ml Lyselösung zu Beginn) und mixen
- Proben für 10 min bei RT inkubieren und für 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugieren
- RNA-Pellet mit 1 ml 75 % Etanol (pro 1 ml Lyselösung zu Beginn) waschen, vortexen
- zentrifugieren für 5 min bei 7.500 g und 4 °C
- RNA-Pellet lufttrocknen (nicht komplett, es wird unlöslich)
- RNA-Probe in RNase-freiem Wasser lösen und für 10 min bei 55-60 °C inkubieren

Die Quantifizierung der RNA-Menge wird mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer durchgeführt.

B 5.2 cDNA-Synthese

- 2 µg RNA (von isolierter RNA) in ein Eppi geben
- 3 µl oligo(dt) Primer hinzugeben
- mit ddH₂O auf 27 µl auffüllen
- denaturieren bei 65 °C im Thermomixer für 5 min
- 1 min auf Eis inkubieren

Die Quantifizierung der DNA-Menge wird mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer durchgeführt.

B.5.3 Polymerase Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann die Amplifikation einer bestimmten Region eines DNA-Stranges durchgeführt werden. Für die PCR wird die DNA-Vorlage, zwei spezifische Primer, eine Polymerase, deren Temperaturoptimum im Bereich von 70 °C liegt, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und entsprechende Puffer, welche u.a. Mg^{2+} - und K^{+} - Ionen enthalten müssen, benötigt. Nach der Erhöhung der Temperatur auf 94-96 °C beginnt die PCR mit einem Denaturierungsschritt, bei dem die DNA-Doppelstränge getrennt werden. Im anschließenden Anlagerungsschritt werden bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 70 °C die Primer an die komplementären Bereiche der entstandenen Einzelstränge gebunden. Ein Primer bindet an den sense-Strang, der andere Primer bindet am anti-sense Strang. Abschließend wird die Temperatur auf die optimale Temperatur für die verwendete Polymerase erhöht, so dass sie einen neuen, komplementären DNA-Strang aus den vorliegenden dNTPs synthetisiert. Die PCR-Produkte werden anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Die PCR wird mit dem iCycler von Bio-Rad durchgeführt. Die optimierten Programme für verschiedene in der Arbeit verwendete Ansätze werden im Folgenden zusammengefasst.

PCR zum Nachweis des pEGFP-N1-Plasmids:

Vorbereitung der Proben

10 µl	5x Puffer
4 µl	dNTPs
je 1 µl	Primer (0,1 pmol),
0,25 µl	GoTaq Polymerase
1 µl	DNA
ad 50 µl	RNAse freies H ₂ O

PCR-Programm

	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Schritt 1	95	300
Schritt 2	95	30
Schritt 3	60	30
Schritt 4	72	30
Schritt 5	4	

B. Methoden

Die Schritte 2-4 werden 40 x hintereinander wiederholt.

PCR zum Nachweis des pRLL.PPT.SF.TGFb.iDHFR.GFP-Plasmids:

Vorbereitung der Proben

10 µl	5x Puffer
4 µl	dNTPs
je 1 µl	Primer (0,1 pmol),
0,25 µl	GoTaq Polymerase
1 µl	DNA
ad 50 µl	RNAse freies H ₂ O

PCR-Programm

	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Schritt 1	95	300
Schritt 2	95	30
Schritt 3	56,1	30
Schritt 4	72	30
Schritt 5	4	

Die Schritte 2-4 werden 40 x hintereinander wiederholt.

Die Optimierung der Annealingtemperatur ergab eine Annealingtemperatur von 56,1 °C

PCR zur Amplifikation des TGF-β-Gens für die StarGate Klonierung:

Vorbereitung der Proben

10 µl	5x Puffer
4 µl	dNTPs
je 2,5 µl	Primer (10 µM),
0,5 µl	Q5 HighFidelity Polymerase
10 ng	DNA
ad 50 µl	RNAse freies H ₂ O

PCR-Programm

	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Schritt 1	95	300
Schritt 2	95	30
Schritt 3	58	30
Schritt 4	72	30
Schritt 5	4	

Die Schritte 2-4 wurden 35 x hintereinander wiederholt.

B.5.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, 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.

