

Aus der Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB)
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

Vergleich ausgewählter biologischer Parameter von isolierten Fischzellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

Inauguraldissertation zur Erlangung
der Doktorwürde der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Naturwissenschaften –

vorgelegt von
Lars Lüllwitz
aus Berlin

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charli Kruse
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Anemüller

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.Juli 2014

*gewidmet meiner Mama Karin,
und ihrer unerschütterlichen Zuversicht*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	<i>i</i>
Zusammenfassung	<i>v</i>
Abstract	<i>vii</i>
1. Einleitung	1
1.1 Fisch als Lebensmittel	1
1.2 Omega-3 Fettsäuren	1
1.2.1 Physiologische Bedeutung von Omega-3 LC-PUFAs	4
1.2.1.1 Omega-3 LC-PUFAs in der neuronalen Entwicklung	4
1.2.1.2 Omega-3 LC-PUFAs im Entzündungsgeschehen.....	5
1.2.2 Omega-3 LC-PUFAs als therapeutische Substanzen	6
1.2.2.1 Erkrankungen entzündlicher Pathogenese	6
1.2.2.2 Das metabolische Syndrom.....	6
1.2.2.3 Weitere therapeutische Ansätze.....	8
1.2.3 Vorkommen natürlicher Omega-3 Fettsäuren	8
1.2.4 Omega-3 Fettsäuren im Fisch	8
1.3 Marine Fischbestände.....	10
1.4 Aquakultur	12
1.4.1 Alternativen zum Fischmehl	13
1.4.2 Alternativen zum Fischöl	15
1.5 Proliferative <i>in vitro</i> Fischzellkulturen	16
1.5.1 Anwendungspotentiale von <i>in vitro</i> Fischzellkulturen	17
1.5.2 Kultivierungstechniken	18
1.5.2.1 Zellkultur <i>scale-up</i>	18
1.5.2.2 Kultivierung in Bioreaktoren	19
• Microcarrier	20
• Fest-, Flüssig- und Drehbettreaktoren.....	22
• vaskularisierte Systeme	23
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	24

2. Materialien und Methoden	26
2.1 Materialien	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Software	28
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4 Chemikalien und Kits	30
2.1.5 Medien, Puffer und Arbeitslösungen	31
2.1.6 <i>In vitro</i> Zellkulturen	33
2.1.6.1 Fischzellen	33
• Langzeit-Fischzellkultur der Regenbogenforelle	33
• Langzeit-Fischzellkultur des Atlantischen Störs	33
2.1.6.2 Säugetierzellen	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Zellkultur	34
2.2.1.1 Allgemeine Arbeitshinweise der <i>in vitro</i> Zellkultur	34
2.2.1.2 Anlegen einer Zellkultur aus kryokonservierten Zellen	35
2.2.1.3 Medienwechsel	35
2.2.1.4 Subkultivierung von Zellen	35
2.2.1.5 Inokulation der Glasperlen mit Zellen	36
2.2.1.6 Inokulation der Netzhewebe mit Zellen	36
2.2.1.7 Bestimmung des Abnahmezeitpunktes der Glasperlen	38
2.2.1.8 Vereinzelung der Zellen auf den Netzheweben	38
2.2.1.9 Bestimmung der Zellzahl suspendierter Zellen	39
• Neubauer <i>improved</i> -Zählkammer	39
• NucleoCounter®	39
2.2.1.10 Zusatz von α -Linolensäure zum Zellkulturmedium	39
2.2.1.11 Reduktion der Zellkulturtemperatur	40
2.2.1.12 Kryokonservierung von Zellen	40
2.2.1.13 Gefriertrocknung <i>in vitro</i> kultivierter Zellen	40
2.2.1.14 DAPI-Zellkernfärbung	41
2.2.1.15 OilRedO- / Hämatoxylin-Färbung	41
2.2.1.16 Bestimmung der relativen Lipidperoxidation	41
2.2.1.17 Bestimmung der relativen Anzahl mitotischer Zellen	43
2.2.2 Bioreaktoren	44
2.2.2.1 Kultivierung von AOXlar7 im BioLevigator™ Bioreaktor	44
2.2.2.2 Kultivierung von AOXlar7 im Z®RP <i>breeder</i>	45

2.2.3	Entwicklung eines neuartigen Bioreaktorprinzips	47
2.2.3.1	Technische Modifikationen des Multifors® 2 Bioreaktors	48
	• Konditionierungsreaktor	48
	• Kultivierungsreaktor	48
	• Hochdruckverbindung zwischen Konditionierungs- und Kultivierungsreaktor	52
	• Kreislauf des Nährmediums	53
2.2.3.2	Vorbereitung des modifizierten Multifors® 2 Bioreaktors	53
2.2.3.3	Überführung der Netzgewebe in den Multifors® 2 Bioreaktor	56
2.2.4	Analytische Bestimmungsmethoden	56
2.2.4.1	Aminosäurebestimmung	56
2.2.4.2	Fettsäurebestimmung	57
3.	Ergebnisse	59
3.1	Ernährungsphysiologische Charakterisierung der Langzeit-Fischzellkulturen.....	59
3.1.1	Aminosäurezusammensetzung <i>in vitro</i> kultivierter Fischzellen	59
3.1.2	Fettsäurezusammensetzung <i>in vitro</i> kultivierter Fischzellen	62
3.1.3	Lipid-Färbung mit OilRedO	66
3.1.4	Messung der relativen Lipidperoxidation	69
3.1.5	Wachstumsanalyse von Langzeit-Fischzellkulturen	71
3.2	Zellkultur <i>scale-up</i> und Biomasseproduktion von AOXlar7 Zellen	76
3.2.1	Kultivierung von AOXlar7 Zellen im BioLevigator™	77
3.2.2	Kultivierung von AOXlar7 im Z®RP <i>breeder</i>	79
3.2.3	Entwicklung eines neuartigen Kultivierungskonzeptes	82
3.2.3.1	Kultivierung von Z29 Zellen im modifizierten Multifors® 2	95
3.2.3.2	Kultivierung von AOXlar7 Zellen im modifizierten Multifors® 2	96
4.	Diskussion.....	100
4.1	Ernährungsphysiologische Charakterisierung der Langzeit-Fischzellkulturen.....	101
4.1.1	Proteingehalt und Aminosäurezusammensetzung	101
4.1.2	Fettgehalt und Fettsäurezusammensetzung	104
4.2	Wachstumsverhalten.....	115
4.3	Zellkultur <i>scale-up</i> und Biomasseproduktion von AOXlar7 Zellen	119
4.4	Fazit und Ausblick des Projektvorhabens.....	131
5.	Literaturverzeichnis.....	135

6. Anhang.....	153
6.1 Ergänzende Tabellen und Abbildungen aus dem Ergebnisteil	153
6.2 Sprühbildanalysen unterschiedlicher Sprühdüsen.....	158
6.3 Abkürzungsverzeichnis	161
6.4 Verzeichnis der beiliegenden DVD.....	166
6.5 Abbildungsverzeichnis	167
6.6 Tabellenverzeichnis	170
6.7 Eidesstattliche Versicherung	171
6.8 Danksagung.....	172

Zusammenfassung

Fisch ist ein Lebensmittel, welches eine Vielzahl essentieller bzw. semiessentieller Nährstoffe enthält. Abgesehen vom außerordentlich hohen Proteingehalt sind die reichhaltig enthaltenen marinen Omega-3 Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) von übergeordnetem Interesse. Die Versorgung mit Fisch als Lebensmittel kann allerdings, in Gegenwart begrenzter natürlicher Fischbestände, lediglich durch die Produktion in der Aquakultur gewährleistet werden, welche wiederum von fischspezifischen Futterbestandteilen wie z.B. Fischmehl abhängig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus Langzeit-Fischzellkulturen Zell-Lyophilisate hergestellt, die hinsichtlich ihrer Aminosäure- und Fettsäurezusammensetzung untersucht wurden. Im Lyophilisat einer Vollhautzellkultur der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) wurde neben einer ausgewogenen Zusammensetzung essentieller Aminosäuren ein besonders hoher Gesamtproteingehalt ermittelt. Bezogen auf die Fettsäurezusammensetzung war auffallend, dass DHA in den Zellen nachgewiesen wurde, obwohl diese Fettsäure im Nährmedium nicht detektiert werden konnte. Durch die sequentielle Reduktion der Kultivierungstemperatur um 10 °C konnte in den Zellen ein signifikanter Anstieg der langkettigen und hochgradig ungesättigten Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure (AA) und DHA erreicht werden. Der Zusatz von 130 µM α -Linolensäure (ALA) zum Nährmedium führte zwar zu einem signifikanten Anstieg von ALA und EPA in den Zellen, der Anteil an DHA blieb allerdings unverändert. Erst durch eine Kombination beider Zellkulturbedingungen wurde ein Anstieg von EPA und DHA in den Zellen ermittelt.

Bei einer larvalen Zellkultur des Atlantischen Störs (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) sollte ebenfalls untersucht werden, ob die Veränderung der Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf den Fettsäuremetabolismus der Zellen hat. Tendenziell wurden dabei vergleichbare Effekte beobachtet, so dass anschaulich demonstriert werden konnte, dass sowohl Hautzellen der Regenbogenforelle, als auch larvale Zellen des Atlantischen Störs in der Lage sind, aus kurzkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren langkettige und hochgradig ungesättigte Fettsäuren zu metabolisieren. Die Effekte waren bei den Zellen des Atlantischen Störs jedoch wesentlich stärker ausgeprägt. Bei diesen Zellen wurde zusätzlich ein deutlicher, zum Teil signifikanter Effekt auf den Gesamtfettgehalt beobachtet. Anders als bei den Zellen der Regenbogenforelle kam

es durch die Reduktion der Kultivierungstemperatur um 10 °C zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamtfettgehalts. Zudem wurde bei diesen Zellen ein deutlicher Einfluss auf die relative Lipidperoxidation beobachtet, welcher ein möglicher Hinweis auf das Vorhandensein antioxidativ wirksamer Mechanismen in diesen Zellen ist.

Bei beiden Fischzellkulturen wurde eine passagenabhängige Zunahme der Proliferation beobachtet, welche durch eine gleichzeitige Zunahme der relativen Anzahl mitotischer Zellen gekennzeichnet war. Im Hinblick auf eine industriell orientierte Biomasseproduktion adhärent wachsender Zellen konnte in Untersuchungen zum Wachstumsverhalten gezeigt werden, dass unterschiedliche dreidimensionale Oberflächen als Wachstumsoberfläche akzeptiert werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sich sphärische Glasoberflächen eignen, um adhärente Zellen zu mobilisieren. Diese Glasperlen konnten beispielsweise auf Netzgewebe pipettiert werden, wodurch es gelang, diese Netzgewebe mit Zellen zu besiedeln. Darüber hinaus war es möglich, ausgehend von einer einmalig vorgegebenen Anzahl an bewachsenen Glasperlen, zehn unbesiedelte Netzgewebe mit Zellen zu besiedeln, ohne dass die Zellen dafür mit proteolytischen Enzymen behandelt werden mussten.

Für die Biomasseproduktion adhärent wachsender Fischzellen wurden zwei verschiedene Bioreaktorsysteme getestet und das Zellwachstum bewertet. Da sich weder im BioLevigator™ noch im Z®RP *breeder* eine zufriedenstellende Zellexpansion einstellte, wurde ein eigenes, völlig neuartiges Kultivierungskonzept entwickelt und testweise betrieben. Hiermit konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, sowohl Säugtierzellen, als auch Fischzellen in einer Reaktorkammer zu kultivieren, in der das Nährmedium mit Hilfe einer Sprühdüse fein zerstäubt wird. Hiermit konnten zum Teil deutlich höhere Gesamtzellzahlen erreicht werden, als bei der herkömmlichen, submersen Kontrollkultur. Durch die Möglichkeit der Kultivierung im Sprühnebel könnten, zusammen mit einer wiederholenden Inokulation von Netzgeweben, völlig andersartige Reaktoren konzipiert werden, die z.B. durch eine kontinuierliche Kultivierung zu einer kosteneffizienteren Produktion adhärent wachsender Zellen beitragen könnten. Aufgrund der Erkenntnisse dieser Arbeit über die Anreicherung von *in vitro* kultivierten Fischzellen mit EPA und DHA, und mit Hilfe eines geeigneten Bioreaktors, wäre es zukünftig möglich, fischspezifische Produkte wie z.B. Fischmehl aus *in vitro* kultivierten Fischzellen herzustellen.

Abstract

Fish contains a variety of essential and semi-essential nutrients. Among these nutrients the highly valuable proteins and the abundantly contained omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are of primary interest. Due to the problems arising from overfishing, the increased demand of fish destined for human consumption is progressively covered by aquaculture production. The feeds used in aquaculture industry are composed of fish specific ingredients such as fishmeal, which is mostly derived from pelagic fish. Thus, the usage of fishmeal in aquaculture contributes to the pressure on fish stocks already threatened by extinction.

In this thesis, the amino acid composition and the fatty acid composition of *in vitro* cultured and freeze dried fish cells were analyzed. The analysis of the amino acid composition of skin derived cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) showed a nutritionally well balanced composition of essential amino acids and a relatively high content of total protein. The fatty acid analysis of these cells elucidated a significant amount of DHA, which could not be detected in the growth medium. The reduction of the cultivation temperature by 10 °C led to a significant increase of the long-chain highly unsaturated fatty acids arachidonic acid (AA) and DHA in the cells. In a further experiment 130 µM of α-linolenic acid (ALA) were added to the culture medium. This modification resulted in a significant increase of ALA and EPA in the cells. However, the content of DHA remained unchanged. A homologous increase of EPA and DHA in the cells could be achieved by the combination of ALA supply and temperature reduction.

The effects on the fatty acid metabolism caused by changing the culture conditions were also supposed to be investigated in a cell culture from Atlantic sturgeon larvae (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*). In relation to the effects seen in rainbow trout cells, the ones observed in sturgeon cells tended to be qualitatively the same. Therefore, it could clearly be demonstrated that skin derived cells from rainbow trout as well as larval cells from Atlantic sturgeon are capable of metabolizing short-chain polyunsaturated fatty acids into long-chain highly unsaturated fatty acids. However, the direct comparison showed that the observed effects were much more pronounced in sturgeon cells. Beyond that, an obvious, partly significant effect on the total fat content

could be observed. Apart the effects seen in rainbow trout cells, the reduction of the cultivation temperature by 10 °C caused an increase of the total fat content in sturgeon cells. Furthermore, a significant effect on the relative cellular lipid peroxidation was observed, indicating the possibility of antioxidant mechanisms in these cells.

A passage-dependent increase in proliferation was observed in both fish cell cultures, accompanied by a simultaneously increase in the number of mitotic cells. With respect to an industrially relevant biomass production of adherent cells, experiments demonstrated that cells could be seeded on different types of three dimensional surfaces. Within this context it was shown that spherical glass beads could be used to mobilize the adherent growing cells. The glass beads covered with cells were pipetted on gauze nets. Cells which migrated from the glass beads could be cultured on gauze nets as growth surface. These glass beads could repeatedly be transferred on fresh gauze up to ten times. During these inoculations the cells were pipetted instead of treatment with proteolytic enzymes.

Growth of adherent growing fish cells was evaluated in two different commercially available bioreactor systems for biomass production purposes. Since neither in the BioLevigatorTM nor in the Z®RP *breeder* a satisfactory cell expansion could be observed, a completely novel concept of cultivation was developed and operated in laboratory scale. The gauze surfaces mentioned above were inoculated with cells, transferred into a reactor chamber equipped with a spray nozzle and cultivated within a mist of cell culture medium. This novel concept of cultivation enabled the propagation of fish as well as mammalian cells, which in some cases resulted in higher cell densities as compared to the submerged controls.

Both the possibility of cell cultivation within a mist of culture medium and the feasibility of recurring gauze inoculations could lead to completely different reactor designs that may allow continuous cultivation of cells and may contribute to a cost-efficient production of adherent cells. As the results of this thesis showed possibilities of an increasing accumulation of metabolically produced EPA and DHA in fish cells, a fish specific product explained here by taking the example of fish meal, could be produced in a bioreactor in the future.

1. Einleitung

1.1 Fisch als Lebensmittel

Fisch ist eines der kostbarsten Lebensmittel unserer Erde. Die verschiedenen essentiellen Nährstoffe wie Proteine, Fette, Vitamine, Mineralstoffe und Mikronährstoffe machen Fisch unter ernährungsphysiologischen Gesichtspunkten zu einem wichtigen Bestandteil einer ausgewogenen Ernährung. Zudem ist Fisch ein besonders nährhaftes Lebensmittel, denn eine Mahlzeit bestehend aus 150 g Fisch deckt 50 – 60 % des empfohlenen Tagesproteinbedarfs eines Erwachsenen [Uhe *et al.* 1992, FAO 2012]. Global betrachtet ernährt der gegenwärtig verfügbare Fisch mehr als 1,25 Milliarden Menschen – in 21 Ländern ist er die primäre Quelle für Nahrungsproteine [FAOstat].

1.2 Omega-3 Fettsäuren

Neben den oben genannten, als essentiell einzuordnenden Nährstoffen, ist Fisch besonders reich an sogenannten Omega-3 Fettsäuren, die einen weitreichenden gesundheitlichen Mehrwert besitzen. Bereits 1956 sensibilisierte der britische Physiologe Hugh Sinclair in seinem „*Letter to the Lancet*“ für das vermehrte Auftreten von Erkrankungen in zivilisierten Gesellschaften aufgrund einer defizitären Aufnahme langkettiger und hochgradig ungesättigter Fettsäuren (*long-chain polyunsaturated fatty acids*, LC-PUFAs) [Sinclair 1956]. In diesem Zusammenhang wurden beispielsweise die koronare Herzerkrankung (KHK), Diabetes mellitus und Krebserkrankungen als die typischen zivilisationsbedingten Krankheiten aufgeführt [Burkitt 1973]. Auf der Suche nach einem kausalen Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Prävalenz dieser Erkrankungen untersuchten dänische Forscher das Blut der Grönland-Inuit. Die Besonderheit dieser Bevölkerungsgruppe lag darin, dass sie sich fast ausschließlich von tierischer Nahrung ernährten und – wenn überhaupt – vergleichsweise selten zivilisationsbedingte Erkrankungen aufwiesen. Sie fanden heraus, dass ihr Blut im Vergleich zu der dänischen Kontrollgruppe eine deutlich höhere Konzentration an Omega-3 LC-PUFAs aufwies [Bang *et al.* 1971, 1980]. Seit diesem Zeitpunkt beschäf-

tigen sich verschiedenste wissenschaftliche Disziplinen mit der Aufklärung des Einflusses von Omega-3 Fettsäuren auf die Gesundheit des Menschen. Dabei konnten Eicosapentaensäure (*eicosapentaenoic acid*, EPA) und Docosahexaensäure (*docosahexaenoic acid*, DHA) als die biologisch aktiven Omega-3 LC-PUFAs identifiziert werden (Abb. 1). Zwar ist der Mensch in der Lage, die pflanzliche und essentielle Omega-3 Fettsäure α -Linolensäure (*α -linolenic acid*, ALA) zu EPA und DHA zu metabolisieren (Abb. 2), Studien mit radioaktiv markierter ALA zeigten jedoch, dass die Synthesekapazität neben geschlechtsspezifischen Unterschieden im Allgemeinen eher limitiert ist [Burdge 2006]. Außerdem konnten individuelle genetische Variationen der beteiligten Desaturasen, sogenannte Nukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) beobachtet werden, woraus eine zusätzlich reduzierte endogene Enzymaktivität resultiert [Glaser *et al.* 2010]. Abgesehen von diesen interindividuellen Limitierungen, beeinflussen die Art und der Umfang der durch die Nahrung aufgenommenen Omega-6 Fettsäuren die endogene Synthesekapazität zusätzlich.

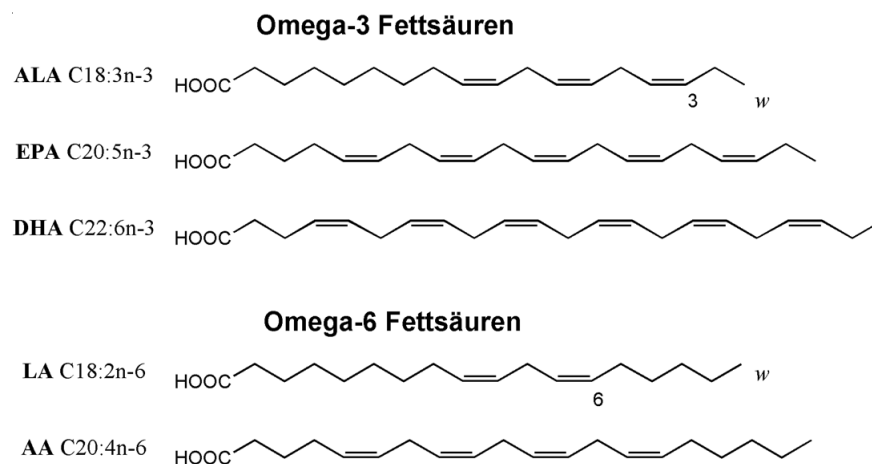


Abb. 1 | Chemische Strukturen mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Fettsäuren sind zumeist unverzweigte Monocarbonsäuren, die sich in ihrer Kohlenstoffkettenlänge voneinander unterscheiden. Das Vorhandensein olefinischer *cis*-konfigurierter Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen (Doppelbindungen) unterscheidet die ungesättigten von den gesättigten Fettsäuren. Unter den ungesättigten Fettsäuren wird das Kohlenstoffatom des Methylendes als ω -Kohlenstoff (ω) definiert. Die Anzahl der Kohlenstoffe ausgehend von diesem ω -Kohlenstoff bis zu der ersten Doppelbindung unterscheidet die Omega-3 von den Omega-6 Fettsäuren, wodurch deren physiologischer Charakter determiniert wird.

In Vertebraten ist die Ursprungsfettsäure aller Omega-3 Fettsäuren C18:3n-3 (ALA), C18:2n-6 (LA) die der Omega-6 Fettsäuren. Durch enzymatische Metabolisierung entstehen aus ihnen die biologisch aktiven Omega-3 bzw. Omega-6 Fettsäuren C20:5n-3 (EPA) und C22:6n-3 (DHA) bzw. C20:4n-6 (AA); siehe dazu Abb. 2.