- für 1,5 %ige Agarosegele: 1,5 g Agarose in 100 mL 1 x TAE Puffer lösen und in der Mikrowelle für 120 s (900 Watt) erhitzen
- sobald die Lösung ungefähr auf 45 °C abgekühlt ist 5 µL Roti®Safe GelStain zugeben
- die Lösung in eine Gelkammer gießen
- die Schablonen für die Probestaschen einsetzen
- nach dem Polymerisieren des Gels, dieses in die Elektrophoresekammer legen und mit 1 x TAE-Puffer überschichten
- vorsichtig die Schablonen herausziehen
- 20 µL der DNA-Proben in die Taschen pipettieren
- 6 µL des 100 bp Markers (3 µL Marker + 3 µL Puffer) auftragen
- eine Spannung von 100 V für 45 min anlegen

Die Gele werden unter UV-Anregung fotografiert.

B.5.5 Plasmidpräparation (siehe Abschnitt B.5.7 und B.5.8)

B.5.6 Enzymatische Spaltung von DNA

Mithilfe des Restriktionsverdau durch die sogenannten Restriktionsenzyme kann doppelsträngige DNA geschnitten werden. Die Restriktionsenzyme werden von Bakterien genutzt, um sich vor fremder, potenziell schädlicher DNA zu schützen. Sie erkennen bestimmte Basensequenzen in den DNA-Strängen und schneiden diese spezifisch an ihren Erkennungssequenzen.

Die Spaltung der DNA erfolgt mit den Restriktionsenzymen der Firmen Fermentas und New England Biolabs gemäß der Herstellerangaben in den entsprechenden, mitgelieferten Puffern. Dazu werden 200 ng DNA für 1 h bei 37 °C mit den Restriktionsenzymen versetzt. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgt durch elektro-

phoretische Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese. Anschließend kann eine Extraktion der Fragmente aus dem Agarosegel durchgeführt werden.

B.5.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Midi Kit

Die Isolierung wird mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen folgendermaßen durchgeführt:

- 100 ml Kulturbrühe für 15 min bei 6.000 g und 4 °C abzentrifugieren
- das erhaltene Pellet wird in 4 ml P1 Puffer resuspendieren
- 4 ml Puffer P2 zugeben, gut mischen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 4 ml vorgekühlten Puffer P3 zugeben, gut mischen und für 45 min auf Eis inkubieren
- für 45 min bei 16.100 g und 4 °C zentrifugieren, Überstand abnehmen
- Überstand nochmals für 25 min bei 16.100 g und 4 °C zentrifugieren
- equilibrieren einer QIAGEN-tip 100 mittels Auftragung von 4 ml QBT Puffer
- Durchfluss auf die QIAGEN-tip 100 auftragen
- waschen der QIAGEN-tip 100 mit zweimal 10 ml QC Puffer
- eluieren der DNA mit 5 ml QF Puffer
- fällen der DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen 70 % Isopropanol zum Durchfluss aus dem vorherigen Schritt
- Zentrifugation für 30 min bei 3.300 g und 4 °C
- waschen des Pellets mit 2 ml 70 % Ethanol
- zentrifugieren für 10 min bei 15.000 g und 4 °C
- Lufttrocknung des Pellets für 10 min (oder vorsichtig 5 min mit Druckluft)
- Resuspendierung des Pellets in 500 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5)

Die Quantifizierung der DNA-Menge wird mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer durchgeführt.

B.5.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Megaprep

Die Isolierung wird mit dem Plasmid Mega Kit von Qiagen folgendermaßen durchgeführt:

- 2 l Kulturbrühe für 15 min bei 6.000 g und 4 °C abzentrifugieren
- das erhaltene Pellet in 25 ml P1 Puffer resuspendieren
- 25 ml Puffer P2 zugeben, gut mischen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 25 ml vorgekühlten Puffer P3 zugeben, gut mischen und für 45 min auf Eis inkubieren
- für 45 min bei 16.100 g und 4 °C zentrifugieren, Überstand abnehmen
- Überstand nochmals für 25 min bei 16.100 g und 4 °C zentrifugieren
- equilibrieren einer QIAGEN-tip 100 mittels Auftragung von 25 ml QBT Puffer
- Überstand auf die QIAGEN-tip 100 auftragen
- waschen der QIAGEN-tip 100 mit zweimal 20 ml QC Puffer
- eluieren der DNA mit 5 ml QF Puffer
- fällen der DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen 70 % Isopropanol zum Eluat aus dem vorherigen Schritt
- Zentrifugation für 30 min bei 3.300 g und 4 °C
- waschen des Pellets mit 2 ml 70 % Ethanol
- zentrifugieren für 10 min bei 15.000 g und 4 °C
- Lufttrocknung des Pellets für 10 min (oder vorsichtig 5 min mit Druckluft)
- resuspendieren des Pellets in 500 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5)

Die Quantifizierung der DNA-Menge wird mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer durchgeführt.