AA: Arachidonsäure, ALA: α -Linolensäure, DHA: Docosahexaensäure, EPA: Eicosapentaensäure, LA: Linolsäure

1. Einleitung

Die pflanzliche und essentielle Omega-6 Fettsäure Linolsäure (*linoleic acid*, LA) sowie die daraus abgeleiteten Fettsäuren konkurrieren aufgrund identischer Stoffwechselwege um die aktiven Zentren der beteiligten Enzyme (Abb. 2). Seit Beginn der

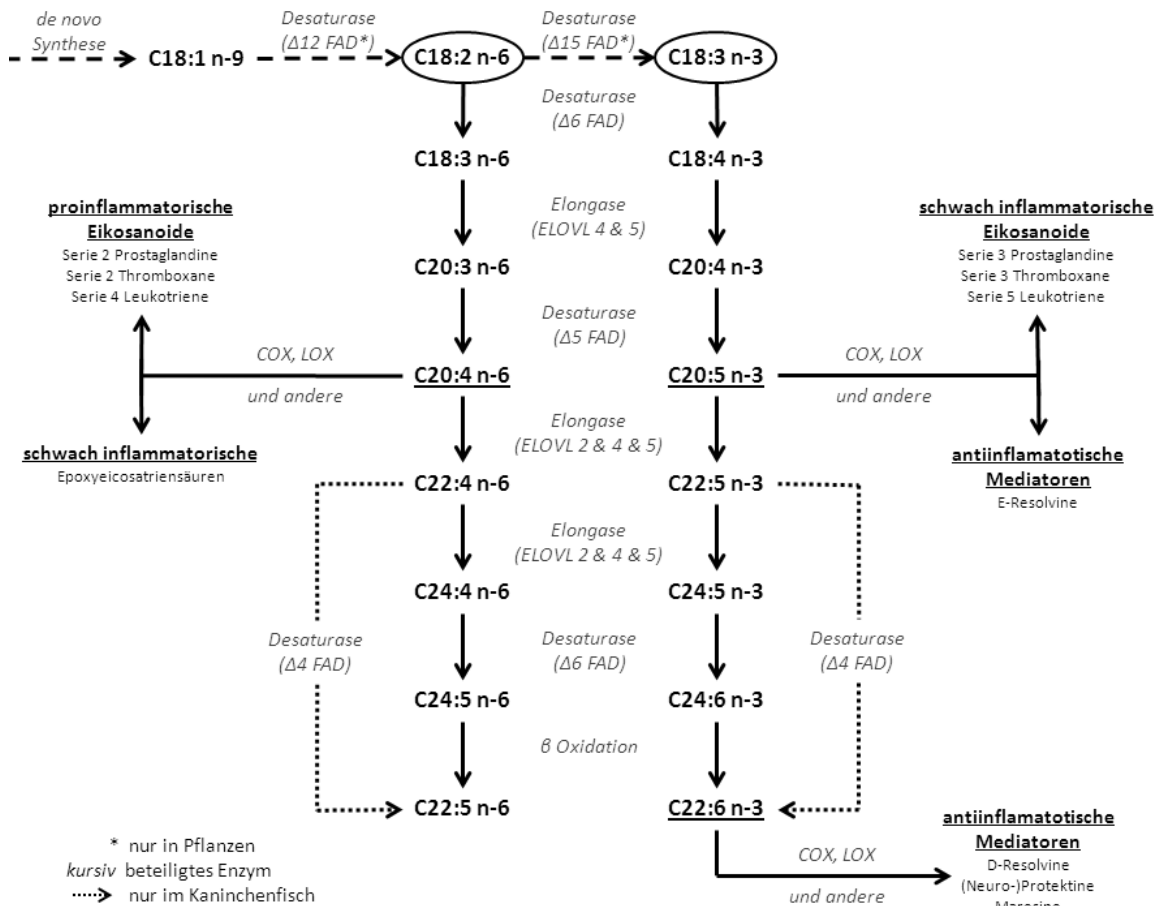


Abb. 2 | Metabolische Stoffwechselwege ungesättigter Fettsäuren in Vertebraten.

Das Zwischenprodukt der pflanzlichen *de novo* Synthese (gestrichelte Pfeile) ist Ölsäure (C18:1n-9), die unter Beteiligung der Delta-12 Desaturase vorerst zur essentiellen Omega-6 Fettsäure Linolsäure (C18:2n-6) und anschließend durch die Delta-15 Desaturase zur ebenfalls essentiellen Omega-3 Fettsäure α-Linolensäure (C18:3n-3) umgesetzt wird. Diese beiden essentiellen Fettsäuren müssen über die Nahrung aufgenommen und sequenziell (Pfeile) durch Desaturasen, Elongasen bzw. abschließende β-Oxidation zu den biologisch aktiven LC-PUFAs Arachidonsäure (C20:4n-6), Eicosapentaensäure (C20:5n-3) und Docosahexaensäure (C22:6n-3) (unterstrichen) metabolisiert werden. Sie sind die Substrate verschiedener Enzyme wie z.B. Lipoxigenasen (LOX) und Cyclooxygenasen (COX) wodurch die jeweiligen hormonähnlichen Eikosanoide, Resolvine, Protectine und Maresine gebildet werden. Der Stoffwechselweg der Delta-4 Desaturase (gepunktete Pfeile) ist bisher nur für den Kaninchenfisch (*Siganus canaliculatus*) bestätigt worden. Nicht gezeigt ist der in einigen marinen Fischarten aufgeklärte alternative Stoffwechselweg über die Delta-8 Desaturase^a. Das Schema wurde angepasst und erweitert nach [Schmitz und Ecker 2008, Monroig et al. 2011, Carlson et al. 2013].

COX: Cyclooxygenase, ELOVL: Fettsäure-Elongase, FAD: Fettsäure-Desaturase, LC-PUFAs: langkettig und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, LOX: Lipoxigenase, ^a siehe dafür [Park et al. 2009, Monroig et al. 2011]

Urbanisierung und der gleichzeitig stattfindenden landwirtschaftlichen Revolution vor etwa 300 Jahren, veränderte sich nicht nur die Verfügbarkeit von Lebensmitteln, sondern auch das Nahrungsverhalten zivilisierter Gesellschaften. Das Verhältnis zwischen Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren, welches bis dahin in etwa gleich verteilt war, veränderte sich eindrucksvoll [Simopoulos und DeMeester 2009]. Vermutlich aufgrund eines deutlich gestiegenen Fleischkonsums der westlichen Bevölkerung, werden mittlerweile bis zu 25-mal mehr Omega-6 Fettsäuren über die Nahrung aufgenommen [Simopoulos 2011], wodurch es höchstwahrscheinlich zu einer deutlich ausgeprägten Konkurrenz im Verlauf des Fettsäuremetabolismus kommt. Durch die limitierte endogene Synthesekapazität und untereinander konkurrierende Stoffwechselwege führt eine chronisch erhöhte Aufnahme von Omega-6 Fettsäuren vermutlich zu einem ernährungsbedingten relativen Mangel an den biologisch aktiven Omega-3 LC-PUFAs EPA und DHA. Um die Auswirkungen dieses relativen Mangels an EPA und DHA besser zu verstehen, werden im Folgenden sowohl der Bedarf an LC-PUFAs, als auch deren entsprechende physiologische Bedeutung dargestellt.

1.2.1 Physiologische Bedeutung von Omega-3 LC-PUFAs

1.2.1.1 Omega-3 LC-PUFAs in der neuronalen Entwicklung

In den Geweben des menschlichen Organismus sind LC-PUFAs weitestgehend gleich verteilt [Tinoco 1982]. Davon ausgenommen ist insbesondere das Gehirn. In den synaptosomalen Membranen neuronaler Gewebe, aber auch in den Zellmembranen der lichtsensitiven Retina, befinden sich – verglichen mit anderen Geweben – besonders hohe Konzentrationen an DHA [Crawford *et al.* 1997, Giusto *et al.* 2000]. Das Gehirn des Menschen wächst und entwickelt sich am schnellsten in den ersten zwei Lebensjahren. Zwischen der 20. Schwangerschaftswoche und dem zweiten Lebensjahr erhöht sich das Hirngewicht um den Faktor 50 [Dobbing und Sands 1973]. Die in Abb. 2 dargestellten Stoffwechselwege sind während der Embryonalentwicklung aller Wahrscheinlichkeit nach unterrepräsentiert, weswegen der sich entwickelnde Fötus auf die externe Versorgung mit DHA angewiesen ist. Im Verlauf der Schwangerschaft und der anschließenden Laktationsphase sollte daher auf eine ausreichende maternale Versorgung mit DHA geachtet werden, denn das Kinderhirn hat in dieser Phase einen besonders hohen Bedarf. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die

Zufuhr von DHA während der Schwangerschaft einen Einfluss auf das Kind hat. Wird in der Schwangerschaft DHA zugeführt, erhöht sich das Geburtsgewicht des Kindes und das Risiko einer Frühgeburt ist um 26 % reduziert [Imhoff-Kunsch *et al.* 2012]. Darüber hinaus zeigten Kinder, deren Mütter während der Schwangerschaft bzw. der Laktation DHA zusätzlich aufnahmen, ein deutlich erhöhtes Konzentrationsvermögen [Jensen *et al.* 2010] und einen höheren verbalen Intelligenzquotienten [Hibbeln *et al.* 2007]. Die Gabe von DHA im Kindesalter zeigte in einigen Studien eine Verbesserung der Lernschwierigkeiten [Richardson 2004] und bei Kindern mit diagnostiziertem Aufmerksamkeitsdefizit- / Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) deutlich verbesserte Verhaltensmuster [Sorgi *et al.* 2007, Milte *et al.* 2012]. Obwohl übereinstimmende Ergebnisse für die maternale Aufnahme von DHA existieren [Makrides *et al.* 2010], wird die spätere zusätzliche Zufuhr von DHA im Kindesalter kontrovers diskutiert. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) empfiehlt wegen ersterem den Schwangeren bzw. stillenden Frauen mindestens 200 mg DHA pro Tag aufzunehmen [DGE].

1.2.1.2 Omega-3 LC-PUFAs im Entzündungsgeschehen

Die in der Abb. 1 dargestellten biologisch aktiven LC-PUFAs Arachidonsäure (*arachidonic acid*, AA), EPA und DHA sind Ausgangspunkte für eine Vielzahl hormonähnlicher Metaboliten mit diversen physiologischen Wirkungen (Abb. 2). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die jeweiligen durch Cyclooxygenasen (COX) bzw. Lipoxigenasen (LOX) gebildeten Mediatoren der Omega-3 bzw. Omega-6 Fettsäuren exakt gegensätzliche Wirkungen haben. Während die von EPA abgeleiteten Mediatoren antiinflammatorisch sind [Calder 2012], zeigen die der AA bis auf eine Ausnahme proinflammatorische Wirkungen [Patterson *et al.* 2012]. Darüber hinaus konnten kürzlich weitere Metabolite, sogenannte spezialisierte resolutionsfördernde Mediatoren (*specialized pro-resolving mediators*, SPMs), aufgeklärt werden, die als Resolvine, Protektine und Maresine näher bestimmt wurden. Diese von EPA bzw. DHA abstammenden SPMs haben einen nachhaltigen antiinflammatorischen Effekt, indem sie die Beendigung von Entzündungsreaktionen einleiten. Die zu den SPMs gehörenden Protektine werden in neuronalen Geweben aus DHA gebildet und zeigten dort antioxidative und dadurch neuroprotektive Eigenschaften [Bannenberg und Serhan 2010, Calder 2012].

1.2.2 Omega-3 LC-PUFAs als therapeutische Substanzen

1.2.2.1 Erkrankungen entzündlicher Pathogenese

Eine Vielzahl der oben beschriebenen Mediatoren ist im Entzündungsgeschehen involviert. Im Allgemeinen sind Entzündungsreaktionen wichtige physiologische Prozesse, die allerdings auch häufige Begleiter einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen sein können. Lang andauernde Entzündungsprozesse führen zu einem erhöhten Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) welche wiederum entzündliche Prozesse fördern, die betroffenen Gewebe dadurch schädigen und letztlich zur Entwicklung entzündungsbedingter chronischer Erkrankungen beitragen [Simopoulos und DeMeester 2009, Nicholson *et al.* 2013]. Durch den relativen Mangel an EPA und DHA überwiegen die proinflammatorischen Mediatoren der Omega-6 Fettsäuren, wodurch entzündliche Prozesse beeinflusst werden [Calder 2006]. Angesichts dieses nahrungsbedingten relativen Mangels entstand der therapeutische Ansatz einer zusätzlichen Gabe von EPA und DHA. In experimentellen Studien wurde die Bioverfügbarkeit von formulierten Fischölen untersucht. Dabei demonstrierten Marsen *et al.* eine dosisabhängige gastrointestinale Aufnahme von EPA und DHA aus verschiedenen Fischölkapseln [Marsen *et al.* 1992]. Nach erfolgreicher Aufnahme verteilen sich diese Fettsäuren zeitabhängig in diversen Geweben [Katan *et al.* 1997]. Der therapeutische Nutzen einer fischreichen Ernährung bzw. nahrungsergänzender Fischöle wurde bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen untersucht. Ein robuster und evidenter Nutzen konnte bei der rheumatoiden Arthritis gezeigt werden [Goldberg und Katz 2007, Calder 2008]. Weitere Studien weisen auf einen vermutlichen Nutzen bei Asthma und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) [Giudetti und Cagnazzo 2012], Psoriasis [Upaganlawar und Badole 2013], Dermatitis [Gueck *et al.* 2004] und weiteren entzündlichen Erkrankungen hin [Calder 2006]. Unklar bleibt allerdings der Nutzen bei entzündlichen Darmerkrankungen [Cabré *et al.* 2012].

1.2.2.2 Das metabolische Syndrom

Neben den klassischen entzündungsbedingten Erkrankungen wurde der Nutzen zusätzlich aufgenommener Omega-3 LC-PUFAs auch bei multifaktoriellen Erkrankungen untersucht. Eine der bedeutendsten Erkrankungen in diesem Zusammenhang ist das

metabolische Syndrom, welches durch die Risikofaktoren Hypertriglyceridämie, arterieller Hypertonie, abdomineller Adipositas und Diabetes mellitus gekennzeichnet ist [Aktories *et al.* 2009]. Diese Risikofaktoren begünstigen die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen und erhöhen dadurch das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen, in Deutschland die häufigste Todesursache [WHO].

Die derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnisse geben vielversprechende Hinweise auf einen Nutzen durch zum Teil hochdosierte EPA- und DHA-Gaben bei den ersten drei Risikofaktoren [Eslick *et al.* 2009, Cabo *et al.* 2012, Campbell und Bello 2012]. Dabei ist die Senkung der Plasmatriglyceride scheinbar effektiver als vergleichbare Therapien mit Statinen oder Fibraten [Nicholson *et al.* 2013]. In Bezug auf Diabetes ist die Studienlage divergent. Da jedoch sowohl Adipositas, als auch entzündliche Prozesse als Risikofaktoren für einen Typ 2 Diabetes identifiziert wurden, welche positiv durch Omega-3 LC-PUFAs beeinflusst werden, vermuten Jafari *et al.*, dass sich dadurch ein indirekter positiver Effekt ergeben könnte [Jafari *et al.* 2013]. Weiterhin profitierten Patienten, die bereits arteriosklerotische Gefäßveränderungen aufwiesen, von einer Zufuhr hochdosierter Omega-3 LC-PUFAs [Erkkila *et al.* 2004, Cawood *et al.* 2010].

Der enorme Bedarf an wirksamen und gleichzeitig gut verträglichen Therapeutika zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen führte dazu, dass mittlerweile knapp 4000 Studien, Metaanalysen und Übersichtsarbeiten zu den Omega-3 LC-PUFAs veröffentlicht worden sind. Delgado-Lista *et al.* (2012) fassten die Datenlage zusammen und schlussfolgerten, dass die zusätzliche Gabe von Omega-3 Fettsäuren für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen einen teilweise sogar sehr deutlichen und lebensverlängernden Nutzen zeigt. Die bedeutendsten klinischen Erfolge einer zusätzlicher Gebe von EPA und DHA [GISSI P 1999, Eslick *et al.* 2009] führten zu der Entwicklung von Arzneimitteln mit hochkonzentrierten Omega-3 Fettsäureethylestern OMACOR®, Abbott und ZODIN®, Trommsdorff, welche für die Therapien endogener Hypertriglyceridämien und zur Sekundärinfarktprophylaxe zugelassen sind. Wegen einer moderaten Verlängerung der Blutungszeit, muss bei gleichzeitiger Einnahme von Antikoagulantien die Prothrombinzeit überwacht und deren Dosierung gegebenenfalls angepasst werden. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen werden häufig Übelkeit und Dyspepsie beschrieben [RoteListe].

1.2.2.3 Weitere therapeutische Ansätze

Maligne Tumoren sind mittlerweile die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [WHO]. Eine erst kürzlich veröffentlichte Übersichtsarbeit konnte feststellen, dass die zusätzliche Gabe von EPA und DHA einen positiven Nutzen bei malignen Tumoren zeigt [Vaughan *et al.* 2013]. Abschließend sei die überwältigende Studienlage zu den klinischen Symptomen der Depression aufgeführt, bei deren Entwicklung nach den aktuellen Erkenntnissen eine entzündliche Komponente beteiligt ist [Howren *et al.* 2009]. In einer 2011 publizierten Metaanalyse konnten die bis dahin gesammelten Erkenntnisse bestätigt und darüber hinaus festgestellt werden, dass EPA therapeutisch wirksamer ist als DHA [Sublette *et al.* 2011]. Ein präventiver bzw. protektiver Nutzen von einzelnen Fettsäuren ist derzeit zwar unbekannt, dennoch weisen die zum Teil überzeugenden Behandlungserfolge mannigfaltiger Krankheitsbilder auf eine chronisch defizitäre Aufnahme dieser Patienten hin.

1.2.3 Vorkommen natürlicher Omega-3 Fettsäuren

Der Ursprung von EPA und DHA liegt in unseren Meeren, weshalb sie auch als marine Omega-3 Fettsäuren bzw. marine LC-PUFAs bezeichnet werden. Einige Algen, wie z.B. marine Mikroalgen, sind als primäre Produzenten exklusiv in der Lage EPA und DHA *de novo* zu synthetisieren [Guschina und Harwood 2006a]. Als Grundlage der Nahrungskette sind sie verantwortlich für die Verbreitung von EPA und DHA innerhalb der trophischen Ebenen, weshalb Fische und alle anderen als Meeresfrüchte bezeichneten Naturprodukte die einzigen global verfügbaren Lebensmittel darstellen, die EPA und DHA in signifikanten Mengen enthalten. Der Vollständigkeit halber sei hier angefügt, dass im Gegensatz zu Algen die *de novo* Synthese terrestrischer Pflanzen auf LA bzw. ALA limitiert ist.

1.2.4 Omega-3 Fettsäuren im Fisch

Die vom Fisch während der Verdauung aufgenommenen Fettsäuren finden sich in den Geweben wieder und sind das primäre Substrat metabolischer Energie [Tocher 2003]. Der als β -Oxidation bezeichnete katabolische Abbau von Fettsäuren liefert dabei etwa achtmal mehr Energie als die vergleichbare Metabolisierung von Glykogen [Flatt 1995]. Neben der primären Energiequelle sind Fettsäuren auch im Fisch die Ausgangspunkte für die Bildung von hormonähnlichen Metaboliten und haben zudem

eine herausragende Funktion bei der Adaption an veränderte Temperaturbedingungen. Im Gegensatz zu Säugetieren, die ihre Körpertemperatur stoffwechselabhängig konstant halten, wird die der meisten Fische durch die Temperatur der Umgebung bestimmt, sie sind poikilotherm (wechselwarm) [Heldmaier und Neuweiler 2012]. Die Veränderung der Umgebungstemperatur z.B. durch jahreszeitliche Schwankungen, gilt daher als wichtigster Umweltstressor poikilothermer Organismen [Guschina und Harwood 2006b].

Die biologischen Membranen sind in Form einer Lipiddoppelschicht organisiert, welche aus Cholesterol, Phospho- und Glykolipiden aufgebaut ist. Physikochemisch befindet sich diese Membran in einem Zustand hoher Unordnung, welcher gemeinhin als *fluide* bezeichnet wird. Integrale und membranassoziierte Proteine bewegen sich energiearm in lateraler Richtung, ungeladene lipophile Verbindungen können durch die Membran diffundieren [Yeagle 1989]. Dieser physiologische Zustand der Membran ist temperaturabhängig. Reduziert sich die Umgebungstemperatur, wird der Festpunkt einiger Fettsäuren innerhalb der Membran erreicht. In diesem als Phasenseparation bezeichneten Prozess entstehen punktuell gelartige Bereiche, die die freie laterale Beweglichkeit behindern. Bei weiterer Reduktion der Temperatur verlässt die Membran den ungeordneten flüssig-kristallinen Zustand und erreicht den geordneten Gelzustand; die Membran ist *rigide* [Hazel 1995]. Unter diesen Bedingungen ist die Integrität der Membran gestört, was zum Verlust ihrer biologischen Funktionen führen kann, wodurch das Überleben der Zelle gefährdet ist. Um dieses zu verhindern, können poikilotherme Organismen wie z.B. Fische die Fettsäuren der biologischen Membranen temperaturabhängig metabolisch verändern und erhalten dadurch deren physiologische Funktionalität bei einer reduzierten Umgebungstemperatur [Henderson und Tocher 1987, Snyder *et al.* 2012]. Durch die Erhöhung des Anteils ungesättigter Fettsäuren steigt die Fluidität der Membran an, ein Prozess, der als *homeoviscous adaptation* (HVA) bezeichnet wird [Hazel 1995]. Unter den Fischen zeichnen sich besonders die Kaltwasserfische durch einen besonders hohen Anteil an EPA und DHA aus. Als Beispiel seien hier einige Thunfischarten (*Thunnus*) aufgeführt, deren besonders hoher Anteil an DHA im Fleisch untypisch für ihr Nahrungsspektrum ist [Tocher 2003].

Fische, die EPA und DHA in hohen Mengen enthalten, werden prinzipiell in zwei Gruppen unterteilt. Der Kabeljau (*Gadus morhua*) ist ein typischer Vertreter der Gruppe der mageren Fische, denn er speichert den überwiegenden Teil seiner marinen

LC-PUFAs in der Leber. Der als Lebertran bekannte ölige Leberextrakt enthält neben den fettlöslichen Vitaminen in hohen Konzentrationen die Fettsäuren EPA und DHA [Haagsma *et al.* 1982]. Dem gegenüber speichern die fetten Fische wie z.B. Hering (*Clupea harengus*), Makrele (*Scromber scrombus*) und Lachs (*Salmo salar*) EPA und DHA vorwiegend in der Muskulatur. Der Gesamtfettanteil einiger fatter Fische kann den des Proteinanteils deutlich übersteigen [Tocher 2003], weshalb sie sich besonders als Lebensmittel mit gesundheitlichem Mehrwert eignen. In einer vergleichenden Studie konnte gezeigt werden, dass der Verzehr fatter Fische – nicht jedoch der mageren Fische – das Risiko koronarer Herzerkrankungen reduziert [Oomen *et al.* 2000].