B.5.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wird mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden ebenfalls von der Firma Qiagen hergestellt. Die Isolierung wird folgendermaßen durchgeführt:

- Fragmente werden aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen
- 3faches Gelvolumen von QG-Puffer wird hinzugegeben und bis zum Auflösen des Gels bei 50 °C in einem Thermomixer geschüttelt
- die Lösung wird mit einem Gelvolumen (Ausgangsvolumen) Isopropanol versetzt und auf die QIAquick-column aufgetragen und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert
- Waschen der QIAquick-column mit 750 µl PE Puffer, 5 min stehenlassen und anschließend zentrifugieren
- Eluieren der DNA mit 40 µl 10 mM Tris (pH 8,5)

Die Quantifizierung der DNA-Menge wird densitometrisch durchgeführt.

B.5.10 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung der DNA wurden 15 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung mit 5 µl des Primers an die Firma Eurofins MWG Operon verschickt. Die Lösung hat eine DNA-Konzentration von 70 ng/µl. Die Ergebnisse der Sequenzierung werden mit dem CLC-Sequence Viewer ausgewertet.

B.5.11 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch ermittelt werden. Dabei wird die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm gemessen, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum aufweisen. Über das Lambert-Beersche Gesetz kann dann die Konzentration bestimmt werden. Der Extinktionswert ist bei einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA näherungsweise 1.

$$E = c \cdot d \cdot e$$

E = Extinktion

c = Konzentration (mol/L)

d = Dicke der Küvette (cm)

e = molarer Extinktionskoeffizient (L·mol⁻¹·cm⁻¹)

Die Messung findet am Nanodrop 1000 von Thermo Scientific mittels der Software ND1000 statt. Als Blankprobe wird der Puffer verwendet, in dem die DNA gelöst ist.

B.5.12 Klonierung nach dem StarGate Cloning System

Die Amplifikation erfolgt nach der in B.5.3 dargestellten PCR. Die PCR-Fragmente werden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Fragment der entsprechenden Größe nach der in B.5.9 dargestellten Methode aufgereinigt. Die Generierung des Donorvektors erfolgt durch Restriktion und Ligation. Es wird folgender Ansatz pipettiert:

10 µl	pENTRY-IBA51
12 µl	PCR-Produkt (2 nM)
je 1 µl	Starsolution M1, M2, M3

Es folgt eine Inkubation von 1 h bei 30 °C. Anschließend werden kompetente *E.coli* nach Protokoll B.3.1 mit dem Ligationsansatz transformiert. Das Plasmid wird aufgereinigt und es folgt ein Kontrollrestriktionsverdau mit den Enzymen Xba I und Hind III. Scheinbar positive Klone werden zur Verifizierung sequenziert.

Der Akzeptorvektor wird folgendermaßen generiert:

10 µl	pOSG-IBA102
12 µl	PCR-Produkt (2 ng/µl)
je 1 µl	Starsolution A1, A2, A3

Es folgt eine Inkubation von 1 h bei 30 °C. Anschließend können kompetente *E. coli* nach Protokoll B.3.1 mit dem Ligationsansatz transformiert werden. Nach Aufreinigung des Plasmids erfolgt zur Verifizierung ein Kontrollrestriktionsverdau mit Hind III und XhoI.

B.6 Chromatographische Methoden

B.6.1 Aufreinigung des TGF-β1

Vorbereitung des Zellkulturüberstandes für das WET FRED System

Die Überstände werden für 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert und die Pellets verworfen. Die dabei erhaltenen Überstände werden durch einen 0,2 µm-Filter steril

filtriert. Anschließend wird der pH-Wert der erhaltenen Lösung mit dem entsprechenden Bindungspuffer angepasst.

Verwendete Puffer:

10X Regenerationspuffer (R1): 1 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM HABA, pH 8.0

10X Waschpuffer (W1): 1 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 8.0

10X Elutionspuffer (E1): 1 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 25 mM d-biotin, pH 8.0

Für die Aufreinigung des TGF- β 1 wurde die Säule strep-Tactin Superflow Column verwendet.

Durchführung:

- Equilibrieren der Säule mit 2 mL W1-Puffer
- Aufbau des WetFred System (siehe Abbildung 4.38)
- Zellkulturüberstand (1:10) mit R1-Puffer versetzt.
- Beladung der Säule mit dem Kulturüberstand
- Waschen der Säule mit W1-Puffer (5 X 1 mL)
- Elution des Protein mit E1-Puffer (5 X 0.5 mL)
- Waschen der Säule mit W1-Puffer (2 X 4 mL)

Die Säule wird mit W1-Puffer bei 4 °C gelagert.

C. Übersicht der betreuten Arbeiten

In Kapitel 3.1, 3.3 und 3.4 sind teilweise Ergebnisse dargestellt, die während der Zusammenarbeit mit Frau Sabrina Baganz entstanden und Bestandteile der Masterarbeit „Expression des rekombinanten Wachstumsfaktors TGF- β in hochproduzierenden Säugerzellen (2013)“ waren.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. ABDULKERIM, *Expression und Aufreinigung des rekombinanten Wachstumsfaktors TGF-beta in CHO-Zellen*, Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover (2010).
- [2] A. AKINC, M. THOMAS, A. M. KLIBANOV and R. LANGER, *Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis*, J Gene Med, 7 (2005), pp. 657-63.
- [3] M. S. AL-DOSARI and X. GAO, *Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress*, AAPS J, 11 (2009), pp. 671-81.
- [4] R. K. ASSOIAN, A. KOMORIYA, C. A. MEYERS, D. M. MILLER and M. B. SPORN, *Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization*, J Biol Chem, 258 (1983), pp. 7155-60.
- [5] G. BACKLIWAL, M. HILDINGER, V. HASIJA and F. M. WURM, *High-density transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI*, Biotechnology and Bioengineering, 99 (2008), pp. 721-727.
- [6] F. R. BALKWILL and F. BURKE, *The cytokine network*, Immunol Today, 10 (1989), pp. 299-304.
- [7] F. BANEYX and M. MUJACIC, *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*, Nat Biotechnol, 22 (2004), pp. 1399-408.
- [8] J. A. BARNARD, R. M. LYONS and H. L. MOSES, *The cell biology of transforming growth factor beta*, Biochim Biophys Acta, 1032 (1990), pp. 79-87.
- [9] P. BLUMBERG, R. BRENNER, S. BUDNY and H. KRESSE, *Increased turnover of small proteoglycans synthesized by human osteoblasts during cultivation with ascorbate and beta-glycerophosphate*, Calcif Tissue Int, 60 (1997), pp. 554-60.
- [10] A. BOLHUIS, H. TJALSMA, H. E. SMITH, A. DE JONG, R. MEIMA, G. VENEMA, S. BRON and J. M. VAN DIJL, *Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in Bacillus subtilis*, Appl Environ Microbiol, 65 (1999), pp. 2934-41.
- [11] L. F. BONEWALD, *Transforming growth factor*, in J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan, eds., *Principles of Bone Biology*, Acad. Press, New York, 1996, pp. 647-659.
- [12] S. BONK, *Darstellung und Testung rekombinanter humaner Zytokine*, Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover (2010), pp. 5-7.
- [13] M. BOSHART, F. WEBER, G. JAHN, K. DORSCH-HASLER, B. FLECKENSTEIN and W. SCHAFFNER, *A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus*, Cell, 41 (1985), pp. 521-30.