1.3 Marine Fischbestände

Der überwiegende Teil der natürlichen Fischbestände befindet sich in unseren Meeren, die lange als unerschöpfliche Quelle für Nahrung galten [Naylor und Burke 2005]. Aufgrund der steigenden Nachfrage einer rasant anwachsenden und zunehmend gesundheitsbewussteren Bevölkerung, intensivierten die industriellen Fischfangflotten kontinuierlich ihre Fangaktivitäten. In Folge dessen wurden seit der Registrierung der Fangmengen durch die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) im Jahr 1950 zwei zentrale Trends beobachtet:

- Die aufgesuchten Fischfangregionen verlagerten sich zunehmend weg von den küstennahen hin zu entfernten ozeanischen Gebieten wodurch sich in der Konsequenz das Spektrum der gefangenen Arten von vorher Flachwasserfischen hin zu tief im Ozean lebenden Arten verschob [Pauly *et al.* 2003, Myers und Worm 2003].
- In allen befischten Regionen, besonders jedoch in der nördlichen Hemisphäre, wurde ein Rückgang der durchschnittlichen trophischen Ebene aller gefangenen Arten beobachtet, ein von Pauly *et al.* in diesem Zusammenhang als „*fishing down marine food webs*“ definierter Effekt [Pauly *et al.* 1998].

In der Summe erreichte der gestiegene Fischfang jedoch nicht die benötigte Menge an Fisch, um mit dem rasanten Wachstum der Erdbevölkerung Schritt zu halten [Tacon und Metian 2009]. Betrachtet man die weltweit gefangene Menge an Fisch der letzten 50 Jahre, so ist zu erkennen, dass bereits 1994 ein Maximum an Fisch gefangen wurde (Abb. 3). Trotz zunehmender Fangbemühungen reduzierte sich die Fangmenge seit diesem Zeitpunkt um durchschnittlich 6,5 % [FAOstat]. Genauere Berechnungen und Korrekturen der Fangmengen ergaben, dass sich dieser Verlauf bereits sechs Jahre zuvor abzeichnete [Watson und Pauly 2001]. Diese Entwicklungen deuten darauf hin, dass die natürlichen Fischbestände der Meere dem gestiegenen Fischereidruck nicht gewachsen waren. Laut aktuellen Schätzungen der FAO sind rund 90 % der marinen Fischbestände bis zum ökologischen Limit befischt, bzw. durch Überfischung bedroht [FAO 2012]. Unter der Voraussetzung gleichbleibender Fischereiaktivitäten prognostizierten renommierte Meeresökologen einen Untergang aller marinen Fischbestände im Jahr 2048 [Worm *et al.* 2006]. Die Fischbestände unserer Ozeane müssen daher als begrenzte und mittlerweile bedrohte natürliche Ressource angesehen werden.

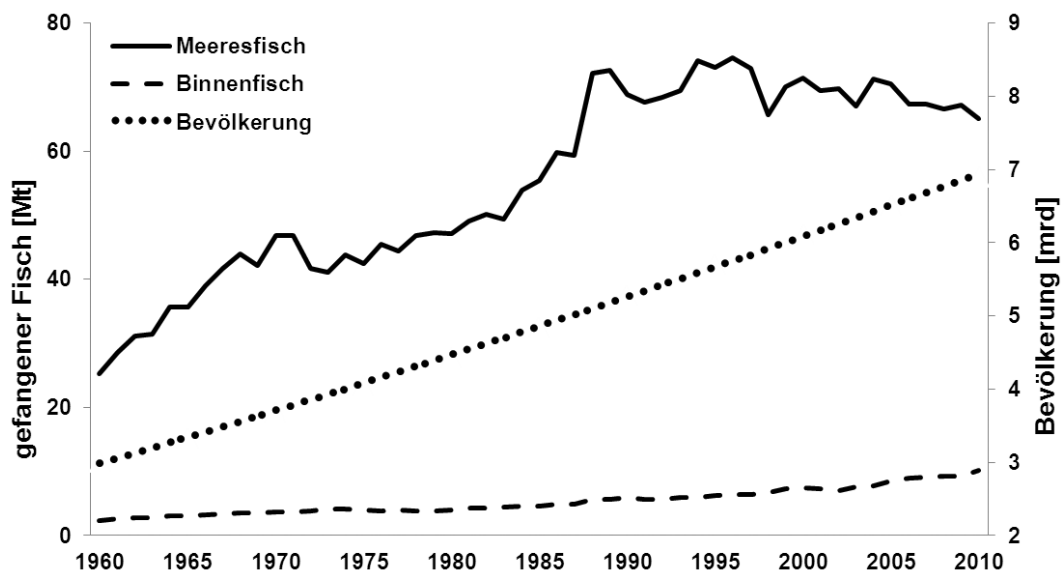


Abb. 3 | Bevölkerungswachstum im Verhältnis zur gefangenen Menge an Fisch. In den vergangenen 50 Jahren ist die Erdbevölkerung kontinuierlich von 3 auf 7 Milliarden angewachsen (gepunktete Linie). In dem gleichen Zeitraum stieg die gefangene Menge an Fischen aus Binnengewässern von 2,5 auf 10 Megatonnen (gestrichelte Linie), die der marinen Fische hatte 1994 mit 75 Megatonnen ihren Höhepunkt und ist seit dem um durchschnittlich 6,5 % gesunken. Derzeit befindet sich die gefangene Menge an Meeresfisch rund 10 Megatonnen unterhalb der Marke von 1994 (durchgezogene Linie) [FAOstat].

1.4 Aquakultur

Die Aquakultur ist der vielversprechendste Lösungsansatz um einerseits den rasant steigenden Bedarf an Fisch einer nach wie vor wachsenden Bevölkerung zu decken und andererseits die ohnehin schon knappen natürlichen Fischbestände zu entlasten [Naylor *et al.* 1998, Pauly *et al.* 2005]. In Anlehnung an die Agrikultur (Ackerbau) befasst sich die Aquakultur mit der Aufzucht von aquatischen Organismen wie Algen, Fischen und Schalentieren im Sinne einer landwirtschaftlichen Lebensmittelproduktion. Da der Anteil der produzierten Algen und Schalentiere eine untergeordnete Rolle spielt, wird in dieser Arbeit der Begriff Aquakultur synonym für die Aufzucht von Fischen verwendet.

Mit einem durchschnittlichen Wachstum von etwa 8 % ist die Aquakultur seit Jahrzehnten der am stärksten wachsende Zweig der lebensmittelproduzierenden Industrie [FAOstat]. Gegenwärtig wird jeder zweite Fisch, der für die Ernährung des Menschen bestimmt ist, in der Aquakultur produziert [Naylor *et al.* 2009]. Bei der Fischproduktion wird ein Zuchtfutter benötigt, welches in gewissen Grenzen den ernährungsphysiologischen Anforderungen der Zuchtspezies entspricht. Dabei wird durch die sich intensivierenden Produktionsbedingungen ein zunehmendes Augenmerk auf die Futterzusammensetzung gelegt. Bei der als intensiv bezeichneten Aquakultur wird das Zuchtfutter entsprechend den nährwertbezogenen Erfordernissen der Zuchtspezies möglichst ideal formuliert [Naylor *et al.* 2000]. Um ein optimales Wachstum der Fische zu erreichen, werden dem Futter traditionell große Anteile an Fischmehl und Fischöl beigefügt. Fischmehl enthält eine komplexe Zusammensetzung vieler essentieller und bioaktiver Nährstoffe [Hardy 2010], weshalb es als Wachstumsbeschleuniger auch bei der Aufzucht von omnivoren und herbivoren Fischen eingesetzt wird [Olsen und Hasan 2012]. Die Aufzucht karnivorer Arten hingegen benötigt zum Teil große Mengen an Fischmehl und Fischöl [Pratoomyot *et al.* 2010], da sie als Raubtiere einen physiologischen Bedarf an Nahrungsbestandteilen haben, die vom Fisch abgeleitet sind [Naylor *et al.* 2009]. Wegen ihres nachweislichen gesundheitlichen Mehrwerts bevorzugen vor allem die europäischen Konsumenten fette Raubfische wie z.B. Salmoniden, deren Fleisch einen besonders hohen Gehalt an EPA und DHA aufweist [Naylor *et al.* 2009, Turchini *et al.* 2009]. Das dafür verfütterte Fischmehl war für die Aquakultur noch bis 2005 die günstigste verfügbare Proteinquelle [Hardy 2010]. Seit dem hat

sich, wie auch in der Abb. 4 b zu erkennen ist, der Marktpreis von Fischmehl, wie auch für Fischöl mehr als verdoppelt. Zwei Hauptgründe können dafür in Betracht gezogen werden: Einerseits sind die marinen Fischfänge seit 1994 rückläufig [FAOstat] und andererseits werden Fische, die ursprünglich zu Fischmehl verarbeitet wurden, zunehmend für die Ernährung verwendet [Tacon und Metian 2009].

Für die Gewinnung von Fischmehl und Fischöl werden aktuell rund 16,5 Megatonnen Fisch aus Wildfängen und rund 5,5 Megatonnen aus Abfällen der fischverarbeitenden Industrie verarbeitet. Daraus können etwa 5 Megatonnen Fischmehl und etwa 1 Megatonne Fischöl gewonnen werden (Abb. 4 a) [Jackson 2012]. Den größten Bedarf hat mittlerweile die Aquakulturindustrie: Sie verbraucht etwa 80 % bzw. 60 % des verfügbaren Fischmehls und Fischöls [Jackson 2009a]. In der Aquakultur von Raubfischen erreicht das *fish-in / fish-out* Verhältnis Werte um 5 kg [Naylor *et al.* 2009], was bedeutet, dass rund 5 kg Fisch verfüttert werden müssen, um ein Kilogramm Zuchtfisch zu produzieren. Zwar belegen genauere Berechnungen, dass das wahre *fish-in / fish-out* Verhältnis deutlich geringer ist [Jackson 2009b], dennoch stellt sich unter Berücksichtigung rückläufiger Fischbestände die Frage, ob sich die Produktion dieser Nahrungsfische weiterhin steigern lässt. Darüber hinaus ist es unter ethischen Gesichtspunkten fraglich, ob Fisch der menschlichen Ernährung vorenthalten werden darf, um ihn in der Aquakultur zu verfüttern.

1.4.1 Alternativen zum Fischmehl

Die begrenzten Fischressourcen einerseits und der enorme Bedarf an Fischmehl durch die Aquakulturindustrie andererseits, führte dazu, dass der Preis für Fischmehl, wie in Abb. 4 b dargestellt, in den vergangenen 10 Jahren um 350 % gestiegen ist [FAO, OilWorld, Indexmundi]. Eine kosteneffektive Produktion von Fisch wird unter diesen Umständen deutlich erschwert. Mit dem Ziel, diesen Kostendruck zu senken aber auch um eine ressourcenschonendere Fischproduktion zu erreichen, wurden alternative Proteinquellen entwickelt.

Für pflanzliche Proteinalternativen liegen bislang die besten Erfahrungswerte vor [Olsen und Hasan 2012]. Der Vorteil pflanzlicher Mehle und Proteinkonzentrate besteht darin, dass die dafür verwendeten Rohstoffe vergleichsweise günstig, nachwachsend und regional verfügbar sind. Allerdings enthalten sie relativ geringe Mengen an Proteinen pro Biomasse und die Aminosäurezusammensetzung deckt nicht

zwingend den Bedarf der Fische. Die für Fische essentiellen Aminosäuren Lysin und Methionin sind in den Mehlen terrestrischer Pflanzen – wenn überhaupt – nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten [Ayadi *et al.* 2012]. Zudem sind diese Mehle reich

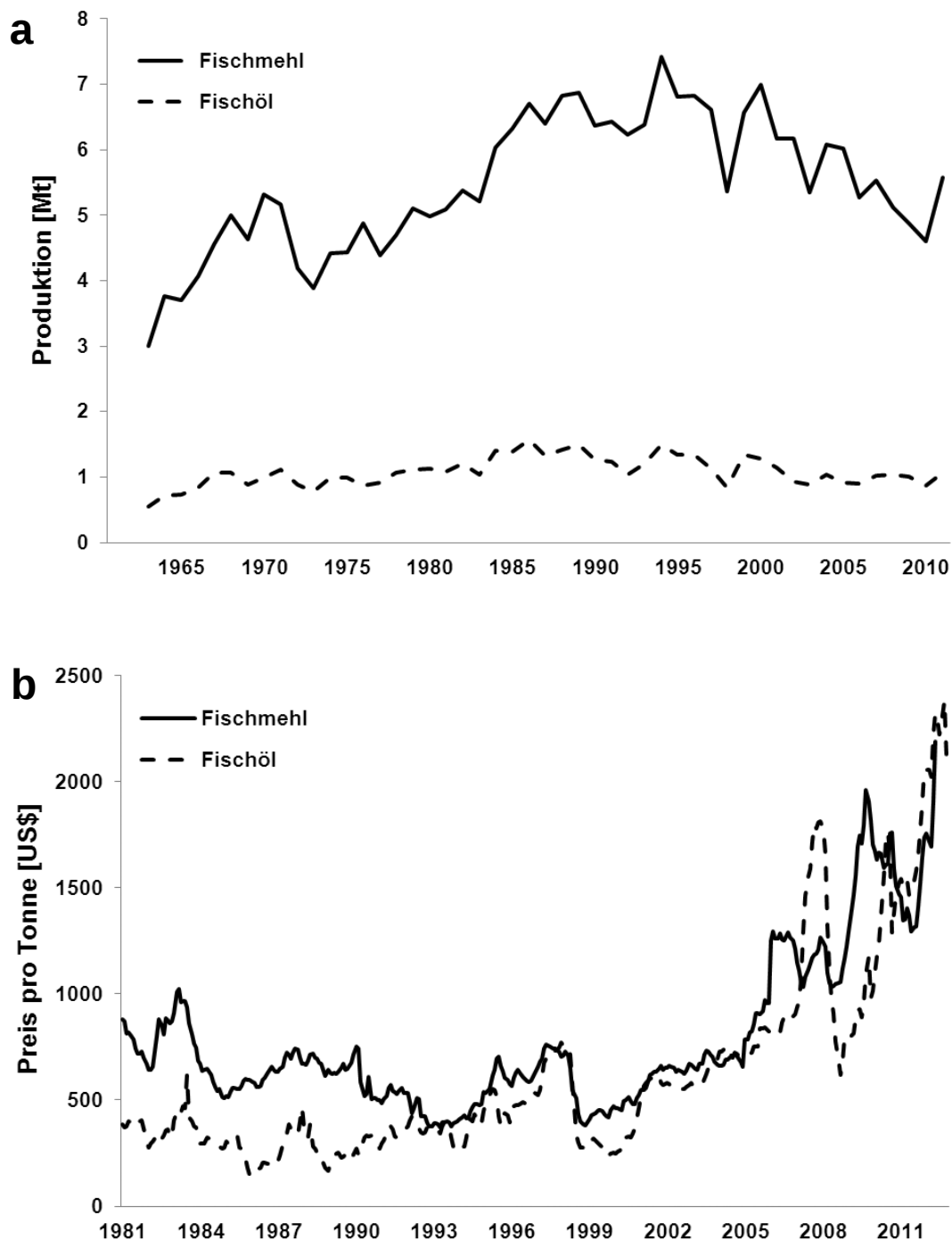


Abb. 4 | Marktdaten von Fischmehl und Fischöl. Die produzierte Menge an Fischöl ist zwischen 1960 und 2011 mit etwa einer Megatonne (Mt) pro Jahr relativ konstant, wohingegen die des Fischmehls bis 1994 anstieg und seitdem sinkt [a, IFFO]. Der Marktpreis von Fischmehl und –öl hat sich seit 1999 in etwa versiebenfacht und beträgt derzeit 2.100 US\$ bzw. 2.300 US\$ je Tonne (b, zusammengestellt aus FAO, OilWorld, Indexmundi]

an schlechtverdaulichen komplexen Kohlenhydraten, die die Aufnahme anderer Nährstoffe behindern und dadurch das Wachstum verzögern können. Darüber hinaus enthalten sie eine Reihe verschiedener Substanzen, deren biologische Aktivität derzeit unzureichend erforscht bzw. unbekannt ist. Im Gegensatz dazu sind die derzeit ebenfalls noch unbekannten biologisch aktiven Substanzen im Fischmehl wahrscheinlich nicht in den pflanzlichen Alternativen zu erwarten [Gatlin *et al.* 2007]. Ferner ist zu beachten, dass die benötigten Ackerflächen vermutlich in Konkurrenz zu Flächen für den Anbau von Pflanzen stehen, die für die Gewinnung von Biokraftstoffen bzw. Lebensmitteln benötigt werden.

Als weitere mögliche Alternativen werden tierische Fleisch-, Knochen- und Blutmehle, Plankton- und Krillmehle sowie Mehle aus Algen, Bakterien und Hefen diskutiert [Gatlin *et al.* 2007]. Auch diese Mehle haben möglicherweise physiologische Limitierungen, weshalb es gegenwärtig keine ideale Fischmehlalternative gibt.

1.4.2 Alternativen zum Fischöl

Der Kostendruck beim Fischöl ist größer als beim Fischmehl, denn der Preis stieg in den letzten 10 Jahren um 450 % an (Abb. 4 b) [FAO, OilWorld, Indexmundi]. Vergleichbar zum Fischmehl sind auch beim Fischöl die pflanzlichen Öle relativ gut erforscht und als Alternativen in der Aquakultur bereits im Einsatz. Neben den bereits oben genannten Vorteilen pflanzlicher Alternativen ist die Gefahr enthaltener toxischer Substanzen wie z.B. Schwermetalle und polychlorierte Biphenyle (PCBs) bei pflanzlichen Ölen geringer als bei Fischölen. Wie auch in den pflanzlichen Proteinalternativen sind in den Ölen ebenfalls bioaktive Substanzen enthalten, deren Einfluss auf den Fisch im speziellen und das aquatische Ökosystem im globalen, unbekannt ist. Da pflanzliche Öle, bis auf wenige Ausnahmen, reich an Omega-6 Fettsäuren sind, ergeben sich unter Umständen zusätzliche negative Effekte auf die Fischgesundheit. Wie bereits genannt sind terrestrische Pflanzen nicht in der Lage, EPA und DHA zu synthetisieren, sie fehlen in pflanzlichen Ölen gänzlich [Miller *et al.* 2008, Turchini *et al.* 2009]. Da die karnivoren Fische jedoch eine schlechte endogene Metabolisierungskapazität haben, müssen EPA und DHA während der Aufzucht in der Aquakultur über das Futter zugeführt werden [Sargent *et al.* 2002]. Durch den Einsatz pflanzlicher Öle verändern sich die Fettsäurezusammensetzung und die organoleptischen Eigenschaften des Fischfleisches [Turchini *et al.* 2009]. Neben den Ölen terrestrischer Pflanzen

sind Algenöle eine aussichtsreiche Fischölalternative. Der entscheidende Vorteil dabei ist, dass einige Algenarten besonders reich an EPA oder DHA sind, wodurch dieser Nachteil terrestrischer Pflanzen ausgeglichen werden kann. Diese Algen lassen sich gegenwärtig in 1.500 l Bioreaktoren kultivieren [Hakim 2012]. Andere tierische Fette wie z.B. Geflügelöle und marine Fette, wie z.B. Muschel-, Krill- und Krebstieröle werden als weitere Alternativen diskutiert [Miller *et al.* 2008, Turchini *et al.* 2009]. Darüber hinaus erlauben molekularbiologische Methoden die genetische Veränderung von verschiedenen terrestrischen Nutzpflanzen, wodurch die Metabolisierung von EPA bzw. DHA in ihnen gelingt [Nichols *et al.* 2010]. In den USA wurde bereits 1989 das erste gentechnisch veränderte Tier geschaffen, welches für die menschliche Ernährung gezüchtet werden sollte. Dieser transgene Lachs (AquAdvantage Salmon®, *AquaBounty Technologies*) zeigt eine verdoppelte Wachstumsgeschwindigkeit und befindet sich gegenwärtig kurz vor der Zulassung [Ledford 2013]. Im europäischen Raum besteht allerdings eine vergleichsweise hohe Skepsis der Konsumenten gegenüber gentechnisch veränderter Organismen bzw. Lebensmittel [Turchini *et al.* 2009].

1.5 Proliferative *in vitro* Fischzellkulturen

Die ersten Fischzellkulturen, deren Zellen mit Hilfe proteolytischer Enzyme aus Geweben isoliert und *in vitro* kultiviert werden konnten, wurden vor etwas mehr als 50 Jahren beschrieben [Wolf *et al.* 1960]. Diese damals innovative Methode, mit der aus einer Vielzahl von verschiedensten Geweben niederer Vertebraten Zellkulturen erhalten werden konnten, stellt den Ursprung heutiger *in vitro* Fischzellkulturen dar. Bereits zwei Jahre später konnte die erste stabile Langzeit-Fischzellkultur charakterisiert werden, die innerhalb von 21 Monaten 48-mal subkultiviert werden konnte [Wolf und Quimby 1962]. Seit diesem Zeitpunkt sind viele weitere Fischzellkulturen unterschiedlicher Gewebearten sowohl von Süßwasserarten, als auch Salzwasserarten hergestellt worden, wobei der Anteil der Süßwasserarten mengenmäßig überwiegt [Wolf und Mann 1980, Fryer und Lannan 1994, Lakra *et al.* 2011].

Im Grunde genommen repräsentieren primäre Zellkulturen in gewissen Grenzen die Eigenschaften des Ursprungsgewebes bzw. -organismus [Ghioni *et al.* 1997b, Schirmer 2006]. Obwohl sich die gewebsspezifischen Eigenschaften im Verlauf der *in vitro*

Kultivierung verändern [Ghioni *et al.* 1997b, Rapoport *et al.* 2009], müssten grundlegende physiologische Prozesse, wie z.B. die HVA erhalten bleiben [Ghioni *et al.* 1997b]. Die Besonderheit von *in vitro* kultivierten Fischzellen liegt also in den außergewöhnlichen Eigenschaften der Fische selbst. Im Gegensatz zu vielen anderen Vertebraten zeigen die meisten Fische Zeit ihres Lebens ein relativ konstantes Wachstum [Mommsen 2001] und haben ein herausragendes funktionales Regenerationspotential vieler Gewebe [Nakatani *et al.* 2007, Kawakami 2010]. Allein durch diese Eigenschaften sind Fische höchstwahrscheinlich eine ausgezeichnete Quelle für hochproliferative Zellkulturen. Darüber hinaus haben sie als poikilotherme Zellkulturen weitaus geringere Ansprüche an die äußeren Zellkulturbedingungen. Als Beispiel sei hier das breite Spektrum der Kultivierungstemperatur von 22 °C bis 6 °C aufgeführt. Fischzellkulturen werden typischerweise im Bereich der Raumtemperatur (22 °C) kultiviert, wodurch spezielle Inkubatoren entfallen [Wolf und Mann 1980]. Ebenfalls kann die Kultivierungstemperatur so weit reduziert werden, dass Fischzellkulturen bis zum Zeitpunkt ihrer Verwendung in einem Kühlschrank (6 °C) aufbewahrt werden können [Brennan *et al.* 2012].