- [14] M. BOTTNER, K. KRIEGLSTEIN and K. UNSICKER, *The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions*, J Neurochem, 75 (2000), pp. 2227-40.
- [15] 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*, Proc Natl Acad Sci U S A, 92 (1995), pp. 7297-301.
- [16] A. COLOSIMO, K. K. GONCZ, A. R. HOLMES, K. KUNZELMANN, G. NOVELLI, R. W. MALONE, M. J. BENNETT and D. C. GRUENERT, *Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells*, Biotechniques, 29 (2000), pp. 314-8, 320-2, 324 passim.
- [17] S. E. CRAWFORD, V. STELLMACH, J. E. MURPHY-ULLRICH, S. M. RIBEIRO, J. LAWLER, R. O. HYNES, G. P. BOIVIN and N. BOUCK, *Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo*, Cell, 93 (1998), pp. 1159-70.
- [18] J. H. CURFS, J. F. MEIS and J. A. HOOGKAMP-KORSTANJE, *A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers*, Clin Microbiol Rev, 10 (1997), pp. 742-80.
- [19] R. DALY and M. T. HEARN, *Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production*, J Mol Recognit, 18 (2005), pp. 119-38.
- [20] S. DENNLER, M. J. GOUMANS and P. TEN DIJKE, *Transforming growth factor beta signal transduction*, J Leukoc Biol, 71 (2002), pp. 731-40.
- [21] M. DEROUAZI, P. GIRARD, F. VAN TILBORGH, K. IGLESIAS, N. MULLER, M. BERTSCHINGER and F. M. WURM, *Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells*, Biotechnol Bioeng, 87 (2004), pp. 537-45.
- [22] R. DERYNCK, P. B. LINDQUIST, A. LEE, D. WEN, J. TAMM, J. L. GRAYCAR, L. RHEE, A. J. MASON, D. A. MILLER, R. J. COFFEY and ET AL., *A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3*, EMBO J, 7 (1988), pp. 3737-43.
- [23] R. DERYNCK and Y. E. ZHANG, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*, Nature, 425 (2003), pp. 577-84.
- [24] O. DOHR and J. ABEL, *Transforming growth factor-beta1 coregulates mRNA expression of aryl hydrocarbon receptor and cell-cycle-regulating genes in human cancer cell lines*, Biochem Biophys Res Commun, 241 (1997), pp. 86-91.
- [25] C. M. DUBOIS, M. H. LAPRISE, F. BLANCHETTE, L. E. GENTRY and R. LEDUC, *Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase*, J Biol Chem, 270 (1995), pp. 10618-24.
- [26] T. EBENDAL, H. BENGTSSON and S. SODERSTROM, *Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain*, J Neurosci Res, 51 (1998), pp. 139-46.
- [27] R. L. ELLIOTT and G. C. BLOBE, *Role of transforming growth factor Beta in human cancer*, J Clin Oncol, 23 (2005), pp. 2078-93.

- [28] M. E. ENGEL, M. A. MCDONNELL, B. K. LAW and H. L. MOSES, *Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription*, J Biol Chem, 274 (1999), pp. 37413-20.
- [29] P. J. FAGENHOLZ, S. M. WARREN, J. A. GREENWALD, P. J. BOULETREAU, J. A. SPECTOR, F. E. CRISERA and M. T. LONGAKER, *Osteoblast gene expression is differentially regulated by TGF-beta isoforms*, J Craniofac Surg, 12 (2001), pp. 183-90.
- [30] P. L. FELGNER, T. R. GADEK, M. HOLM, R. ROMAN, H. W. CHAN, M. WENZ, J. P. NORTHROP, G. M. RINGOLD and M. DANIELSEN, *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*, Proc Natl Acad Sci U S A, 84 (1987), pp. 7413-7.
- [31] D. FISCHER, T. BIEBER, Y. LI, H. P. ELSASSER and T. KISSEL, *A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity*, Pharm Res, 16 (1999), pp. 1273-9.
- [32] Y. W. FONG and Q. ZHOU, *Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation*, Nature, 414 (2001), pp. 929-33.
- [33] M. FUNABA, C. M. ZIMMERMAN and L. S. MATHEWS, *Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase*, J Biol Chem, 277 (2002), pp. 41361-8.
- [34] A. GRAF, M. DRAGOSITS, B. GASSER and D. MATTANOVICH, *Yeast systems biotechnology for the production of heterologous proteins*, FEMS Yeast Res, 9 (2009), pp. 335-48.
- [35] C. HAAKE, *Prozesse zur Produktion, Aufreinigung und Testung von rekombinanten humanen Zytokinen aus chinese hamster ovary-Zellen*, Dissertation, Leibniz Universität Hannover (2012).
- [36] G. HANNIG and S. C. MAKRIDES, *Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli*, Trends Biotechnol, 16 (1998), pp. 54-60.
- [37] M. HILDINGER, K. L. ABEL, W. OSTERTAG and C. BAUM, *Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use*, J Virol, 73 (1999), pp. 4083-9.
- [38] C. S. HILL, *Signalling to the nucleus by members of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily*, Cell Signal, 8 (1996), pp. 533-44.
- [39] R. C. HOCKNEY, *Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli*, Trends Biotechnol, 12 (1994), pp. 456-63.
- [40] C. HOLZ, B. PRINZ, N. BOLOTINA, V. SIEVERT, K. BUSSOW, B. SIMON, U. STAHL and C. LANG, *Establishing the yeast Saccharomyces cerevisiae as a system for expression of human proteins on a proteome-scale*, J Struct Funct Genomics, 4 (2003), pp. 97-108.
- [41] S. W. HUI, M. LANGNER, Y. L. ZHAO, P. ROSS, E. HURLEY and K. CHAN, *The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer*, Biophys J, 71 (1996), pp. 590-9.

- [42] M. W. HUNGERFORD and M. A. MONT, *Potential uses of cytokines and growth factors in treatment of osteonecrosis*, Orthopade, 29 (2000), pp. 442-8.
- [43] M. HUSE, T. W. MUIR, L. XU, Y. G. CHEN, J. KURIYAN and J. MASSAGUE, *The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch*, Mol Cell, 8 (2001), pp. 671-82.
- [44] S. ITOH, F. ITOH, M. J. GOUMANS and P. TEN DIJKE, *Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins*, Eur J Biochem, 267 (2000), pp. 6954-67.
- [45] N. JENKINS, R. B. PAREKH and D. C. JAMES, *Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry*, Nat Biotechnol, 14 (1996), pp. 975-81.
- [46] T. K. KIM and J. H. EBERWINE, *Mammalian cell transfection: the present and the future*, Anal Bioanal Chem, 397, pp. 3173-8.
- [47] D. M. KINGSLEY, *The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms*, Genes Dev, 8 (1994), pp. 133-46.
- [48] T. KISHIMOTO, T. TAGA and S. AKIRA, *Cytokine signal transduction*, Cell, 76 (1994), pp. 253-62.
- [49] M. KLOUCHE, *Zytokine. Ein Zweischneidiges Schwert in Der Pathogenese Und Der Therapie Von Krebserkrankungen*, Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz, 46 (2003), pp. 203-210.
- [50] M. KRETZSCHMAR, J. DOODY, I. TIMOKHINA and J. MASSAGUE, *A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras*, Genes Dev, 13 (1999), pp. 804-16.
- [51] P. LI, A. ANUMANTHAN, X. G. GAO, K. ILANGO VAN, V. V. SUZARA, N. DUZGUNES and V. RENUGOPALAKRISHNAN, *Expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*, Appl Biochem Biotechnol, 142 (2007), pp. 105-24.
- [52] D. C. LITZINGER and L. HUANG, *Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications*, Biochim Biophys Acta, 1113 (1992), pp. 201-27.
- [53] H. LOPPNOW, *Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action*, Internist (Berl), 42 (2001), pp. 13-4, 17-27.
- [54] M. LUTZ and P. KNAUS, *Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network*, Cell Signal, 14 (2002), pp. 977-88.
- [55] S. C. MAKRIDES, *Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli*, Microbiol Rev, 60 (1996), pp. 512-38.
- [56] C. MARCELLI, A. J. YATES and G. R. MUNDY, *In vivo effects of human recombinant transforming growth factor beta on bone turnover in normal mice*, J Bone Miner Res, 5 (1990), pp. 1087-96.
- [57] J. MASSAGUE, *Receptors for the TGF-beta family*, Cell, 69 (1992), pp. 1067-70.