1.5.1 Anwendungspotentiale von *in vitro* Fischzellkulturen

Heutzutage werden Fischzellkulturen in der Grundlagenforschung als *in vitro* Modelle eingesetzt um Tierversuche zu reduzieren [Ghioni *et al.* 1997b, Bols *et al.* 2005, Schirmer 2006]. Dabei werden sie für die Beantwortung von zellulären [Hong *et al.* 2011], metabolischen [Viegas *et al.* 2012, Weil *et al.* 2013], ökotoxikologischen [Lee *et al.* 2009, Rakers 2012b] und genotoxikologischen Fragestellungen [Ryan *et al.* 2008] herangezogen und finden zusätzlich eine mögliche Verwendung als pharmakologisches [Grunow *et al.* 2011b], metabolisches [Gregory *et al.* 2011] und toxikologisches [Brennan *et al.* 2012] Testsystem. Eine weitere Anwendung ist die industrielle Herstellung von fischspezifischen Impfstoffen, die in der Fischzucht benötigt werden [Villena 2003, Chen *et al.* 2005, Sommerset *et al.* 2005]. Im Allgemeinen werden im marinen Ökosystem eine Vielzahl unbekannter bioaktiver Strukturen und Substanzen vermutet [Swathi *et al.* 2012]. Auch Fischzellen enthalten eine Reihe wertvoller Stoffwechselprodukte wie z.B. posttranslational modifizierte Proteine, *antifreeze* Proteine und Hormone [Bols 1991], die allerdings damals wie heute nicht zu einer industriellen Verwendung von Fischzellkulturen führten.

1.5.2 Kultivierungstechniken

Ungeachtet dessen, welche denkbar möglichen Anwendungsgebiete sich aus einer Fischzellkultur ergeben, ist es von grundlegender Bedeutung, einen Kultivierungsprozess zu finden, welcher die benötigte Zellmenge bereitstellt. Wie der Großteil aller Säugetierzellkulturen, wachsen auch die meisten Fischzellkulturen in Abhängigkeit von einer Wachstumsoberfläche, sie sind adhärent [Fent 2001]. Von dem überwiegenden Teil adhärent wachsender Zellkulturen werden hydrophilisierte und sterilisierte zweidimensionale Einweg-Kunststoffoberflächen in Form von Multiwellplatten, Petrischalen und Zellkulturflaschen (Abb. 5 a – c) als Oberfläche akzeptiert. Große Zellkulturflaschen bieten dabei eine Wachstumsoberfläche von bis zu 300 cm² wodurch abhängig von dem Zelltyp zwischen 5×10^4 und 2×10^5 Zellen je cm² kultiviert werden können.

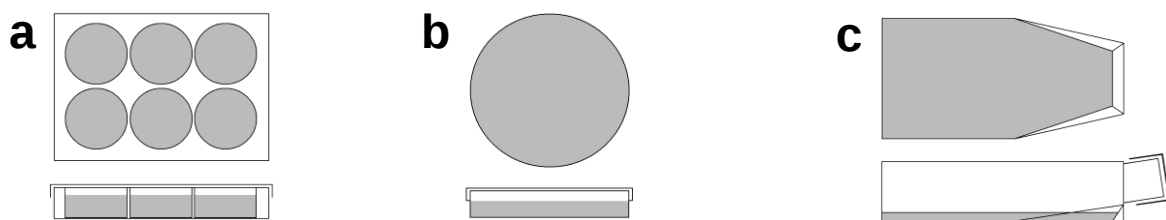


Abb. 5 | Standard-Zellkulturmaterialien in Auf- bzw. Seitenansicht. In der adhärenen Zellkultur werden Einweg-Kunststoffgefäße aus Polystyrol verwendet, die mittels Plasmabehandlung hydrophilisiert wurden. Darunter sind unterschiedliche Formen erhältlich, am gebräuchlichsten sind Multiwellplatten (a), Petrischalen (b) und Zellkulturflaschen (c) bei denen die jeweilige Grundfläche für die *in vitro* Kultivierung adhären wachsender Zellen geeignet ist. Die darauf kultivierten Zellen werden mit Nährmedium (grau) überschichtet.

1.5.2.1 Zellkultur scale-up

Zusätzlich zu den großen Zellkulturflaschen stehen weitere kommerziell erhältliche Kultivierungsgefäße zur Verfügung, die bei größeren Zellkulturansätzen eingesetzt werden. In der Abb. 6 a – c sind beispielhaft Zellkultursysteme mit relativ großen Oberflächen abgebildet. Am häufigsten werden rotierende Flaschen mit bis zu 1.700 cm² eingesetzt [Warnock und Al-Rubeai 2006]. Vergleichbare Oberflächen werden auch von Stapelbodenflaschen mit gaspermeablen Kunststoffen erreicht. Darüber hinaus existieren verschiedene Wannenstapelböden mit und ohne externe Begasung mit einer Oberfläche von bis zu 24.000 cm² z.B. Cell Factory, NUNC. Eine Hochdurchsatz-Produktion mit diesen zweidimensionalen Materialien wird durch Erhöhung

der Anzahl dieser Kultivierungsgefäße möglich, wodurch der Material-, Inkubations- und Arbeitsaufwand sowie die Kultivierungskosten allerdings ansteigen. Die entscheidenden Nachteile dieser Materialien liegen jedoch darin, dass die Zellen während der Kultivierung weder mikroskopiert noch überwacht werden können. Besonders die inneren Kultivierungsbedingungen wie z.B. Glucose- und Sauerstoffgehalt im Nährmedium sind wichtige Parameter bei der Kultivierung von großen Zellkulturansätzen [Zweigert 2009].

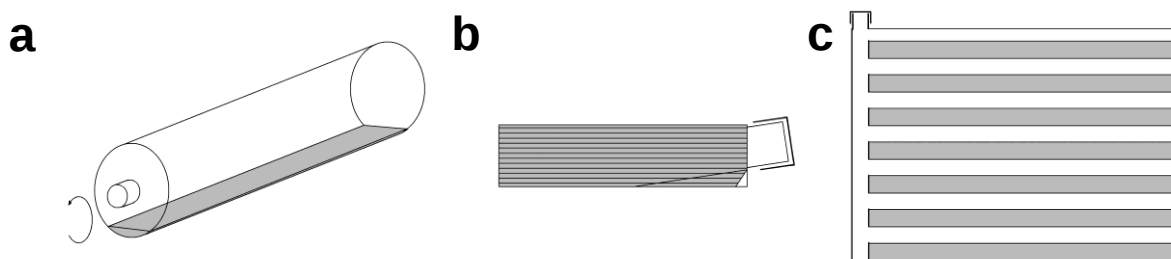


Abb. 6 | Zellkulturgefäße mit großen Oberflächen. Die *in vitro* Kultivierung großer Mengen adhärent wachsender Zellen benötigt große Wachstumsflächen. Rotierende Flaschen (a) bzw. Stapelbodenflaschen (b) bieten bis zu 1.700 cm² Oberfläche und damit knapp sechsmal mehr Oberfläche als große Zellkulturflaschen. Deutlich größere Oberflächen können durch Wannenstapelböden (c) erreicht werden. In der Variante mit 40 Stapelböden werden 24.000 cm² erreicht. Die in den Abbildungen grau gekennzeichneten Bereiche entsprechen dem jeweiligen Zellkulturmedium.

1.5.2.2 Kultivierung in Bioreaktoren

Um tierische Zellen unter ökonomischen Gesichtspunkten in industriellem Maßstab kultivieren zu können, wurden geregelte Kultivierungsprozesse entwickelt. In sogenannten Bioreaktoren, deren Kultivierungsvolumen weit größer als 500 l sein kann, werden etwa 50 % aller biotechnologischen Produkte wie Zellen für therapeutische Ansätze, zelluläre Diagnostika und Glykoproteine hergestellt [Eibl *et al.* 2009].

Insgesamt ergeben sich neben der Vergrößerung möglicher Zellkulturoberflächen weitere Vorteile einer Kultivierung großer Zellmengen in Bioreaktoren. (1) Die Möglichkeit einer kontinuierlichen Erneuerung des Nährmediums kann besonders bei großen Kultivierungsansätzen zu einer deutlichen Reduktion des Material- und Arbeitsaufwands im Vergleich zu einer Flaschenkultur führen. (2) Der technisch kontrollierte und geregelte Kultivierungsprozess im quasi nach außen hin abgeschlossenen Bioreaktor lässt sich exakt auf die Bedürfnisse der jeweiligen Zellkultur abstimmen und bietet dabei vermutlich eine höhere Produktsicherheit, da Kontaminationen z.B. durch

Bakterien minimiert werden können. (3) Durch die lückenlose *on-line* Überwachung von Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffkonzentration sowie die Möglichkeit einer Probenentnahme und der Messung weiterer *at-line* Parameter wie z.B. die Ammonium-, Glucose- und Laktatkonzentrationen kann der Zustand der Kultivierung bestimmt und der Kultivierungsprozess überwacht und optimiert werden. (4) Der Kultivierungsprozess kann nach den Anforderungen der *good manufacturing practice* (GMP) zertifiziert werden, wodurch das Produkt für die klinische Anwendung zugänglich wird. (5) Viele der eingesetzten Materialien sind mehrfach verwendbar und verbessern unter Umständen das Umweltmanagement und reduzieren die laufenden Kultivierungs- bzw. Produktionskosten.

Bei einer *in vitro* Kultivierung im Bioreaktor ist entweder das von den Zellen an das umgebene Medium abgegebene Stoffwechselprodukt oder die Zellbiomasse an sich das gewünschte Kultivierungsprodukt. Für letzteres wird ein besonderes Augenmerk auf die Proliferation gelegt. Dabei ist die zur Verfügung stehende Oberfläche die limitierende Komponente [Pörtner und Giese 2006, Yang und Basu 2012]. Idealerweise wächst die benötigte Oberfläche proportional mit der Zellpopulation. Da kontinuierlich wachsende Oberflächen in der *in vitro* Zellkultur nicht existieren, stellen Kugeln als Wachstumsoberflächen einen Kompromiss dar. Im Vergleich zu anderen geometrischen Formen hat die Kugel ein ideales Verhältnis zwischen der Oberfläche und dem korrespondierenden Volumen [Warnock und Al-Rubeai 2006]. Je kleiner der mittlere Durchmesser ist, desto größer wird die Gesamtoberfläche aller Kugeln.

- **Microcarrier**

Mit dem Ziel adhärent wachsende Zellen in suspendierter Form zu kultivieren, besiedelte van Wezel erstmals sphärische bzw. kugelige Strukturen mit unterschiedlichen Zelltypen [van Wezel 1967]. Der Begriff *microcarrier* lässt sich auf diese Versuche zurückführen und ist heute ein feststehender Terminus in der Biotechnologie. Kommerziell verfügbare *microcarrier* haben einen Durchmesser von 90 µm bis 330 µm und bestehen aus Dextran oder Polystyren. Darüber hinaus stehen poröse Materialien aus z.B. Gelatine, Kollagen und Cellulose zur Verfügung, die auch im Inneren von Zellen besiedelt werden können [Warnock und Al-Rubeai 2006]. Durch diese *macroporous microcarrier* kann eine maximale Zellzahl je *microcarrier* erreicht werden [Yang und Basu 2012]. *Microcarrier* sind die vielversprechendste Herangehensweise, Biomasse

von adhären wachsenden Zellkulturen zu produzieren. Die auf dem *microcarrier* fixierten Zellen können in Rührkesselreaktoren (Abb. 7 a) vergleichbar mit Bakterien- oder Hefezellkulturen, kultiviert werden. Der Vorteil dieser Reaktoren liegt in ihrer vergleichsweise einfachen Skalierbarkeit. Mit einem Kultivierungsvolumen von bis zu 6.000 Liter gelten sie als industrieller Standard für adhären Säugetierzellkulturen [Warnock und Al-Rubeai 2006, Eibl *et al.* 2009]. Um die *microcarrier* während der Kultivierung in Suspension zu halten werden zum Teil hohe Rührgeschwindigkeiten benötigt. Der dadurch an der Oberfläche der *microcarrier* verursachte Scherstress kann sich negativ auf das Wachstum der Zellen auswirken [Zweigerdt 2009]. Dieser Nachteil der Rührkesselreaktoren konnte durch die Entwicklung von *airlift* Bioreaktoren reduziert werden (Abb. 7 b). Hierbei wird durch eine kontinuierliche Begasungsströmung eine Zirkulation des Mediums erreicht, die eine schonendere Kultivierung für Zellen darstellen kann. Eine weitere scherstressarme Kultivierung ist in Abb. 7 c dargestellt. Bei diesen *rotating wall vessel* Bioreaktoren rotiert das gesamte Reaktorgefäß um die horizontale Achse, wodurch das Medium bewegt wird und die suspendierten *microcarrier* auf Grund der Erdanziehungskraft in der Schwebe gehalten werden [Zweigerdt 2009].

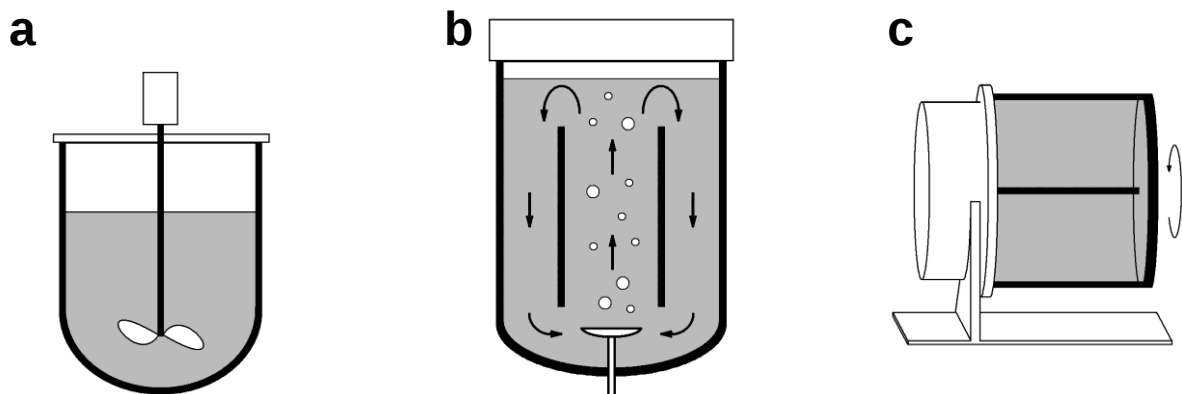


Abb. 7 | Bioreaktoren für Suspensionszellkulturen. Bakterien- und Hefezellkulturen werden in klassischen Rührkesselreaktoren (a) mit einem Volumen von mehr als 100.000 l kultiviert [Eibl *et al.* 2009]. Diese Technologien und Erfahrungen können auf tierische Zellkulturen übertragen werden, wenn diese ebenfalls in Suspension wachsen. Zellen, die jedoch nicht in Suspension wachsen, können auf kugelförmigen Oberflächen (*microcarrier*) fixiert werden und dadurch ebenfalls in Rührkesselreaktoren kultiviert werden. Auch *airlift* Bioreaktoren (b) ermöglichen die Kultivierung suspendierter adhärenter Zellkulturen auf *microcarrier*en. Durch einen kontinuierlichen Begasungsstrom wird eine Durchmischung des Nährmediums (grau) erreicht und gleichfalls die mechanischen Scherkräfte reduziert. In horizontalen *rotating wall vessel* Reaktoren (c) werden die Scherkräfte durch ein horizontal rotierendes Kultivierungsgefäß reduziert, da in Abhängigkeit zur Rotationsgeschwindigkeit die suspendierten Zellkulturen in der Schwebe gehalten werden können.

Nichtsdestotrotz existieren bei Fermentationsprozessen mit *microcarrier* drei grundsätzliche Problemstellungen:

- Durch Kollisionen der *microcarrier* untereinander bzw. mit den eingebauten Hindernissen, wie z.B. Sonden, Rührer oder Gefäßwänden entstehen mechanische Beanspruchungen, welche zum Abrieb der Zellen führen können.
- Im Inneren poröser *microcarrier* kann es zu Engpässen in der Nährstoffversorgung, sowie zur Aufkonzentration von toxischen Stoffwechselendprodukten kommen, welche zum Tod der Zellen führen können.
- *Microcarrier*-übergreifende Zell-Zell-Kontakte können zu Aggregaten mehrerer *microcarrier* führen.

Der beste und gleichfalls komplizierteste Lösungsansatz dieser Problemstellungen ist, die adhärente Zellkultur in eine klassische Suspensionskultur zu überführen [Warnock und Al-Rubeai 2006]. Dieses ist bereits bei einigen wenigen Zellkulturen des Hamsters (BHK und CHO) gelungen [Eibl *et al.* 2009]. Diese Zellkulturen lassen sich vergleichsweise einfach in großskaligen Rührkesselreaktoren kultivieren.

• **Fest-, Flüssig- und Drehbettreaktoren**

Lassen sich die Zellen weder in Suspension noch auf *microcarrier* in suspendierter Form kultivieren, so existieren dafür sogenannte Festbettreaktoren [Zweigerdt 2009]. Hierbei handelt es sich um feststehende überwiegend poröse Keramik-, Glas- oder Kunststoffoberflächen, die in zylindrischen Gehäusen untergebracht sind. Diese Oberflächen lassen sich mit Zellen besiedeln und können kontinuierlich von Medium durchflossen werden, wodurch Scherkräfte minimiert werden (Abb. 8 a). Eine Abwandlung dieser Festbettreaktoren stellen die Flüssigbettreaktoren dar. Die dabei verwendeten Trägermaterialien besitzen eine hohe Dichte und sammeln sich dadurch am Grund des zylindrischen Gehäuses. Das zur Kultivierung verwendete Zellkulturmedium

durchströmt die Kultur entgegen der Schwerkraft und versorgt dabei die Zellen mit Nährstoffen (Abb. 8 b). Eine weitere Art der Festbettreaktoren sind horizontale Drehbettreaktoren z.B. Z®RP *breeder*, *Zellwerk*. Im Gegensatz zu den *rotating wall vessel* Reaktoren befinden sich in Drehbettreaktoren vertikal angeordnete poröse Oberflächen auf der horizontalen Achse, welche mit geringer Geschwindigkeit innerhalb des Reaktorinnenraums rotieren (Abb. 8 c). Dabei strömt das Medium durch die porösen Oberflächen, wobei die Scherkräfte an den Zellen ebenfalls relativ gering sind. Wachsen die Zellen allerdings in hohen Zelldichten, so entstehen bei diesen Reaktoren Probleme der Nährstoffversorgung.

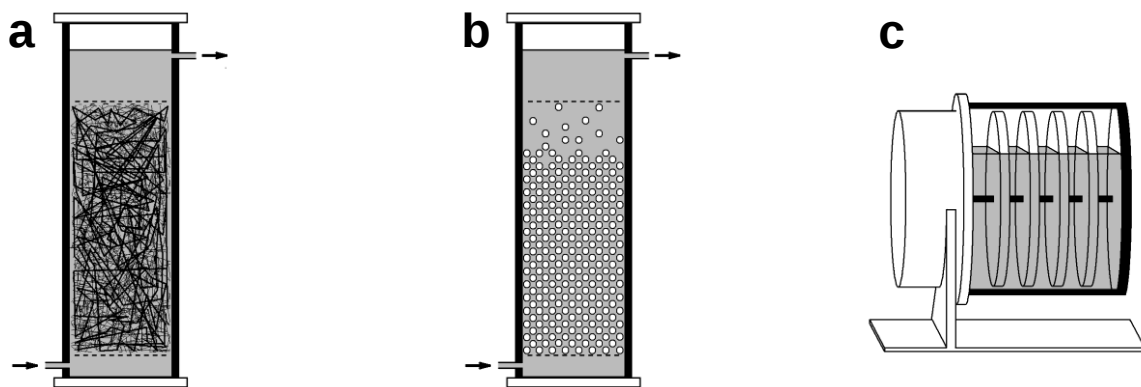


Abb. 8 | Bett-Bioreaktoren. Die festen Zellkulturoberflächen ermöglichen in Bett-Reaktoren eine scherkraftarme Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen. Festbettreaktor (a) bzw. Flüssigbettreaktoren (b) sind mit den festen Oberflächen gefüllt und können mit einem kontinuierlichen Medienstrom (grau) durchflossen werden. Bei Drehbettreaktoren (c) rotieren horizontal angebrachte feste Oberflächen durch den mit Nährmedium (grau) gefüllten Reaktorraum.

- **vaskularisierte Systeme**

Die Diffusionsstrecke von gelöstem Sauerstoff beträgt in artifiziellen Geweben rund 100 µm [Pörtner und Giese 2006]. Aus diesem Grund werden Zellkulturen mit hohen Zelldichten bevorzugt in vaskularisierten Reaktorsystemen kultiviert. Angelehnt an das Gefäßsystem durchzieht eine Vielzahl von Kapillaren den Kultivierungsraum des Bioreaktors, welche die *in vitro* kultivierten Zellen mit Nährstoffen versorgen und gleichzeitig den Abtransport der Stoffwechselendprodukte übernehmen. Im Inneren des in der Abb. 9 dargestellten Hohlfaserbioreaktors befindet sich eine Kultivierungskartusche, die aus mikrofeinen und permeablen Hohlfasern besteht. Diese Hohlfasern wer-

den im Inneren mit Nährmedium durchflossen und versorgen dadurch die zwischen den Hohlfasern kultivierten Zellen. Sie sind so angeordnet, dass selbst in komplexen Zellmultilayern eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet ist.

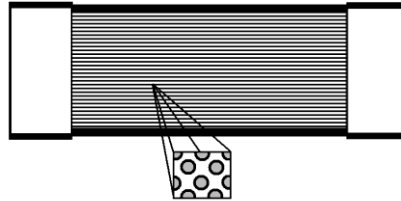


Abb. 9 | Hohlfaserreaktoren. Tausende mikrofeiner hohler Fasern bilden im Inneren des Hohlfaserreaktors eine große besiedelbare Oberfläche. Diese Hohlfasern werden im Inneren mit Nährmedium (grau) durchflossen und versorgen aufgrund ihrer Permeabilität die außen aufliegenden Zellen. In diesen Reaktoren werden besonders hohe Zelldichten erreicht.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Der deutlich gestiegene Anteil überfischter Fischbestände und die perspektivisch betrachtet zunehmende Nachfrage nach Nahrungsfischen bilden die zugrundeliegende Problemstellung dieses Forschungsvorhabens. In der vorliegenden Arbeit sollte sowohl unter biologischen, als auch unter technologischen Gesichtspunkten untersucht werden, ob es prinzipiell möglich ist, den Fischmehlanteil des Fischfutters durch *in vitro* kultivierbare und hochgradig proliferative Langzeit-Fischzellkulturen ganz oder teilweise zu ersetzen. Der Vorteil einer Verwendung von Fischzellen liegt darin, dass sich proliferative Zellen unabhängig vom ökologischen Status natürlicher Fischbestände nahezu unbegrenzt vermehren lassen und in getrockneter Form als fischspezifischer Zusatz dem Zuchtfutter beigefügt werden könnten.

Unter dieser Zielvorgabe sollte zum einen eine Vollhautzellkultur der karnivoren Regenbogenforelle und zum anderen eine larvale Zellkultur des sich omnivor ernährenden Atlantischen Störs untersucht werden. Die bereits in vorherigen Arbeiten zellbiologisch charakterisierten Zellkulturen galt es unter ernährungsphysiologischen Gesichtspunkten qualitativ und quantitativ zu analysieren. Der biologische Teil dieser Arbeit befasste sich daher mit dem Vergleich dieser Analyseergebnisse mit den nähr-

wertbezogenen Eigenschaften des Fischmehls. Dabei sollte untersucht werden, ob die verwendeten Fischzellkulturen den ernährungsphysiologischen Anforderungen eines Futterzusatzes entsprechen und sich die Zellen dahingehend optimieren lassen. Insbesondere den beiden Omega-3 LC-PUFAs EPA und DHA wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine übergeordnete Bedeutung zugesprochen, weswegen ein Kultivierungsprotokoll etabliert werden sollte, mit dem der Anteil an EPA und DHA in den Zellen angereichert werden kann.

In dem daran anschließenden technologisch geprägten Teil dieser Arbeit sollte darüber hinaus untersucht werden, inwieweit es möglich ist, Fischzellen in einen technisch-kontrollierten und automatisierten Kultivierungsprozess zu überführen und darin zu produzieren. Erst durch die Kultivierung von Zellkulturen in einem Bioreaktor wird es möglich sein, die Zellen in einem industriellen Maßstab unter ökonomischen Gesichtspunkten zu kultivieren. Daher sollten unterschiedliche Bioreaktorsysteme mit Fischzellen besiedelt und die Zellvermehrung darin getestet bzw. bewertet werden. Anhand dieser Bewertung sollte ermittelt werden, ob eine mögliche Skalierung des Kultivierungsprozesses in einem bereits bestehenden und kommerziell verfügbaren Bioreaktorsystem vorgenommen werden kann, oder ein eigens dafür entwickeltes Reaktorsystem benötigt wird.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
3D-Oberflächenmikroskop VHX-1000	Keyence, Deutschland
Autoklav VX-95	Systemec, Deutschland
Bioreaktor BioLevigator™	Hamilton, Schweiz
Bioreaktor Infors-HT Multifors® 2	Infors-HT, Schweiz
• Druckluftkompressor DK 50 FS	Ekomp-Air GmbH, Deutschland
• Düse MRS 0.5	MRS, Deutschland
• Gas Analysator	Infors-HT, Schweiz
• Gas-Trockenrohr 26930	WA Hammond Drierite Co, LTD
• Kugelnickgelenk	Rauch, Deutschland
• OD-Sonde TruCell 2	Finesse Solutions, USA
• pH-Sonde 405-DPAS-SC-K8S	Mettler Toledo, Schweiz
• pO ₂ -Sonde Visiform DO 225	Hamilton, Schweiz
• Umwälzkühler ThermoFlex 1400	Thermo Electron, Deutschland
Bioreaktor Z@RP <i>breeder</i>	Zellwerk, Deutschland
• horizontales Drehbett (Polycarbonat)	Zellwerk, Deutschland
• Sponceram® 160AL-20-00, 160AL-20-130 & 160AL-30-130	Zellwerk, Deutschland
Druckluftkompressor Jun-Air 3-4	Jun-Air, USA

2. Materialien und Methoden

Gerätebezeichnung	Hersteller
Drucktank 5 l 5SBCV4	API, Italien
Düse MRS 0.2 & 0.3 (Anti-Tropf)	MRS, Deutschland
Düse WD 04	Rauch, Österreich
Durchflusszytometer FACSCalibur™ (FACS)	Becton Dickenson (BD), USA
Gefriertrockner VaCo 2-II	Zirbus, Deutschland
Vakuumpumpe Trivac D 2,5 E	Oerlikon, Schweiz
Hochgeschwindigkeitskamera Fastcam SA3	Photron, USA
AF Zoom - Nikkor Lens (24 - 85 mm f / 2.8 – 4 D)	Nikon, Japan
Hohlkegeldüse 123 0.5 mm	Schlick, Deutschland
Inkubationsschüttler GFL 3031	GFL, Deutschland
Inkubator CB150 & KBF 115	Binder, Deutschland
Inkubator Forma Series II Water Jacketed HEPA class 100	Thermo Scientific, USA
Inkubator HERAccl 150i Hypoxie	Thermo Scientific, USA
Kamera AxioCam KC1	Carl Zeiss, Deutschland
Kryobox 5100 Cryo 1 °C	Nalgene, USA
Lasersinter Formiga P110	EOS, Deutschland
Locheisen 30 mm	BGS technic, Deutschland
Mikroplattenleser Infinite® 200 Pro	Tecan, Schweiz
Mikroplattenleser Mithras LB-940	Berthold, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40, cLSM 710 & SteREO Discovery.V20	Carl Zeiss, Deutschland
Neubauer <i>improved</i> -Zählkammer	Laboroptik, UK
NucleoCounter® NC-100™	ChemoMetec, Dänemark

2. Materialien und Methoden

Gerätebezeichnung	Hersteller
Orbitalschüttler 3015	GFL, Deutschland
Pumpe Dispenser Masterflex L/S	Masterflex, USA
Hochdruckschlauch PharMed BPT 15HP	Cole-Parmer, USA
Hochleistungspumpkopf L/S	Masterflex, USA
Sicherheitswerkbank BioWizard SL-170 & SL-200	Kojair, Finnland
Tischzentrifuge <i>mini spin</i> (Rotor F45-12-11)	Eppendorf, Deutschland
Transportbox Laptop Cooler	Nalgene, USA
Trockenluftsterilisator UT-6	Heraeus, Deutschland
Ultraschallbad ElmaSonic S30(H)	Elma, Schweiz
Waage AEJ 120-4M & 572	Kern, Deutschland
Wasserbad WNB 10 & 45	Memmert, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Deutschland

2.1.2 Software

Gerätebezeichnung	Software	Hersteller
3D-CAD-Konstruktionssoftware	SolidWorks 2009	SolidWorks Corp., USA
Bioreaktor Infors-HT	IRIS 5.2	Infors-HT, Schweiz
FACSCalibur™	CellQuest™ Pro 6.0	Becton Dickenson (BD), USA
Hochgeschwindigkeitskamera	PFV 3.2.4	Photron, USA
Labormikroskope	AxioVision 4.8.2	Carl Zeiss, Deutschland
Mikroskop cLSM 710	ZEN 2009	Carl Zeiss, Deutschland
Pumpe Masterflex L/S	WinLIN 3.2	Cole-Parmer, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Feinpolyamid für Lasersinter (PA 2200)	EOS, Deutschland
GEM TM beschichtet mit Gelatine	Hamilton, Schweiz
Gasperlen $\varnothing$ 250 – 500 μ m	Carl Roth, Deutschland
Glaspipetten	Carl Roth, Deutschland
Kryotube	TPP, Schweiz
LeviTube 50 ml	Hamilton, Schweiz
Gasfilter, PTFE in 0,22 μ m	Satorius, Deutschland
Multiwellplatten 6, 12, 24 & 96-Well	TPP, Schweiz
Multiwellplatten 96-Well <i>black / clear TC treated</i>	Becton Dickenson (BD), USA
Netzgewebe Polyamid bzw. Polyethylen 200 μ m	Lechleiter GmbH, Deutschland
NucleoCounter® Zählkassette	ChemoMetec, Dänemark
Pipettenspitzen 10, 100 & 1.000 μ l	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 & 2 ml	Sarstedt, Deutschland
Schlauchverbindungen, Silikon	Carl Roth, Deutschland
Serologische Pipetten Costar 5, 10, 25 & 50 ml	Corning, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter Acrodisc CR 25 mm, PTFE 0,22 μ m	Pall, USA
Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm	Sarstedt, Deutschland
Zellkulturflaschen 25, 75, 150 & 300 cm ²	TPP, Schweiz
Zellkulturpetrischalen 22,1 & 60,1 cm ²	TPP, Schweiz
Zellschaber 24 cm	TPP, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 15 & 50 ml	Sarstedt, Deutschland

2.1.4 Chemikalien und Kits

Chemikalie	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Schweiz
α -Linolensäure $\geq 99\%$ (ALA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
CellQuanti-MTT™ <i>cell viability assay</i>	BioAssay Systems, USA
<i>Cell Viability Solution (7-AAD)</i>	Becton Dickenson (BD), Deutschland
Kollagenase NB 8	Serva, Deutschland
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Deutschland
Diphenyl-1-pyrenylphosphin (DPPP)	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose</i>	Invitrogen, Deutschland
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x</i>	Invitrogen, Deutschland
Essigsäure 99,9 %	Carl Roth, Deutschland
Ethanol, vergällt	Carl Roth, Deutschland
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Österreich
Hämalaunlösung	Carl Roth, Deutschland
Isopropanol 99,5 %	Carl Roth, Deutschland
Kaliziumchlorid Dihydrat (CaCl_2)	Carl Roth, Deutschland
KaryoMAX® Colcemid™ Solution	Invitrogen, Deutschland
Methanol 99%	Carl Roth, Deutschland
NucleoCounter® Puffer A & B	ChemoMetec, Dänemark
OilRedO Pulver	Sigma-Aldrich, Deutschland

2. Materialien und Methoden

Chemikalie	Hersteller
Penicillin- / Streptomycin-Lösung (100x)	PAA, Österreich
Schweinehautgelatine	Fluka, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Deutschland
Trypsin-EDTA (10x)	PAA, Österreich

2.1.5 Medien, Puffer und Arbeitslösungen

DAPI-Arbeitslösung

0,1 % (v / v) DAPI-Stammlösung in
Fixierlösung I

DAPI-Stammlösung

0,1 % (w / v) DAPI in PBS

DMEM 10 % FKS

89 % (v / v) DMEM
10 % (v / v) FKS
100 U / ml Penicillin
0,1 mg / l Streptomycin

DMEM 20 % FKS

79 % (v / v) DMEM
20 % (v / v) FKS
100 U / ml Penicillin
0,1 mg / l Streptomycin

DPPP-Arbeitslösung

0,1 % (v / v) DPPP-Stammlösung in PBS

DPPP-Stammlösung

1,93 % (w / v) DPPP in DMSO

FACS-Puffer

1 % (v / v) FKS in PBS

2. Materialien und Methoden

Fixierlösung I	70 % (v / v) Methanol 30 % (v / v) Aceton
Fixierlösung II	75 % (v / v) Methanol 25 % (v / v) Essigsäure
Formalin-Fixierlösung	27 % (v / v) Formaldehydlösung 73 % (v / v) <i>Aqua bidest.</i>
Gelatinelösung	1 % (w / v) Schweinehautgelatine in <i>Aqua bidest.</i>
60 % Isopropanol	60 % (v / v) Isopropanol in <i>Aqua bidest.</i>
70 % Isopropanol	70 % (v / v) Isopropanol in <i>Aqua bidest.</i>
Kollagenaselösung	0,07 % (w / v) Kollagenase in Kollagenasepuffer
Kollagenasepuffer	0,12 % (w / v) TRIS 0,11 % (w / v) CaCl ₂ 34,23 % (w / v) D(+)-Saccharose in <i>Aqua bidest.</i>
Kryomedium	90 % (v / v) FKS 10 % (v / v) DMSO
MTT-Medium	18,75 % (v / v) CellQuanti-MTT™ Reagenz 81,25 % (v / v) DMEM 10 % FKS
OilRedO-Stammlösung	0,3 % (w / v) OilRedO in Isopropanol
Trypsin-EDTA-Lösung	10 % (v / v) Trypsin-EDTA (10x) 90 % (v / v) PBS (1x)

2.1.6 *In vitro* Zellkulturen

2.1.6.1 Fischzellen

Für die Beantwortung der biologischen Fragestellung wurden zwei unterschiedliche Langzeit-Fischzellkulturen ausgewählt. Die Langzeit-Fischzellkultur der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und des Atlantischen Störs (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) konnten bereits in der Fraunhofer EMB etabliert werden.

- **Langzeit-Fischzellkultur der Regenbogenforelle**

Die Langzeit-Fischzellkultur der Regenbogenforelle wurde aus einem Vollhautexplantat gewonnen und erhielt die Bezeichnung OMYsd1x [Rakers *et al.* 2011, Rakers 2012b]. In dieser Arbeit wurden diese Zellen in Passage 19 dem Kryostock entnommen und bis zur Passage 62 kultiviert. Für die Kultivierung wurde DMEM mit einem Zusatz von 20 % FKS verwendet. Die Inkubationsbedingungen waren 20 °C und 1,9 % CO₂.

- **Langzeit-Fischzellkultur des Atlantischen Störs**

Die Langzeit-Fischzellkultur des Atlantischen Störs wurde aus einer Larve des Störs gewonnen und als AOXlar7 bezeichnet [Grunow *et al.* 2011a]. Die kryokonservierten Zellen wurden in Passage 12 aufgetaut und bis zur Passage 68 mit DMEM 10 % FKS bei 25 °C und 2,1 % CO₂ kultiviert.

2.1.6.2 Säugetierzellen

Für die Kultivierungsversuche des technologischen Teils dieser Arbeit, der sich mit der Entwicklung eines neuartigen Zellkultursystems für adhärente Zellkulturen befasst, wurde eine robuste und gleichzeitig schnell wachsende adhärente Zellkultur benötigt. Da die oben beschriebenen Fischzellkulturen aufgrund ihrer relativ langen Zellverdopplungszeiten für diesen Teil der Arbeit ungeeignet waren, wurde hierfür eine als Z29 bezeichnete Säugetierzellkultur aus dem Pankreas einer Ratte (*Rattus Norvegicus*) verwendet [Kruse *et al.* 2006]. Die Passagenzahlen der Z29 Zellen lagen zwischen 41 und 99. Für die Kultivierung wurde DMEM mit einem Zusatz von 10 % FKS verwendet. Die Inkubationsbedingungen waren 37 °C und 5 % CO₂.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Arbeitshinweise der *in vitro* Zellkultur

Die Arbeitsschritte für die *in vitro* Kultivierung von Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die dabei verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien waren entweder herstellerseitig sterilisiert oder wurden vor der Verwendung bei 121 °C mindestens 15 min autoklaviert bzw. drei Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert. Sensible Flüssigkeiten, bei denen diese Sterilisierungsmethoden nicht möglich waren, wurde eine Sterilfiltration mittels 0,22 µm Spritzenvorsatzfilter durchgeführt.

Die Volumina der Medien und Lösungen, welche in der Zellkultur eingesetzt wurden, waren laborintern standardisiert. Diese Standardvolumina waren abhängig von dem verwendeten Kultivierungsgefäß und sind in der Tab. 1 zusammengefasst. Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte in Zellkulturinkubatoren bei stets konstanter Zusammensetzung der Kultivierungsatmosphäre und gleichfalls konstanter Kultivierungstemperatur (2.1.6). Der flüssige bzw. feste Zellkulturabfall wurde vor der Entsorgung durch Autoklavieren dekontaminiert.

Tab. 1 | Standardvolumina [ml] der eingesetzten Medien und Lösungen in Abhängigkeit vom Kultivierungsgefäß bzw. der Kultivierungsfläche [cm²].

	Zellkulturflaschen				Multiwellplatten				Petrischalen	
	25cm ²	75cm ²	150cm ²	300cm ²	6-Well	12-Well	24-Well	96-Well	22,1cm ²	60,1cm ²
Medium [ml]	5	15	30	60	2,5	1	0,5	0,1	5	15-30
PBS [ml]	2 - 3	5 - 10	10 - 15	20 - 30	1 - 1,5	0,5	0,2	0,1	2 - 3	5 - 10
Trypsin-EDTA-Lsg. [ml]	1	2	4	8	0,5	0,2	0,1	-	1	2
Einfrier-Medium [ml]	0,5	0,75	1	2 x 1	-	-	-	-	-	-

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

2.2.1.2 Anlegen einer Zellkultur aus kryokonservierten Zellen

Alle verwendeten Zellkulturen waren vor ihrer Verwendung Bestandteil der Deutschen Zellbank für Wildtiere „Cryo-Brehm“ der Fraunhofer EMB. Die in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagerten Zellen wurden entnommen, in eine auf -20 °C gekühlte Transportbox überführt, kurz angetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit etwa 5 ml 37 °C warmem Medium (bei OMYsd1x Zellen 20 °C bzw. AOXlar7 Zellen 25 °C) pipettiert. Die entstandene Zellsuspension wurde 5 min bei 150 g (bei Fischzellen 135 g) zentrifugiert, das entstandene Zellpellet entsprechend der Tab. 1 mit frischem Medium aufgenommen und in ein bzw. mehrere Zellkulturgefäße eingesät. Bei den verwendeten Fischzellen war darauf zu achten, dass die Einsaat-Zellzahl nicht viel kleiner als 10.000 Zellen je cm² war.

2.2.1.3 Medienwechsel

24 Stunden nach dem Anlegen der Zellkultur aus dem Kryostock (2.2.1.2) oder nach der Subkultivierung (2.2.1.4) wurde das Nährmedium der Zellkultur gewechselt. Befanden sich nach mikroskopischer Betrachtung viele Zellen in Suspension, so wurde die Zellkulturoberfläche nach dem Absaugen des alten Mediums mit der in Tab. 1 angegebenen Menge Phosphat-Puffer (*phosphate buffered saline*, PBS) gespült und anschließend durch frisches Medium ersetzt. Während der *in vitro* Kultivierung wurde das Zellkulturmedium je nach Zellkultur ein- bis mehrmals die Woche gewechselt.

2.2.1.4 Subkultivierung von Zellen

Waren etwa 90 % bis 95 % der verfügbaren Wachstumsoberfläche durch Zellen besiedelt, wurden die Zellen mit einer proteolytischen Enzym-Lösung abgelöst und auf neue Oberflächen verteilt. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gespült und mit 37 °C warmer Trypsin-EDTA-Lösung von der Wachstums-oberfläche abgelöst. Die jeweiligen Volumina an PBS bzw. Trypsin-EDTA-Lösung entsprachen der Tab. 1. Nach einer 2-minütigen Inkubation im 37 °C Inkubator (bei Fischzellen 1 min) wurde frisches Nährmedium hinzugegeben. Die Menge dieses Nährmediums betrug mindestens das Zweifache Volumen der vorgelegten Trypsin-EDTA-Lösung. Zellen, die sich nach mikroskopischer Beurteilung nicht ausreichend von der Oberfläche ablösen ließen, wurden mit einem Zellkulturschaber von der Wachstums-oberfläche abgekratzt. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Zen-

trifugenröhrchen überführt, wie in 2.2.1.2 beschrieben zentrifugiert, das Pellet mit Nährmedium aufgenommen und neu ausgesät. Dabei betrug der Faktor der Oberflächenvergrößerung bei Fischzellen 1:2 bis 1:3, bei den Z29 Zellen 1:10 bis 1:100.

2.2.1.5 Inokulation der Glasperlen mit Zellen

Für die Inokulation von Netzgeweben wurden Zellen auf Glasperlen gesät, die dann durch Pipettieren mobilisiert werden konnten. Die verwendeten Glasperlen hatten einen mittleren Durchmesser von 375 μm und konnten daher nicht durch die Maschen des Netzgewebes fallen. Bevor die Glasperlen mit Zellen inokuliert wurden, mussten diese sterilisiert werden. Dafür wurden sie mindestens fünf Tage in 70 %igem Isopropanol eingelegt und anschließend in eine feuerfeste Schale pipettiert. Der überschüssige Alkohol wurde abgesaugt und die Alkoholreste durch Entzündung unter der Sicherheitswerkbank kontrolliert abgebrannt. Die so sterilisierten Glasperlen wurden nach dem Abkühlen steril gelagert. Für die Besiedelung mit den Zellen wurden die Glasperlen mit Gelatine beschichtet. 140 mg Glasperlen, das entspricht etwa 2000 Glasperlen mit einer Gesamtoberfläche von 8,96 cm^2 , wurden in ein Well einer 24-Well Multiwellplatte überführt und entsprechend der von Voigt (2010) etablierten Methode mit 300 μl einer 37 °C warmen 1 %igen Gelatinelösung benetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Gelatinelösung vorsichtig abgesaugt, die Glasperlen 45 min unter der Sicherheitswerkbank getrocknet und zuletzt mit 500 μl einer Zellsuspension mit 5×10^5 Zellen inokuliert. Während der Inokulation, welche bei den Z29 Zellen vier Stunden betrug (Fischzellen 24 Stunden), wurden die Zellen im Inkubator unter Standardbedingungen (2.1.6) kultiviert.

2.2.1.6 Inokulation der Netzgewebe mit Zellen

Die Inokulation der Netzgewebe mit Zellen erfolgte mittels besiedelter Glasperlen. Diese Inokulationsmethode wurde gemeinsam mit Hoffmann entwickelt [Hoffmann 2010] und im Verlauf dieser Arbeit kontinuierlich angepasst und optimiert. Die verwendeten Netzgewebe (Abb. 10) wurden mit einem 30 mm Locheisen reproduzierbar ausgestanzt und anschließend autoklaviert (2.2.1.1). Die reale Oberfläche der Netzgewebe, ohne Berücksichtigung der Netzmaschen bzw. Maschenfreiräume, beträgt 13,15 cm^2 [Schulze-Jena 2012]. Je eines dieser kreisrunden Netzgewebe wurde in ein Well einer 6-Well Multiwellplatte gelegt, mit 2 ml Nährmedium überschichtet und ge-

gegebenenfalls vollständig unter die Medienoberfläche gedrückt. Dieses Netzgewebe wurde anschließend mit Zellen besiedelt, indem inokulierte Glasperlen (2.2.1.5) auf die Netze pipettiert wurden. Dafür wurde eine 1.000 µl Pipettenspitze an der Öffnung um mindestens 5 mm gekürzt und die Eintrittsöffnung vergrößert. Mit dieser Pipettenspitze wurden die Glasperlen vorsichtig aus einem 24-Well entnommen und punktiert auf einem Netzgewebe verteilt. Bei der Inokulation der Netzgewebe mit AOXlar7 Zellen wurden, anders als bei den Z29 Zellen, Glasperlen von insgesamt zwei 24-Wells auf je ein Netzgewebe pipettiert. Wichtig dabei war, dass die Glasperlen möglichst schonend und ohne übermäßige mechanische Beanspruchung übertragen wurden, damit die Zellen auf der Oberfläche der Glasperlen nicht beschädigt wurden.

Die optionale Beschichtung der Netzgewebe mit Gelatine erfolgte wie in 2.2.1.5 beschrieben. Dafür wurden 1.000 µl der 1 %igen Gelatinelösung auf das Netzgewebe pipettiert, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend getrocknet. Die mit Gelatine beschichteten Netzgewebe wurden in gleicher Art und Weise inokuliert wie Netzgewebe, die nicht mit Gelatine beschichtet worden waren.