- [58] J. MASSAGUE, *TGF-beta signal transduction*, Annu Rev Biochem, 67 (1998), pp. 753-91.
- [59] J. MASSAGUE, *The transforming growth factor-beta family*, Annu Rev Cell Biol, 6 (1990), pp. 597-641.
- [60] J. MASSAGUE and Y. G. CHEN, *Controlling TGF-beta signaling*, Genes Dev, 14 (2000), pp. 627-44.
- [61] M. MATASCI, L. BALDI, D. L. HACKER and F. M. WURM, *The PiggyBac transposon enhances the frequency of CHO stable cell line generation and yields recombinant lines with superior productivity and stability*, Biotechnol Bioeng, 108 (2011), pp. 2141-50.
- [62] A. MAZARS, F. LALLEMAND, C. PRUNIER, J. MARAIS, N. FERRAND, M. PESSAH, G. CHERQUI and A. ATFI, *Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis*, J Biol Chem, 276 (2001), pp. 36797-803.
- [63] P. MEISSNER, H. PICK, A. KULANGARA, P. CHATELLARD, K. FRIEDRICH and F. M. WURM, *Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells*, Biotechnol Bioeng, 75 (2001), pp. 197-203.
- [64] K. MIYAZONO, U. HELLMAN, C. WERNSTEDT and C. H. HELDIN, *Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization*, J Biol Chem, 263 (1988), pp. 6407-15.
- [65] A. MOUSTAKAS, K. PARDALI, A. GAAL and C. H. HELDIN, *Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation*, Immunol Lett, 82 (2002), pp. 85-91.
- [66] J. S. MUNGER, J. G. HARPEL, P. E. GLEIZES, R. MAZZIERI, I. NUNES and D. B. RIFKIN, *Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation*, Kidney Int, 51 (1997), pp. 1376-82.
- [67] 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*, Mol Cell Biol, 7 (1987), pp. 4125-9.
- [68] A. NOTT, H. LE HIR and M. J. MOORE, *Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex*, Genes Dev, 18 (2004), pp. 210-22.
- [69] A. L. PARKER, C. NEWMAN, S. BRIGGS, L. SEYMOUR and P. J. SHERIDAN, *Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine*, Expert Rev Mol Med, 5 (2003), pp. 1-15.
- [70] P. L. PHAM, S. PERRET, H. C. DOAN, B. CASS, G. ST-LAURENT, A. KAMEN and Y. DUROCHER, *Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency*, Biotechnol Bioeng, 84 (2003), pp. 332-42.
- [71] R. REED and E. HURT, *A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing*, Cell, 108 (2002), pp. 523-31.

- [72] ROBERT-KOCH-INSTITUT, *Bedeutung von Zytokinbestimmungen in der umweltmedizinischen Praxis*, Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz, 47 (2004), pp. 73-79.
- [73] A. B. ROBERTS, *Molecular and cell biology of TGF-beta*, Miner Electrolyte Metab, 24 (1998), pp. 111-9.
- [74] A. B. ROBERTS, M. A. ANZANO, L. C. LAMB, J. M. SMITH and M. B. SPORN, *New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues*, Proc Natl Acad Sci U S A, 78 (1981), pp. 5339-43.
- [75] T. SAKOU, *Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches*, Bone, 22 (1998), pp. 591-603.
- [76] R. SASADA, H. ONDA and K. IGARASHI, *The Establishment of Il-2 Producing Cells by Genetic-Engineering*, Cell Structure and Function, 12 (1987), pp. 205-217.
- [77] 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 O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells*, Mol Ther, 13 (2006), pp. 391-400.
- [78] 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*, Exp Hematol, 34 (2006), pp. 588-92.
- [79] R. SCHLINGENSIEPEN, *Immuntherapie gegen maligne Tumore mit Antisense AP 12009: Technologie, Target, Therapie*, Journal Onkologie (2005).
- [80] M. SCHMOLZ, *Transforming Growth Factor beta (TGF-β): Eine neue Regelstrecke für antiphlogistische Therapien?*, Biologische Medizin, 29 (2000), pp. 31-4.
- [81] Y. SHI, Y. F. WANG, L. JAYARAMAN, H. YANG, J. MASSAGUE and N. P. PAVLETICH, *Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling*, Cell, 94 (1998), pp. 585-94.
- [82] J. R. SIEWERT, *Chirurgie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2006, pp. 75 ff.
- [83] J. SODEK and S. CHEIFETZ, *Molecular regulation of osteogenesis*, in J. E. Davies, ed., *Bone engineering*, Toronto, 2000, pp. 31-43.
- [84] K. SUZUKI, H. NAKAZATO, H. MATSUI, M. HASUMI, Y. SHIBATA, K. ITO, Y. FUKABORI, K. KUOKAWA 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*, J Leukoc Biol, 69 (2001), pp. 531-7.
- [85] J. TAIPALE and J. KESKI-OJA, *Growth factors in the extracellular matrix*, FASEB J, 11 (1997), pp. 51-9.