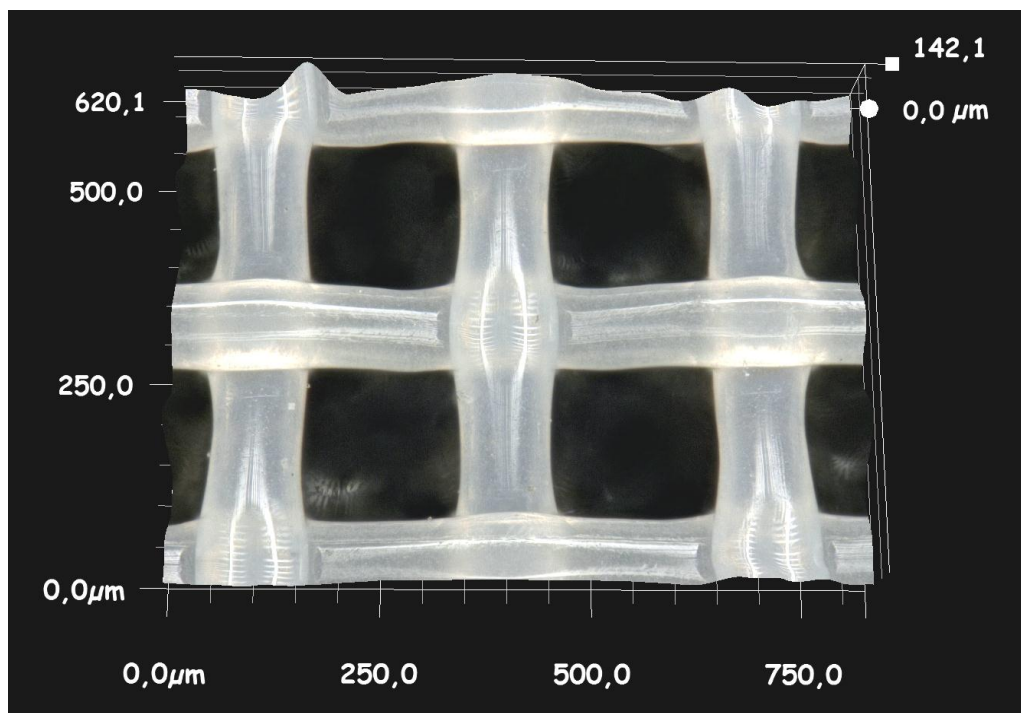


Abb. 10 | 3D-Oberflächenmikroskopische Aufnahme des Polyethylen-Netzgewebes. Die verwendeten Netzgewebe mit einer Maschenweite von 200 µm waren quadratmaschig in Leinwandbindung gewebt und die Kontaktpunkte des etwa 80 µm starken Garns miteinander fixiert. Die Abbildung zeigt das Netzgewebe 400-fach vergrößert.

2.2.1.7 Bestimmung des Abnahmezeitpunktes der Glasperlen

Für die Bestimmung des Abnahmezeitpunktes der Glasperlen wurden Netzgewebe mit Z29 Zellen inokuliert (2.2.1.6) und über einen Gesamtkultivierungszeitraum von sieben Tagen kultiviert. Dabei wurden alle 24 Stunden von einem Teil der Netzgewebe die aufliegenden Glasperlen entfernt. Hierfür wurde ein Netzgewebe aus dem Well der 6-Well Multiwellplatten entnommen, die Zellzahl des Wellbodens bestimmt (2.2.1.9) und das Netzgewebe umgekehrt in einer mit 5 ml Nährmedium gefüllten Petrischale (22,1 cm²) geschwenkt. Glasperlen, die sich dadurch nicht ablösen ließen, wurden vorsichtig mit einem Zellschaber und durch weiteres Schwenken gelöst. Nachdem die Glasperlen restlos entfernt worden waren, wurde die Zellzahl auf den Glasperlen bestimmt (2.2.1.9) und die Kultivierung der Netzgewebe in einem Well der 6-Well Multiwellplatte fortgesetzt. Dementsprechend war der früheste Abnahmezeitpunkt 24 Stunden nachdem die Glasperlen auf das Netzgewebe pipettiert wurden. Dies bedeutete, dass dieses Netzgewebe insgesamt einen Tag mit Glasperlen inokuliert worden war und anschließend sechs Tage ohne Glasperlen kultiviert wurde. Das darauf folgende Netzgewebe wurde zwei Tage mit Glasperlen inokuliert, gefolgt von einer 5-tägigen Kultivierung, usw. Bei der längsten Inokulation wurden die Glasperlen über den gesamten Kultivierungszeitraum von sieben Tagen nicht von den Netzgeweben entfernt. Am Ende dieses Versuches wurden die Glasperlen des letzten Netzgewebes wie oben beschrieben abgenommen und die Zellzahl aller Netzgewebe bestimmt (2.2.1.9). Dabei wurden die Netzgewebe, wie unter 2.2.1.8 beschrieben, behandelt und die Zellzahlen der Zellen bestimmt.

2.2.1.8 Vereinzelung der Zellen auf den Netzgeweben

Durch die mehrtägige Kultivierung der Zellkulturen auf den Netzgeweben entstanden sehr dichte Zellorganisationen bzw. gewebeartige Strukturen. Da die Zellzahl in der Zellkultur üblicherweise anhand von suspendierten Zellen bestimmt wird, wurde von Hoffmann ein Protokoll entwickelt, welches diese gewebeartigen Strukturen effektiv in Einzelzellsuspensionen überführt [Hoffmann 2010]. Hiermit war es möglich, die Anzahl der Zellen auf den Netzgeweben mit den herkömmlichen Zählmethoden zu bestimmen. Dafür wurden die Netzgewebe mit 1 ml einer 37 °C warmer Kollagenase-lösung überschichtet und 90 min bei 37 °C (bei Fischzellen bei Raumtemperatur) und 120 rpm im Inkubationsschüttler geschwenkt. Im Anschluss daran wurde die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt (2.2.1.9).

2.2.1.9 Bestimmung der Zellzahl suspendierter Zellen

Die Zellzahl suspendierter Zellen (2.2.1.4) wurde entweder mit einer Neubauer *improved*-Zählkammer oder dem automatisierten NucleoCounter® bestimmt.

- **Neubauer *improved*-Zählkammer**

Sehr große Zellzahlen mussten vor der eigentlichen Zellzählung aliquotiert und 1:10 bzw. 1:100 mit PBS verdünnt werden. 20 µl dieser Zellsuspension wurden in die Zählkammer pipettiert und die Anzahl der Zellen in vier nicht zusammenhängenden Quadranten [q] gezählt. Die Zellzahl der Ursprungssuspension ergab sich aus:

$$Zellzahl_{Gesamt} = \left(\frac{1}{4} \sum_{i=1}^4 q_i \right) \cdot \text{Verdünnungsfaktor}_{ggf.} \cdot 10^4 \cdot \text{Volumen}_{Zellsuspension}$$

- **NucleoCounter®**

Ein 50 µl Aliquot der Zellsuspension wurde mit 50 µl NucleoCounter® Puffer A versetzt und gut suspendiert, bevor 50 µl NucleoCounter® Puffer B zugegeben wurden. Die während dieser Behandlung freigelegten Zellkerne wurden in eine NucleoCounter® Zählkassette aufgesogen und dabei mit Propidiumjodid gefärbt. Die Anzahl der gefärbten Zellkerne wurde schließlich im NucleoCounter® fluoreszenzmikroskopisch bestimmt und als Zellen je ml ausgegeben. Die Gesamtzellzahl der Zellsuspension errechnete sich aus:

$$Zellzahl_{Gesamt} = Zellzahl_{NucleoCounter} \cdot 3 \cdot \text{Volumen}_{Suspension}$$

2.2.1.10 Zusatz von α-Linolensäure zum Zellkulturmedium

1 µl α-Linolensäure (ALA) wurde in 5 ml frisches Zellkulturmedium pipettiert, 5 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad homogenisiert und dem Zellkulturmedium zugefügt und eine Endkonzentrationen von 130 µM, 65 µM und 32,5 µM ALA im Zellkulturmedium eingestellt. Die Adaption der Zellen an den Zusatz von ALA im Nährmedium betrug drei Subkultivierungen, bevor sie erstmals geerntet bzw. analysiert wurden.

2.2.1.11 Reduktion der Zellkulturtemperatur

Die Reduktion der Zellkulturtemperatur erfolgte zweistufig und wurde während der *in vitro* Kultivierung vorgenommen. Die jeweiligen Zellkulturen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, ein Medienwechsel vorgenommen (2.2.1.3) und anschließend die Kultivierungstemperatur um 5 °C gesenkt. Dabei wurde die reduzierte Kultivierungstemperatur von dem aktiv gekühlten Inkubator nach etwa 30 min erreicht. Die reduzierte Temperatur wurde 48 Stunden konstant gehalten, bevor die Inkubatortemperatur um weitere 5 °C reduziert wurde. Die geringste Zellkulturtemperatur entsprach somit für die Zellen der Regenbogenforelle 10 °C bzw. bei denen des Atlantischen Störs 15 °C. Die geringste Kultivierungstemperatur wurde für 72 Stunden konstant gehalten. Anschließend wurden die Zellen von der Wachstumsoberfläche abgelöst (2.2.1.4) und gefriergetrocknet (2.2.1.13).

2.2.1.12 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden, wie in 2.2.1.4 beschrieben, enzymatisch von der Wachstumsoberfläche abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit der in Tab. 1 angegebenen Menge an ca. 4 °C kaltem Kryomedium aufgenommen, in ein eisgekühltes Kryotube pipettiert und in eine Kryobox überführt. In dieser Kryobox wurden die Zellen bei -80 °C kontrolliert eingefroren (1 °C pro min) und schließlich in den Kryotank zur Lagerung bei -196 °C überführt.

2.2.1.13 Gefriertrocknung *in vitro* kultivierter Zellen

Die von der Wachstumsoberfläche abgelösten und zentrifugierten Zellen (2.2.1.4) wurden im Gefriertrockner getrocknet. Dafür wurde das Zellpellet zweimal mit 5 ml bis 10 ml PBS gewaschen, zentrifugiert, der Überstand weitestgehend abgesaugt und das Zentrifugenröhrchen in den Gefriertrockner gestellt. Während der Gefriertrocknung betrug das Vakuum 0,05 mbar und die Temperatur des Kondensators -90 °C. Die Trocknungszeit dauerte in Abhängigkeit der Pelletgröße zwei bis vier Stunden. Im Anschluss an die Gefriertrocknung wurde das Zentrifugenröhrchen entnommen, mit Stickstoffgas überschichtet und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

2.2.1.14 DAPI-Zellkernfärbung

Auf gekrümmten bzw. nicht transparenten Oberflächen lassen sich Zellen mit einem Labormikroskop nur schlecht beurteilen. In diesem Fall wurden die Zellkerne der adherenten Zellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt und entweder mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM) oder dem SteREO Discovery.V20 mikroskopiert. Dafür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS entsprechend der Tab. 1 gespült, mit eiskalter DAPI-Arbeitslösung überschichtet und 5 min fixiert bzw. gleichzeitig gefärbt. Nach erfolgter Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS (Tab. 1) gewaschen und abschließend mikroskopiert.

2.2.1.15 OilRedO- / Hämatoxylin-Färbung

Für die OilRedO- / Hämatoxylin-Färbung wurde eine OilRedO-Arbeitslösung frisch hergestellt. Hierbei musste zuerst die OilRedO-Stammlösung kräftig geschüttelt werden. Je nach benötigter Menge an Färbelösung wurden der Volumenanteile der OilRedO-Stammlösung mit zwei Volumenanteilen *Aqua bidest.* verdünnt, 10 min inkubiert und anschließend über einen Faltenfilter filtriert. Nach dem Herstellen dieser OilRedO-Arbeitslösung konnten die Zellen vorbereitet werden. Dafür wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS entsprechend der Tab. 1 gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einer frisch hergestellten Formalin-Fixierlösung vollständig bedeckt und 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Die so fixierten Zellen wurden mit 1 ml – 2 ml *Aqua bidest.* gespült, mit 60 %igem Isopropanol überschichtet und 5 min inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit der filtrierten OilRedO-Arbeitslösung vollständig bedeckt und 5 min gefärbt. Nach erfolgter OilRedO-Färbung wurden die Zellen mehrfach vorsichtig mit 1 ml – 2 ml *Aqua bidest.* gespült. Für die Hämatoxylin-Färbung wurden die Zellen mit frisch filtrierter Hämalaulösung überschichtet und 1 min gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen dreimal mit 1 ml – 2 ml *Aqua bidest.* gespült und mikroskopisch dokumentiert. Alle Färbeschritte erfolgten unter einem Abzug.

2.2.1.16 Bestimmung der relativen Lipidperoxidation

Die nichtenzymatische bzw. autokatalytische oxidative Modifikation (Autoxidation) von ungesättigten Fettsäuren wird im Allgemeinen als Lipidperoxidation bezeichnet. Das Maß der Lipidperoxidation ist die Peroxidzahl (POZ) und gibt an, wie viele Milliäquiva-

lente molekularen Sauerstoffs als Hydroperoxid je kg Fett bzw. Öl gebunden sind. Dabei gilt, je kleiner die POZ ist, desto höher ist auch die Qualität. Die Bestimmung der POZ in der klassischen Zellkultur ist aufgrund der geringen Probenmengen wenig geeignet. Um dennoch eine qualitative Aussage über die in den Fischzellen enthaltenen Fettsäuren treffen zu können, wurde eine alternative molekularbiologische Bestimmungsmethode ausgewählt. Das Molekül Diphenyl-1-pyrenylphosphin (DPPP) wird stöchiometrisch durch membranäre Hydroperoxide zum Diphenyl-1-pyrenylphosphinoxid (DPPP-O) oxidiert und kann durch die Messung der Fluoreszenzintensität quantifiziert werden [Takahashi *et al.* 2001]. Wegen diesem Zusammenhang wird DPPP zur relativen Quantifizierung der Lipidperoxidation in Zellmembranen und damit für eine Bewertung der Qualität der beteiligten Fettsäuren herangezogen. Für die relative Quantifizierung wurden Fischzellen in *clear bottom* 96-Well Multiwellplatten eingesetzt (2.2.1.4), mit α -Linolensäure versetzt (2.2.1.10) und die Zellkulturtemperatur reduziert (2.2.1.11). Dabei erfolgte die Messung der relativen Lipidperoxidation an zwei Punkten. Der erste Messpunkt war bei Erreichen der Konfluenz bevor das Medium gewechselt und die Temperatur reduziert wurde, der zweite war am Ende der 72-stündigen Kultivierung bei der niedrigsten Inkubatortemperatur.

Für die Bestimmung der relativen Lipidperoxidation wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit dem in der Tab. 1 aufgeführten Volumen an PBS bedeckt. Alle folgenden Pipettierschritte wurden möglichst rasch in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Zuerst wurde die DPPP-Arbeitslösung frisch hergestellt. Anschließend wurde das PBS von den Zellen abgesaugt, durch 100 μ l DPPP-Arbeitslösung ersetzt und 15 min unter Lichtabschluss inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 100 μ l PBS gespült und Fluoreszenzintensität des DPPP-O im Mikroplattenleser bestimmt. Dafür wurde eine Anregungswellenlänge von 345 nm und eine Emissionswellenlänge von 385 nm ausgewählt und die erhaltene Fluoreszenzintensität auf die der jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen normiert.

Die Vorbereitung sowie die eigentliche Messung erfolgten in einer Dunkelkammer im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und wurden an einem Tecan Infinite® 200 Pro durchgeführt.

2.2.1.17 Bestimmung der relativen Anzahl mitotischer Zellen

Für die Bestimmung der relativen Anzahl mitotischer Zellen wurde in dieser Arbeit der Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) verwendet. 7-AAD interkaliert mit besonderer Präferenz in die GC-reichen Bereiche der helikalen DNA und verändert dadurch seine Fluoreszenzeigenschaften, wodurch der DNA-Gehalt einer Zelle gemessen werden kann [Zelenin *et al.* 1984]. Da sich der DNA-Gehalt einer Zelle während des Zellzyklus ändert, können mit dieser Methode die mitotischen Zellen (G₂-Phase bzw. Mitose) von den nicht-mitotischen Zellen (G₁- bzw. G₀-Phase) unterschieden werden.

Für die Messung wurden OMYsd1x Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 am 4. Tag nach der Aussaat (AOXlar7 am 3. Tag) von der Wachstumsoberfläche abgelöst und zentrifugiert (2.2.1.4). Das Zellpellet wurde in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen je ml eingestellt (2.2.1.9). Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, in der gleichen Menge an 70 %igem Ethanol aufgenommen und bei -20 °C fixiert bzw. permeabilisiert. Davon wurden 200 µl auf Eis in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 5 min bei 1800 Umdrehungen in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit eiskaltem FACS-Puffer aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 20 µl *cell viability solution* (7-AAD) versetzt. Nach ausreichender Durchmischung der Zellsuspension wurden die Zellen 10 min inkubiert, erneut suspendiert und die Fluoreszenzintensität mit einem Durchflusszytometer (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 670 nm gemessen. Für eine Analyse wurden 10.000 Zellen verwendet, die Durchflusssgeschwindigkeit betrug 12 µl / min.

Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde zuerst gegen die Granularität der Zellen als Dichtediagramm aufgetragen. Hierbei ist die Fluoreszenzintensität von 7-AAD in einer farblichen Abstufung dargestellt, bei der eine Region heller erscheint, je öfter eine Fluoreszenzintensität detektiert wurde. Die erhaltenen Regionen wurden festgelegt und das jeweilige geometrische Mittel von der FACS-Software ausgegeben. Bezogen auf den Zellzyklus haben mitotische Zellen einen homolog verdoppelten Chromatid-Chromosomensatz, wonach der Zahlenwert des geometrischen Mittelwertes im Idealfall dem zweifachen des Zahlenwertes von nicht-mitotischen Zellen entspricht. Für die relative Quantifizierung der mitotischen Zellen wurde anschließend die Fluoreszenzintensität von 7-AAD gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Methodisch handelt es sich hierbei um eine Überführung des Dichtediagramms in ein Histo-

gramm, bei dem die Anzahl der Zellen spezifischer Fluoreszenzintensität direkt proportional mit der Höhe des Peaks ist. Mit Hilfe der FACS-Software wurde eine Flächenanalyse der Histogramme durchgeführt, wodurch die relative Anzahl der Zellen innerhalb einer Region bestimmt werden konnte. Diese Flächenanalyse konnte allerdings nur dann angewendet werden, wenn beide Regionen eindeutig zugeordnet werden konnten. War dies nicht der Fall, musste vorerst die ungefähre Position der Regionen abgeschätzt werden. Dafür wurden die Histogramme übereinander gelegt und die entsprechenden Regionen annäherungsweise übertragen. Durch die Übertragung der Regionen *M1* und *M2* in das jeweilige Histogramm war es möglich, den Anteil der mitotischen Zellen unterschiedlicher Passagen relativ miteinander zu vergleichen.

2.2.2 Bioreaktoren

2.2.2.1 Kultivierung von AOXlar7 im BioLevigator™ Bioreaktor

Bei dem BioLevigator™ handelt es sich im Prinzip um einen *rotating wall vessel* Bioreaktor (Abb. 7 c). Anders als in der Abb. 7 c ist die Rotationsachse in vertikaler Richtung orientiert und die Bewegung des Zellkulturmediums erfolgt durch alternierende Rotationsrichtungswechsel. Dabei erfolgt die eigentliche Kultivierung in bis zu vier unabhängigen Kultivierungsgefäßen (LeviTubes), die bis zu 50 ml Kultivierungsmedium enthalten. Durch die im Inneren des LeviTubes angeordneten Strömungsbrecher wird eine ausreichende Durchmischung des Mediums erreicht. Die für die Kultivierung benötigte Wachstumsoberfläche wird von sphärischen Oberflächen mit magnetischem Kern, sogenannte *Global Eukaryotic Microcarrier* (GEM™) bereitgestellt. Diese GEM™ haben einen Durchmesser von 75 µm – 150 µm und sind an der Oberfläche mit verschiedenen Überzügen modifiziert. Während der Kultivierung im BioLevigator™ werden die GEM™ im LeviTube in Suspension gehalten, die Begasung mit O₂ bzw. CO₂ erfolgt über den Bauraum des BioLevigators™ bzw. einer permeablen Membran im Deckel des Levi-Tubes.

Der BioLevigator™ ist für eine Kultivierungstemperatur von 25 °C nicht konzipiert. Um dennoch AOXlar7 Zellen kultivieren zu können, wurde der BioLevigator™ samt Zubehör in einem Kühlraum bei 4 °C betrieben. Hierfür musste entsprechend den Herstellerangaben die Kultivierungstemperatur softwareseitig angepasst und durch manuelle Temperaturmessungen justiert werden. Erst durch diese apparativen Modifikationen

2. Materialien und Methoden

war es möglich, bei geringeren Temperaturen zu kultivieren. Für die Kultivierung von AOXlar7 Zellen wurden gelatinebeschichtete GEMTM ausgewählt. 840 GEMTM mit einer rechnerischen Oberfläche von 835 cm² wurden von der Verwendung in 2 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und anschließend 24 Stunden inkubiert. Die auf diese Weise vorbereiteten GEMTM wurden resuspendiert und ein Aliquot (250 µl entspricht rund 100 cm² bzw. 125 µl entspricht rund 50 cm²) in ein LeviTube überführt. Anschließend wurden die GEMTM mit 6,5 ml einer Zellsuspension (insgesamt 5 x 10⁶ Zellen) überschichtet und entsprechend dem gewählten Inokulationsprotokoll kultiviert (Tab. 2). Im Anschluss an die Inokulation wurde das Zellkulturmedium alle 24 Stunden schrittweise auf 10 ml, 25 ml und 50 ml aufgefüllt. Nach der Inokulationsdauer von 48 Stunden begann die eigentliche Kultivierung. In regelmäßigen Abständen wurden Proben der Suspensionskultur aus dem LeviTube entnommen und mikroskopisch beurteilt. Die Zellzahl der Zellen, welche sich auf GEMTM befanden, wurde mit dem NucleoCounter® (2.2.1.9) bestimmt.

Tab. 2 | Kultivierungsparameter von AOXlar7 Zellen im BioLeviatorTM auf gelatinebeschichteten GEMTM.

	Vorversuch	Inokulation	Kultur
Zellsuspension [Zellen]		5 x 10 ⁶ AOXlar7 P28	
Rotationsdauer [sek]	3	3	3
Rotationspause [sek]	0	0	0
Bewegungsdauer [min]	40	60	
Bewegungspause [min]	2	2	
Rotationsgeschwind. [rpm]	60	50	50
Protokolldauer [h]	24	48	∞

2.2.2.2 Kultivierung von AOXlar7 im Z®RP breeder

Der Z®RP breeder entspricht vom Aufbau her dem in Abb. 8 c dargestellten Drehbettreaktor. In der Kultivierungskammer werden adhärente Zellen auf horizontal rotierenden Materialien oder Oberflächen dynamisch kultiviert. Für die Kultivierung von Fischzellen wurde der Z®RP breeder mit einer Kühlmanschette versehen, um eine Kultivierung bei Raumtemperatur zu ermöglichen. Zwei verschiedene Typen von

Oberflächen standen für die Kultivierung zur Verfügung. Sowohl zwei anorganische makroporige Sponceram® Scheiben mit insgesamt 20.000 cm² Oberfläche, als auch ein horizontales Drehbett aus zweidimensionalem Polycarbonat mit 12.000 cm² Oberfläche wurden als Wachstumsoberfläche verwendet. Von den Sponceram® standen drei unterschiedliche Oberflächen zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer makro-, meso- und mikroporigen Eigenschaften unterschieden (Abb. 11). Um herauszufinden, welche dieser Oberflächen für die Kultivierung von Fischzellen am geeignetsten ist, wurden Sponceram® Discs (Durchmesser 1 cm) mit 50.000, 100.000 und 200.000 Zellen besiedelt und fünf Tage kultiviert. Dafür wurden die Sponceram® Discs in je ein Well einer 12-Well Multiwellplatte platziert, mit der jeweiligen Zellsuspension inokuliert und anschließend im Inkubator kultiviert (2.1.6.1).

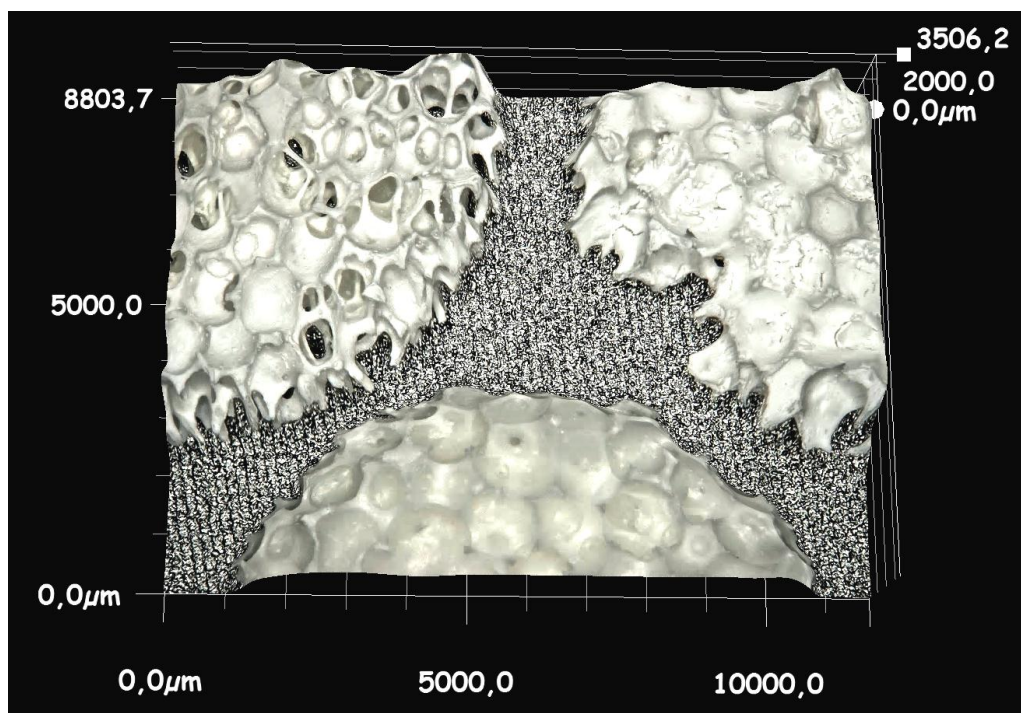


Abb. 11 | 3D-Oberflächenmikroskopische Aufnahme der Sponceram® Discs mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften. Die ausgeprägte Gerüststruktur oben links ist 160AL-20-130, oben rechts mit deutlichen Kavitäten 160AL-30-130 und unten 160AL-20-00 mit glänzender makroporiger Oberfläche. Vergrößerung 30-fach.

Die Anzahl adhärent wachsender Zellen lässt sich nur dann exakt bestimmen, wenn sie homogen suspendiert vorliegen. Da für die quantitative Ablösung der Zellen von

den Sponceram® Oberflächen noch kein Protokoll etabliert worden war, wurde die Anzahl der Zellen auf den Sponceram® Discs mit dem CellQuanti-MTT™ *cell viability* assay (MTT-Assay) abgeschätzt. Das MTT-Assay wird üblicherweise verwendet, um die Stoffwechselaktivität von *in vitro* kultivierten Zellen kolorimetrisch zu bestimmen. Dabei wird ein wasserlösliches gelbes Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid, MTT) in Abhängigkeit der mitochondrialen Stoffwechselaktivität der Zellen zu wasserunlöslichem Formazan reduziert, welches in den Zellen kumuliert. Durch Zellyse mit Dimethylsulfoxid (DMSO) lässt sich das Formazan lösen und die Absorption photometrisch bestimmen und an Hand von Referenzdaten quantifizieren. Unter der Annahme, dass die Stoffwechselaktivität identischer Zellen bei gleichartigen Kultivierungsbedingungen nahezu einheitlich sein sollte, kann der MTT-Assay genutzt werden, um die relative Anzahl der lebenden Zellen auf den verschiedenen Sponceram® Discs zu bestimmen.

Für diese Bestimmung wurden die Sponceram® Discs mit einer Zellsuspension inokuliert und fünf Tage lang kultiviert, bevor sie vorsichtig mit ausreichend PBS gespült, in ein neues Well einer 12-Well Multiwellplatte überführt und für vier Stunden mit dem MTT-Medium inkubiert wurden. Im Anschluss an die Inkubation wurde das MTT-Medium abgesaugt, einmal mit PBS gespült und mit 500 µl DMSO 30 min auf dem Orbitalschüttler bei ca. 80 rpm inkubiert. 100 µl des DMSOs wurden abgenommen, in eine 96-Well Multiwellplatte überführt und die Absorption des enthaltenen Formazans in einem Mikroplattenleser bei 540 nm photometrisch bestimmt.

2.2.3 Entwicklung eines neuartigen Bioreaktorprinzips

Die Entwicklung eines neuartigen Kultivierungsprinzips für adhärent wachsende Zellkulturen wurde in dem Multifors® 2 Bioreaktor der Firma Infors-HT etabliert. Bei dem Multifors® 2 handelt es sich um einen Doppel-Rührkesselreaktor, der für die Kultivierung von suspendierten Zellen vorgesehen ist. Jedes Kultivierungsgefäß hat ein Volumen von 750 ml und lässt sich unabhängig von dem anderen Kultivierungsgefäß betreiben. Für die Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen wurde der Multifors® 2 instrumentell bzw. technisch modifiziert.

2.2.3.1 Technische Modifikationen des Multifors® 2 Bioreaktors

In dieser Arbeit wurden die beiden Kultivierungsgefäße getrennt voneinander betrieben. Dabei war das linke Kultivierungsgefäß ausschließlich für die Vorbereitung des Nährmediums vorgesehen. In diesem als Konditionierungsreaktor bezeichneten Teil des Multifors® 2 wurden die physikalischen und chemischen Medieneigenschaften kontrolliert und eingestellt. Das zweite Kultivierungsgefäß bzw. der Kultivierungsreaktor war für die eigentliche Kultivierung der Zellen vorgesehen. Die in diesem Abschnitt behandelten Modifikationen beziehen sich hauptsächlich auf den Kultivierungsreaktor und sind nachfolgend genauer beschrieben. Für die bessere Orientierung im System ist in der Abb. 12 das Regelungs- und Instrumentierungs-Fließschema des vollständig konfektionierten Multifors® 2 Bioreaktors abgebildet.

- **Konditionierungsreaktor**

Die Ausstattung des Konditionierungsreaktors entsprach weitestgehend dem serienmäßigen Aufbau mit pH-, OD- und pO_2 -Sonden, einem Abluftkühler, einer Probenentnahmemöglichkeit und einem Septum. Die Temperatur des Nährmediums wurde über einen Sensor gemessen und mittels Heiz- bzw. Kühlmanschette geregelt. Die ebenfalls eingesetzte Antischaumsonde fungierte lediglich als Schaumsensor ohne eine geregelte Zufuhr von Antischaummittel. Sowohl das Nährmedium, als auch die Säure- und Basekorrekturen wurden über Ports zugeführt, die Begasung des Mediums mit Pressluft, O_2 , N_2 und CO_2 erfolgte über einen Begasungsring. Aufgrund teilweise beachtlicher Schaumbildung während der Kultivierung wurde die serienmäßige Ausstattung um eine Schaumfalle erweitert. Diese war direkt mit dem Abluftkühler verbunden und bestand aus einer 1 l Flasche, die an den Abgaskühler angeschlossen wurde, in der sich der entstehende Schaum ausbreitete. Hinter dieser Schaumfalle wurde die Abluft über eine Trockensäule zum O_2 / CO_2 -Gasanalysator geführt. Die magnetisch angetriebene Rührerwelle wurde mit einem Propellerrührer bestückt.

- **Kultivierungsreaktor**

In dem Kultivierungsreaktor wurden die adhärent wachsenden Zellen kultiviert. Dieser Reaktorteil wurde lediglich mit einem Temperatursensor bestückt, wodurch die Temperatur der Heiz- bzw. Kühlmanschette geregelt wurde. Als Wachstumsoberfläche für die Kultivierung der adhären Zellkulturen wurden Netzgewebe ausgewählt. Für die

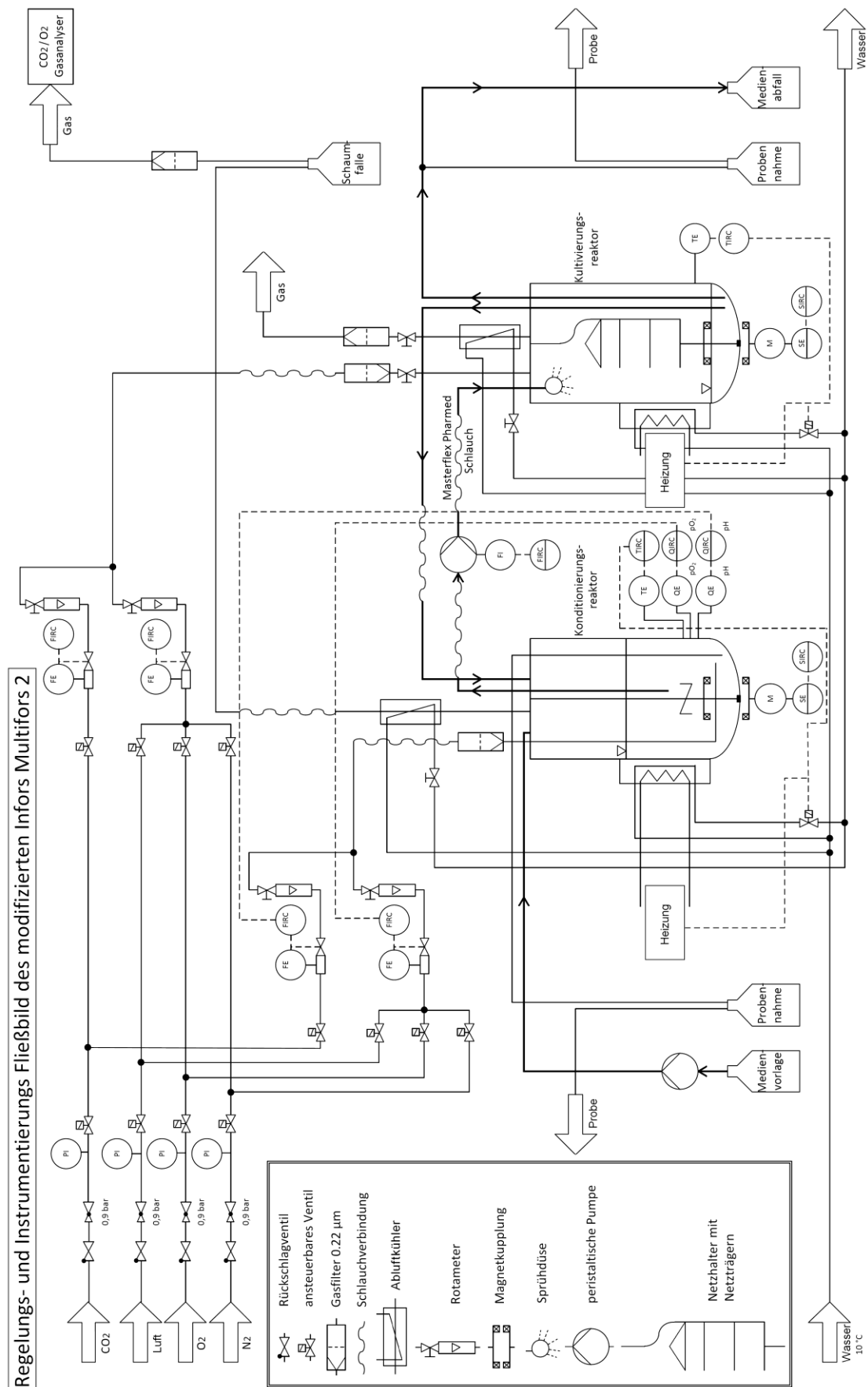


Abb 12 | Regelungs- und Instrumentierungs-Fließschema des Multifors® 2 Bioreaktors. Schema angepasst und erweitert in Anlehnung an DIN EN ISO 10628 nach [Schulze-Jena 2012]

2. Materialien und Methoden

Platzierung der Netzgewebe wurde eine Halterung entworfen, zusammen mit der Abt. Gerätebau dreidimensional konstruiert und anschließend mit einem Lasersinter gefertigt. Als Material für diesen als *rapid prototyping* bezeichneten Prozess wurde Polyamid ausgewählt, da dieses Material sowohl biokompatibel, als auch autoklavierbar ist. Die auf diese Weise hergestellten Prototypen sind in der Abb. 13 dargestellt.

Abgesehen von der Netzhalterung der ersten Generation (Abb. 13 a), sollte die Kultivierung der Netzgewebe in einem Sprühnebel aus Nährmedium erfolgen. Bevor jedoch der Kultivierungsreaktor in eine Sprühkammer umgebaut werden konnte, musste eine geeignete Sprühvernebelungsmethode gefunden werden. In Zusammenarbeit mit Schulze-Jena wurden unterschiedliche Niederdrucksprühdüsen (MRS 0.2, MRS 0.3

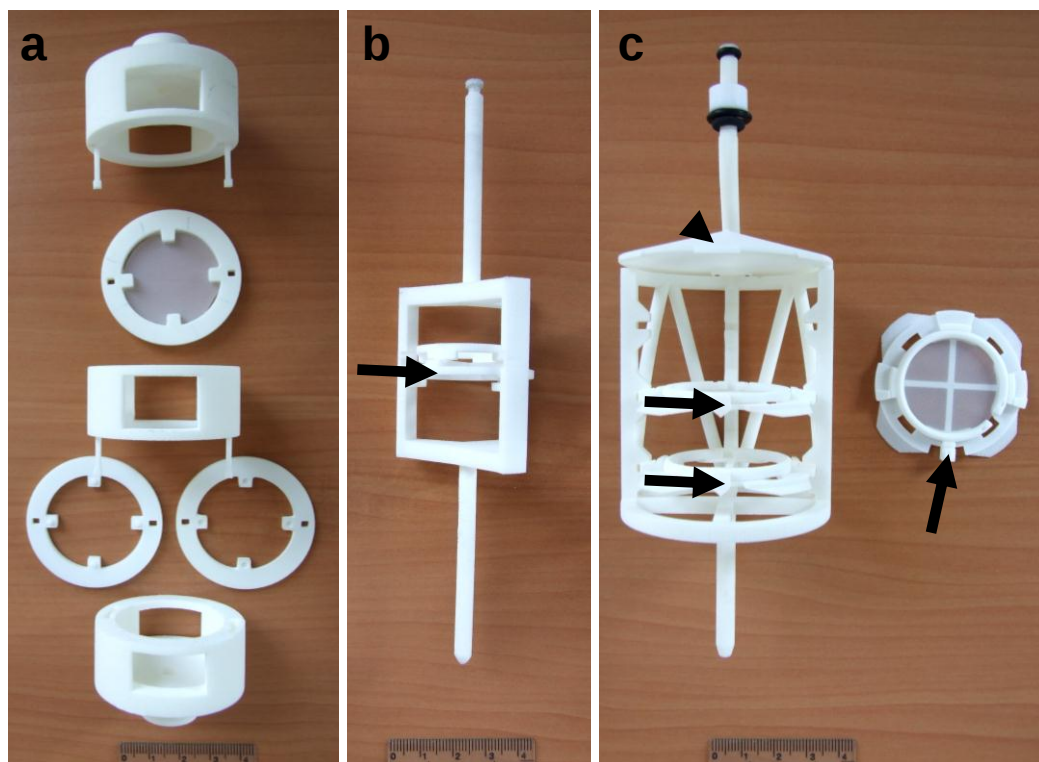


Abb. 13 | Übersichtsaufnahmen über die Prototypen der Netzhalterungen. Das erste Funktionsmodell wurde gemeinsam mit Hoffmann (2010) entworfen (a). Hierbei handelt es sich um ein Stecksystem, in das bis zu zwei Netzgewebe eingesetzt werden können. Ausgehend von diesem ersten Prototyp bzw. Funktionsmodell wurde die Netzhalterung der zweiten Generation (b) abgeleitet, die an Stelle der Rührerwelle in den Reaktorinnenraum eingesetzt werden kann. Hierbei werden die Netzgewebe in einem kreisrunden Trägersystem fixiert und in die Halterung (b, Pfeil) eingesetzt. Der in (c) abgebildete Netzhalter stellt die finale Weiterentwicklung der zweiten Generation dar. Die Netzgewebe werden ebenfalls in Netzträgern eingesetzt (c, Pfeile) und in die Netzhalterung geschoben, so dass bis zu drei Netzgewebe gleichzeitig kultiviert werden können. Ein Hütchen über dem obersten Netzträger schützt die Zellen vor direkter Besprühung (c, Pfeilspitze).

Anti-Tropf, MRS 0.5, Rauch WD 04 und Schlick 123) bei einem Wasserdruck von 1 bar bis 7 bar betrieben und deren Sprüheigenschaften untersucht. Dafür wurden die Düsen über einer Wanne aufgehängt und mittels Hochdruckschlauch an einen 5 l fassenden Drucktank angeschlossen. Dieser Drucktank wurde etwa zur Hälfte mit *Aqua bidest.* gefüllt und durch einen regelbaren Druckluftkompressor auf den jeweiligen Arbeitsdruck gebracht. Durch ein Manometer, welches sich direkt vor der Düse befand, wurde der Wasserdruck vor der Düse während des Sprühens gemessen und der Arbeitsdruck des Druckluftkompressors gegebenenfalls korrigiert. Ein zwischen Manometer und Druckbehälter befindliches Kugelventil diente der manuellen Regelung des Sprühvorgangs. Während des Sprühens wurde der durch die Düse erzeugte Sprühnebel mit einer Hochgeschwindigkeitskamera eine Sekunde lang aufgezeichnet und anschließend qualitativ ausgewertet. Die Aufnahmen erfolgten stets in einem Abstand von etwa 40 – 50 cm vom Objekt bei 2.000 Bildern pro Sekunde und wurden mit einer Abspielrate von 30 Bildern pro Sekunde als Videosequenzen gespeichert. Mit dieser Methode konnte auch die Tropfengrößenverteilung zu Beginn und die Tropfenbildung nach dem Sprühstoß qualitativ beurteilt werden. Zusätzlich zu den reinen Sprühbildanalysen wurde ebenfalls das Volumen während einer 1-minütigen Sprühdauer in einem Messzylinder aufgenommen und gravimetrisch bestimmt.

Ausgehend von den oben beschriebenen Sprühbildanalysen wurde die MRS 0.5 Sprühdüse ausgewählt und in den Multifors® 2 Bioreaktor montiert. Als Zugang in den Reaktorinnenraum wurde ein Blindstopfen eines Sondenports ausgewählt, in Zusammenarbeit mit der Abt. Gerätebau durchbohrt und mit den notwendigen Gewinden versehen. In der Abb. 14 ist der präparierte Blindstopfen dargestellt. Im innenliegenden Teil bzw. zwischen Blindstopfen und Sprühdüse wurde ein Kugelknickgelenk mit einem individuell einstellbaren Knickwinkel von $\pm 15^\circ$ eingebaut um eine Flexibilität des Sprühstrahls zu erreichen (Abb. 14 a). Für die Montage der Sprühdüse an das Kugelknickgelenk war ein Gewindeadapter notwendig, der in der Abt. Gerätebau angefertigt wurde (Abb. 14 a). An dem außenliegenden Teil des Blindstopfens wurde eine handelsübliche Schlauchtülle angebracht, an der der PharMed BPT 15HP Hochdruckschlauch angeschlossen wurde (Abb. 14 c bzw. Abb. 14 d).

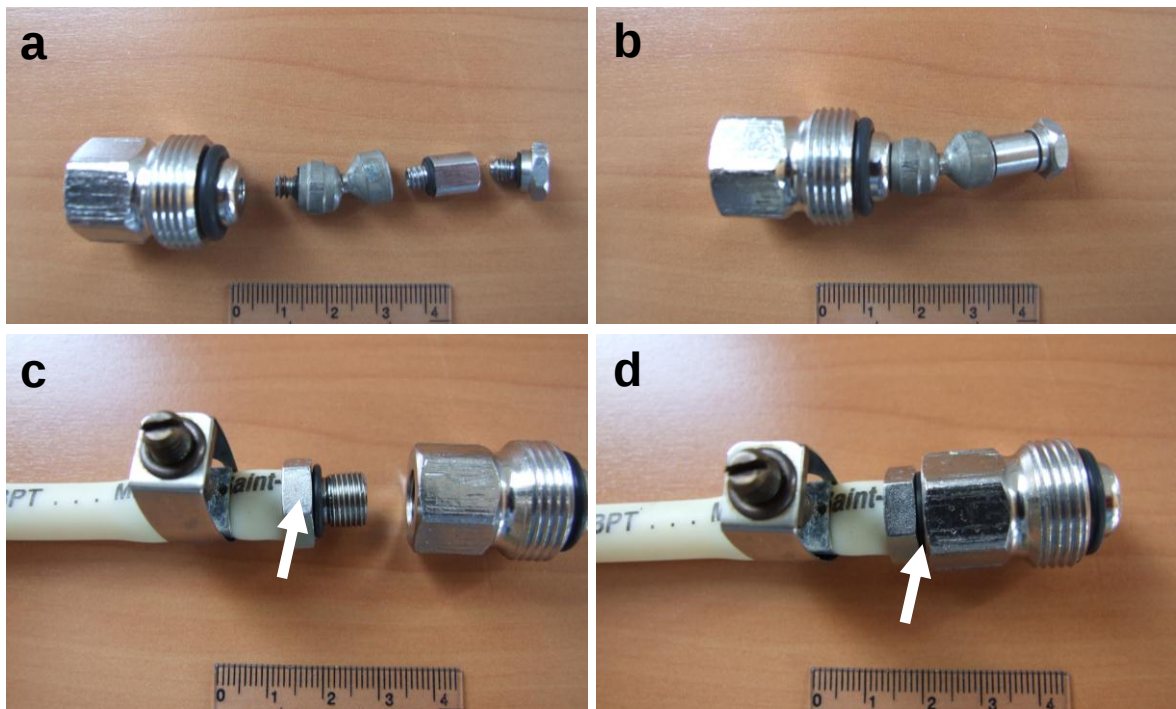


Abb. 14 | Übersichtsaufnahmen der Sprühdüsenapparatur im Multifors® 2. In a) sind die Bestandteile der Sprühdüsenapparatur zusammen mit den verwendeten O-Ring-Dichtungen abgebildet (v. l. n. r.: Blindstopfen, Kugelnickgelenk, Gewindeadapter und Sprühdüse MRS 0.5). Die einzelnen Bestandteile werden ineinander geschraubt (b) und der Schlauchanschluss erfolgt mit einer Schlauchtülle (c, Pfeil). Die Verbindung zwischen Schlauchtülle und Blindstopfen musste nach dem Autoklavieren des Reaktors fest angezogen werden (d, Pfeil).