- [86] P. THOMAS and T. G. SMART, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*, J Pharmacol Toxicol Methods, 51 (2005), pp. 187-200.
- [87] J. H. TJIO and T. T. PUCK, *Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture*, J Exp Med, 108 (1958), pp. 259-68.
- [88] G. URLAUB and L. A. CHASIN, *Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity*, Proc Natl Acad Sci U S A, 77 (1980), pp. 4216-20.
- [89] P. M. VOGT, F. W. PETER, E. TOPSAKAL, A. TORRES and H. U. STEINAU, *Zum Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Therapie chronischer Wunden*, Chirurg, 69 (1998), pp. 1197-1206.
- [90] L. WIGHTMAN, R. KIRCHEIS, V. ROSSLER, S. CAROTTA, R. RUZICKA, M. KURSA and E. WAGNER, *Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo*, J Gene Med, 3 (2001), pp. 362-72.
- [91] J. L. WRANA, L. ATTISANO, R. WIESER, F. VENTURA and J. MASSAGUE, *Mechanism of activation of the TGF-beta receptor*, Nature, 370 (1994), pp. 341-7.
- [92] M. WRANN, S. BODMER, R. DE MARTIN, C. SIEPL, R. HOFER-WARBINEK, K. FREI, E. HOFER and A. FONTANA, *T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor-beta*, EMBO J, 6 (1987), pp. 1633-6.
- [93] F. WURM and A. BERNARD, *Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production*, Curr Opin Biotechnol, 10 (1999), pp. 156-9.
- [94] F. M. WURM, *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*, Nat Biotechnol, 22 (2004), pp. 1393-8.
- [95] Y. XU and F. C. SZOKA, JR., *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection*, Biochemistry, 35 (1996), pp. 5616-23.
- [96] T. YOSHIKAWA, F. NAKANISHI, S. ITAMI, D. KAMEOKA, T. OMASA, Y. KATAKURA, M. KISHIMOTO and K. SUGA, *Evaluation of stable and highly productive gene amplified CHO cell line based on the location of amplified genes*, Cytotechnology, 33 (2000), pp. 37-46.
- [97] 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*, J Biol Chem, 270 (1995), pp. 18997-9007.

Lebenslauf

Estabraq Abdulkerim
Diplom-Chemikerin

*19.07.1981, Kuwait City-Kuwait
Staatsangehörigkeit: Deutsch

BERUFLICHE PRAXIS

04.2010 – 12.2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

AUSBILDUNG

04. 2010 – 22.01.2014 Promotionsstudium, Leibniz Universität Hannover
Hauptfach: Technische Chemie
Nebenfach: Biochemie

Dissertation „Optimierung und Anwendung von
Strategien zur Herstellung von TGF- β 1 in
eukaryotischen Zellen“ unter der Leitung von Professor
Dr. Thomas Scheper, Leibniz Universität Hannover

10.2003- 07.2009 Studiengang Chemie Diplom, Leibniz Universität
Hannover

Abschluss: Diplom-Chemikerin (Prüfungsfächer: Orga-
nische/ Anorganische/ Physikalische/ Technische Che-
mie)
Note: gut

Diplomarbeit: „Expression und Aufreinigung von TGF-
 β 1 in CHO-Zellen“ unter der Leitung von Professor Dr.
Thomas Scheper, Institut für Technische Chemie, Leib-
niz Universität Hannover, Note: sehr gut

2000 – 2003 Gymnasium Tellkampfschule in Hannover, Abschluss:
Abitur

FÖRDERUNG

2011 2011 Reisestipendium der *European Society of Animal
Cell Technology* (ESACT)

Publikationsliste

Paper

Estabraq Abdulkerim, Sabrina Baganz, Axel Schambach, Cornelia Kasper, Thomas Scheper. Production and purification of TGFb-1 in CHO-Cells. BMC Proceedings 2011, 5 (Suppl 8): P.134

Conference Proceedings

Produktion and Purification of a human TGF beta 1 (IL2 SP) in CHO^{SFS} cells

in: *Proceeding of the 22nd Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Viena, Austria, May 15-18, 2011.*

Estabraq Abdulkerim, Sabrina Baganz, Axel Schambach, Cornelia Kasper, Thomas Scheper.