Durch den Einbau des modifizierten Blindstopfens in den Multifors® 2 Bioreaktor wurde ein Sprühkesselreaktor konstruiert, in dem die qualitativen Sprühbildanalysen wiederholt wurden. Dafür wurde die oben beschriebene Drucktank-Sprühapparatur an den modifizierten Blindstopfen mit MRS 0.5 Sprühdüse angeschlossen und die resultierenden Sprühbilder mit der Hochgeschwindigkeitskamera bei 2.000 Bildern pro Sekunde aufgenommen.

- **Hochdruckverbindung zwischen Konditionierungs- und Kultivierungsreaktor**

Für das *proof of concept* einer *in vitro* Kultivierung adhärent wachsender Zellkulturen auf Netzwesen in einem Sprühnebel musste ein Arbeitsdruck von mindestens 5 bar erzeugt werden. Neben dieser Grundbedingung wurden folgende Nebenbedingungen definiert, nach denen eine geeignete Pumpe ausgewählt wurde:

- Die Pumpe muss mit den zur Verfügung stehenden Sterilisationsmethoden dekontaminiert werden können und sich nach dem Gebrauch leicht reinigen lassen.
- Der Kontakt der Pumpenbauteile mit dem Nährmedium darf weder zu Kontaminationen noch zum Eintrag von Fremdstoffen in das Nährmedium führen.
- Da es sich lediglich um ein *proof of concept* bzw. ein Funktionsmuster handelt, sollten die Kosten der Pumpe niedrig gehalten werden.

Aus der Vielzahl möglicher Pumpen wurde die peristaltisch arbeitende Masterflex L/S mit Hochleistungspumpkopf L/S ausgewählt. Diese Pumpe ist in der Lage, den benötigten Arbeitsdruck zu erzeugen und arbeitet dabei absolut kontaktfrei. Der PharMed BPT 15HP Hochdruckschlauch wurde als Hochdruckverbindung eingesetzt und mit einer Schlauchklemme an der Schlauchtülle befestigt (Abb. 14 c bzw. Abb. 14 d).

• **Kreislauf des Nährmediums**

Für die Kultivierung der Zellen in dem modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor wurde ein Fallrohr in den Konditionierungsreaktor eingebaut und mit dem Hochdruckschlauch verbunden. Das darüber entnommene Nährmedium wurde in der Masterflex L/S Pumpe verdichtet und mit der Sprühdüse in den Kultivierungsreaktor gesprüht. Das in dem Kultivierungsreaktor angefallene Medium wurde wiederum durch ein Fallrohr aufgenommen und über Schlauchverbindungen dem Konditionierungsreaktor wieder zugeführt. In dem Kultivierungsreaktor wurde zusätzlich ein leichter Überdruck durch eine minimale Begasung von $< 0,02 \text{ l/min}$ erzeugt, wodurch das Nährmedium vom Boden des Kultivierungsreaktors zurück in den Konditionierungsreaktor gepumpt und der Kreislauf des Nährmediums geschlossen wurde.

2.2.3.2 Vorbereitung des modifizierten Multifors® 2 Bioreaktors

Für die Vorbereitung des modifizierten Multifors® 2 wurden sowohl der Konditionierungsreaktor, als auch der Kultivierungsreaktor mit den oben beschriebenen Bauteilen, Verbindungen und Modifikationen entsprechend der Abb. 12 aufgebaut. Die pH-

2. Materialien und Methoden

Sonde des Konditionierungsreaktors wurde vor dem Einbau mit den vorhandenen Pufferlösungen auf pH 4 und pH 7 zweipunktkalibriert und die erreichten Parameter in das Log-Buch eingetragen. Wichtig hierbei war, dass während der Kalibrierung der Temperaturfühler die Temperatur der Kalibrierlösung messen konnte. In die Lageraufhängung des Kultivierungsreaktors wurde die Netzhalterung ohne Netzträger eingesetzt und eine Magnetplatte am unteren Ende montiert. Der Hochdruckschlauch wurde an die Tülle gesteckt und mit einer Schlauchschelle so fest wie möglich fixiert. Gleiches galt für die Sprühdüsenapparatur. Alle Verbindungen und Stopfen des Multifors® 2 wurden handfest angezogen und die angeschlossenen Schläuche mit *Aqua bidest.* benetzt. Vor der Autoklavierung wurden alle Gasfilter mit Aluminiumfolie abgedeckt, circa 300 ml *Aqua bidest.* in die beiden Reaktorkessel gefüllt und alle Schlauchklemmen geöffnet. Der fertig konfektionierte Multifors® 2 wurde aus der Steuereinheit genommen und anschließend 30 min bei 121 °C autoklaviert.

Nach erfolgreicher Autoklavierung wurde die Sterilisation in das Log-Buch eingetragen, der Multifors® 2 unter der Sicherheitswerkbank auf Umgebungstemperatur abgekühlt und eine Medienflasche mit mindestens 500 ml Nährmedium unter sterilen Bedingungen angeschlossen. Nach dem Abkühlen wurde der Multifors® 2 wieder in die Steuereinheit eingesetzt, alle Anschlüsse (Sonden, Pumpe, Zuluft und Abluft) mit den entsprechenden Kabeln und Schläuchen an den Gasfiltern versehen und der Bioreaktor zusammen mit dem Kühlaggregat, dem Druckluftkompressor, dem O₂ / CO₂ Gasanalysator und dem Steuergerät der OD-Sonde eingeschaltet. Ebenfalls mussten die Druckgasflaschen für die O₂, CO₂ und N₂ Versorgung geöffnet werden. Dabei war auf den korrekten Arbeitsdruck der Reaktormanometer zu achten.

Nachdem das System fehlerfrei hochgefahren war, wurde das in den Rührkesseln vorhandene *Aqua bidest.* über die Probeentnahmeflaschen abgenommen, 300 ml frisches Nährmedium in den Konditionierungsreaktor überführt und entsprechend der Tab. 3 bei 37 °C, 21 % O₂ und pH 7,4 mindestens 24 Stunden ein Sterillauf durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls die Hochdruckpumpe eingeschaltet und der Hochdruckschlauch entsprechend der Herstelleranweisungen eingefahren. In der Zusammenfassung war hierfür vorerst eine dauerhafte Pumpgeschwindigkeit von 5 rpm über mindestens 5 min einzuhalten, die dann langsam auf 50 rpm gesteigert wurde. Hierbei musste ab einer Pumpgeschwindigkeit von ca. 15 rpm die Hochdruckverbindung zwischen PharMed BPT 15HP Schlauch und dem Übergang am Blindstopfen überprüft

2. Materialien und Methoden

und gegebenenfalls fester angezogen werden. Nach dem Erreichen der 50 rpm wurde eine Pumpdauer von 30 sek und eine Pumppause von 30 sek eingestellt, wodurch ein intervallartiger Pumpzyklus erreicht wurde.

Konnte nach dem Sterillauf keine Kontamination in der Medienprobe festgestellt werden, so wurde im Anschluss die pO_2 -Sonde kalibriert. Wichtig hierbei war, dass die Sonde mindestens 24 Stunden polarisiert worden war. Für die Kalibrierung musste die Hochdruckpumpe ausgeschaltet und die beabsichtigte Kultivierungstemperatur eingestellt werden. Nach einer Wartezeit von mindestens zwei Stunden wurde die Begasung auf 0,1 l / min mit 100 % N_2 eingestellt und bei Erreichen eines konstanten Wertes der Nullpunkt der pO_2 -Sonde kalibriert. Als nächstes wurde bei gleicher Durchflussmenge mit Pressluft begast, in gleicher Weise der 21 % Wert kalibriert und die erreichten Werte in das Log-Buch eingetragen. Abschließend wurde das Medium des Sterillaufes aus dem Konditionierungsreaktor entfernt, durch frisches ergänzt, der Wert der OD-Sonde auf den Nullwert gestellt und entsprechend der Tab. 3 die Kultivierungsparameter eingestellt. Sobald alle Parameter ein konstantes Niveau erreicht hatten, wurden die Zellen in den Bioreaktor eingesetzt.

Tab. 3 | Kultivierungsparameter von Z29 und AOXlar7 Zellen im Multifors® 2 Bioreaktor auf Netzgeweben.

	Konditionierungsreaktor	Kultivierungsreaktor
Rührgeschwind. [rpm]	50	1
Temperatur [°C]	37 (25)*	37 (25)*
Begasung [l/min]	0,02	< 0,02
Gasmix bzw. pO_2 [%]	21 bzw. 5	21 bzw. 5
pH-Wert	7,4 (7,8)*	
Hochdruckpumpe [rpm]		50
Pumpdauer [s]		30
Pumppause [s]		30

* Kultivierungsparameter, die exklusiv für die Kultivierung der AOXlar7 Zellen eingestellt wurden, sind in Klammern eingefasst.

2.2.3.3 Überführung der Netzgewebe in den Multifors® 2

Bioreaktor

Bevor die Netzgewebe in den vorbereiteten Multifors® 2 eingesetzt werden konnten, musste der Multifors® 2 aus der Steuereinheit entfernt und unter die Sicherheitswerkbank gestellt werden. Da die AOXlar7 Zellen nicht in den Netzträgern vorkultiviert wurden, mussten die Netzgewebe vorerst mit einer feinen Pinzette aus der 6-Well Multiwellplatte entnommen, in einen autoklavierten Netzträger gelegt und mit der Ringspanne des Netzträgers fixiert werden. Danach wurde der Netzträger in eine Petrischale (60,1 cm²) gelegt und mit ca. 30 ml Nährmedium bedeckt. Die Z29 Zellen wurden vor der Kultivierung im Bioreaktor bereits in Netzträger überführt und drei Tage vorkultiviert. Als nächstes wurde der Kultivierungsreaktor geöffnet und bis zu drei Netzträger möglichst rasch in die Netzhalterung eingesetzt. Zügig wurde der Reaktordeckel wieder verschlossen und der Multifors® 2 wieder in die Steuereinheit eingesetzt. Zu allererst wurde der Hochdruckschlauch in den Hochdruckpumpkopf eingelegt und die interwallartigen Pumpzyklen eingestellt. Anschließend wurden alle Anschlüsse (Sonden, Zuluft und Abluft) mit den entsprechenden Kabeln und Schläuchen versehen und die Kultivierungsparameter entsprechend der Tab. 3 eingestellt. Während der Kultivierung wurden regelmäßig Proben genommen und der Hochdruckschlauch in dem Hochleistungspumpkopf alle 24 Stunden um etwa 1 cm in Richtung Sprühdüse verschoben.

2.2.4 Analytische Bestimmungsmethoden

2.2.4.1 Aminosäurebestimmung

Für die qualitative und quantitative Aminosäurebestimmung mussten etwa 100 mg Fischzellen vorgelegt werden. Dafür wurden die Zellen aus mehreren 150 cm² Zellkulturflaschen geerntet, zusammengeführt, zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen, wie in 2.2.1.13 beschrieben gefriergetrocknet und anschließend gewogen.

Die Aminosäurebestimmung der gefriergetrockneten Zellen erfolgte durch das Institut Fresenius (SGS Gruppe, Deutschland). Nach HCl-saurer Hydrolyse wurden die Aminosäuren mit dem Farbstoff Ninhydrin versetzt, mittels HPLC aufgetrennt und durch einen UV-Detektor bestimmt. Die qualitative und quantitative Zuordnung

erfolgte über interne Standards. Die erhaltenen Messwerte wurden auf Gramm je 100 g Fischzell-Lyophilisat normiert. Für die Auftragung der Messwerte wurden die Aminosäuren in essentielle und nicht essentielle gruppiert. Der in den Tabellen der Messergebnisse dargestellte Gesamtaminosäuregehalt entspricht der Summe aller mit dieser Methode erfolgreich detektierten Aminosäuren.

2.2.4.2 Fettsäurebestimmung

Für die Fettsäurebestimmung wurden 20 mg – 50 mg Zellen benötigt. Wie bei der Aminosäurebestimmung wurden diese Zellen durch das Zusammenführen der geernteten Zellen aus mehreren 150 cm² Zellkulturflaschen erhalten. Das Zellpellet wurde zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend gefriergetrocknet (2.2.1.9). Im Anschluss daran wurde das Zell-Lyophilisat gewogen, in Braunglasvials abgefüllt und mit Stickstoff überschichtet. Die Braunglasvials wurden bis zur Analyse bei -80 °C gelagert bzw. auf Trockeneis versendet.

Die qualitative und quantitative Analyse des Fettsäuregehalts der gefriergetrockneten Fischzellproben (2.2.1.13) wurde im Technologietransferzentrum Bremerhaven (ttz-Bremerhaven, Deutschland) durchgeführt. Die Fettsäureester wurden mittels Dichlormethan / Methanol (2:1) im Ultraschallbad extrahiert und mit 0,8 % KOH versetzt. Danach wurde das Lösungsmittel in einer Stickstoffatmosphäre entfernt und die entstandenen Fettsäuren mit Dichlormethan aufgenommen, in einem Gemisch aus methanolischer Schwefelsäure und Hexan bei 80 °C gekocht und mit Schwefelsäure / Methanol umgeestert. Die Fettsäuremethylester wurden mit Hexan extrahiert, in einem Gaschromatographen mit selektiver Kapillarsäule (DB-FFAP) getrennt und durch einen Flammenionisationsdetektor bestimmt. Die qualitative Zuordnung und die Quantifizierung erfolgten entsprechend der jeweiligen Retentionszeiten unter Zuhilfenahme des internen Standards Nonadecansäure.

Im Rahmen der Auswertung der Messergebnisse wurden die analysierten Fettsäuren zunächst anhand ihrer Klassen eingruppiert. Diese Eingruppierung erfolgte nach gesättigten (*saturated fatty acids*, SFAs), einfach ungesättigten (*monounsaturated fatty acids*, MUFAs) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs). Entsprechend dieser Gruppierung wurde das relative Verhältnis dieser Fettsäureklassen zueinander als SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis definiert. Hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften aber auch hinsichtlich ihrer biologischen

2. Materialien und Methoden

Aktivitäten sind die PUFAs vergleichsweise heterogen und wurden daher weitergehend unterteilt. Die Subgruppierung der PUFAs erfolgte in Omega-3 Fettsäuren und Omega-6 Fettsäuren, deren Verhältnis als n-3 / n-6-Quotient definiert wurde. Die unterrepräsentierten Omega-4 PUFAs wurden hierbei nicht weiter berücksichtigt. Der Gesamtfettsäuregehalt wurde durch aufsummieren aller erfolgreich detektierten Fettsäuren unter Berücksichtigung eventueller Verdünnung erhalten. Eine Verdünnung musste bei der Bestimmung des Gesamtfettsäuregehalts von DMEM mit einem Zusatz von 10 % bzw. 20 % FKS berücksichtigt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Ernährungsphysiologische Charakterisierung der Langzeit-Fischzellkulturen

Bevor ein technisch kontrollierter Kultivierungsprozess für die Biomasseproduktion adhärent wachsender Fischzellen gefunden werden konnte, galt es festzustellen, ob sich Langzeit-Fischzellkulturen als Fischmehlersatz bzw. Futtermittelzusatz eignen. Ausgehend davon wurde der Schwerpunkt des biologischen Teils dieser Arbeit auf die nährwertrelevanten Eigenschaften von *in vitro* kultivierten Fischzellen gelegt. Anhand der ernährungsphysiologischen Bedeutung des Fischmehls wurde daher neben dem Proteingehalt bzw. der Zusammensetzung der Aminosäuren auch die Fettsäurezusammensetzung von OMXsd1x und AOXlar7 Zellen bestimmt. Anhand dieser Charakterisierung sollte die Vergleichbarkeit von Fischzellkulturen gegenüber traditionellem Fischmehl überprüft werden.

3.1.1 Aminosäurezusammensetzung *in vitro* kultivierter Fischzellen

Die quantitative Bestimmung ergab für die OMYsd1x Zellen in Passage 28 und 31 einen Gesamtproteingehalt von 62,6 g je 100 g Zell-Lyophilisat. Davon waren 49,2 % der Gruppe der essentiellen Aminosäuren unterzuordnen, wobei Leucin und Lysin mit je 8,2 % sowie Arginin und Valin mit 6,7 % bzw. 6,1 % die höchsten prozentualen Anteile erreichten. Der Anteil an Methionin betrug 2,8 %, Histidin war mit 2,5 % die am geringsten enthaltene essentielle Aminosäure. Unter den nicht als essentiell einzustufenden Aminosäuren waren Glutaminsäure mit 14,4 % und Asparaginsäure mit 10,3 % die dominierenden Aminosäuren. Die Aminosulfonsäure Taurin war mit knapp einem Prozent enthalten. Mit 0,4 % und je 0,1 % waren Cystein bzw. β -Alanin und γ -Aminobuttersäure (*4-amino-butanoic acid*, GABA) in nur sehr geringen Mengen enthalten. Der Vergleich der prozentualen Aminosäurezusammensetzung von gefriergetrockneten OMYsd1x Zellen mit der des verwendeten Zellkulturmediums ist in der Abb. 15 dargestellt.

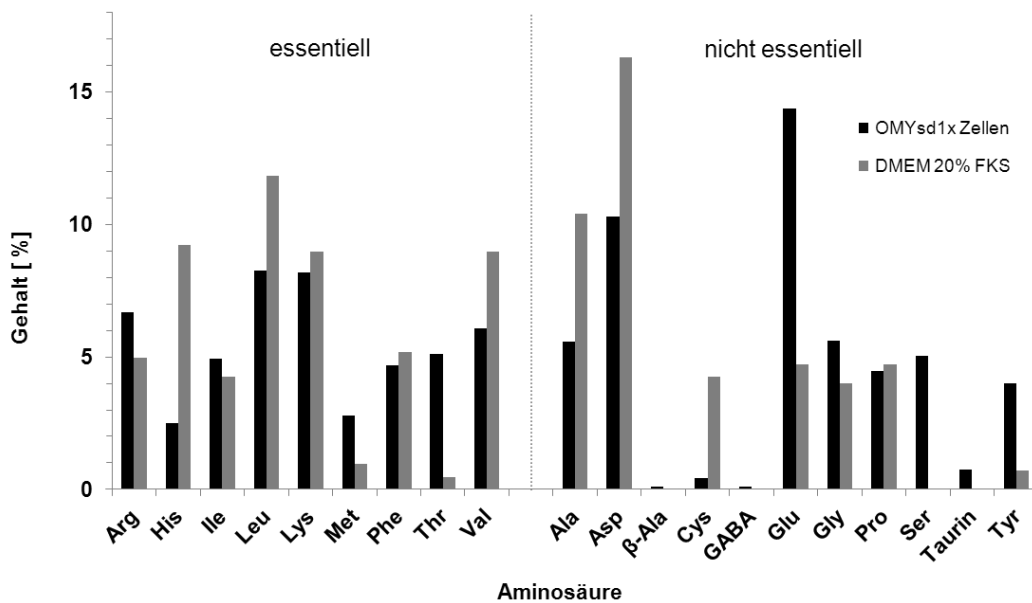


Abb. 15 | Aminosäurezusammensetzung von OMYsd1x Zellen. Dargestellt ist die prozentuale Aminosäurezusammensetzung (Dreibuchstabencode) von gefriergetrockneten OMYsd1x Zellen zusammengeführt aus den Passagen 28 und 31 (schwarze Balken) verglichen mit der Aminosäurezusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums (DMEM 20 % FKS, graue Balken). Für die bessere Übersichtlichkeit wurden die Aminosäuren in essentielle und nicht essentielle Aminosäuren unterteilt. Der Gehalt einer Aminosäure in „%“ ist bezogen auf den Gesamtgehalt aller Aminosäuren. Die Einzelwerte befinden sich im Anhang in der Tab. 9.

FKS: fötales Kälberserum, GABA: γ-Aminobuttersäure

Der Gesamtproteingehalt des Nährmediums (DMEM 20 % FKS), bestimmt aus der Summe aller quantitativ analysierten Aminosäuren betrug 0,4 g je 100 g Medium, von denen rund 55 % essentielle Aminosäuren waren. Bei der gegenüberstellenden Betrachtung der prozentualen Aminosäurezusammensetzung der gefriergetrockneten OMYsd1x Zellen und dem verwendeten Nährmedium wurde festgestellt, dass in dem verwendeten Nährmedium Histidin, Leucin und Valin deutlich höhere relative Anteile hatten, als in den kultivierten Zellen. Bezogen auf die OMYsd1x Zellen war der relative Anteil dieser Aminosäuren um den Faktor 3,7, 1,4 bzw. 1,5 höher. Im Gegensatz dazu waren die Anteile von Arginin, Methionin und Threonin geringer. Der relative Anteil dieser Aminosäuren war um den Faktor 1,4, 2,9 bzw. 10,8 niedriger.

Die quantitative Aminosäureanalyse der ebenfalls untersuchten AOXlar7 Zellen in Passage 36 ergab erstaunlicherweise einen Proteingehalt von lediglich 28,7 g je 100 g, wobei 45,7 % davon essentielle Aminosäuren waren. Unter den essentiellen Aminosäuren war Leucin mit 10,8 % die herausragende Aminosäure gefolgt von Lysin mit 8 % und Valin bzw. Arginin mit je 6 %. Der Anteil an Methionin in den AOXlar7

Zellen betrug 1,8 %. Threonin war mit 0,3 % die mit Abstand am geringsten enthaltene essentielle Aminosäure. Bei den nicht essentiellen Aminosäuren waren Asparaginsäure mit 17,6 % und Alanin mit 15,7 % am meisten enthalten. Taurin wurde in den AOXlar7 Zellen mit 1,6 % detektiert. Auffällig war, dass Tyrosin mit 1,2 % den geringsten Anteil hatte. Die prozentuale Zusammensetzung der Aminosäuren im AOXlar7-Lyophilisat verglichen mit der des Zellkulturmediums ist in Abb. 16 dargestellt.

Für das Nährmedium der AOXlar7 Zellen wurde ein Gesamtproteingehalt von 0,2 g je 100 g bestimmt, wovon rund 57 % essentielle Aminosäuren waren. Im Vergleich zu den Aminosäuren der AOXlar7 Zellen wurde festgestellt, dass die relative Verteilung der essentiellen Aminosäuren sehr ähnlich ist. Lediglich Histidin und Valin waren in dem Nährmedium in deutlich höheren relativen Anteilen enthalten. Bezogen auf die AOXlar7 Zellen waren diese Aminosäuren um den Faktor 2,4 bzw. 1,7 höher. Dem gegenüber waren Arginin und Methionin im Zellkulturmedium geringer enthalten. Der entsprechende Faktor betrug 1,3 bzw. 2,2.

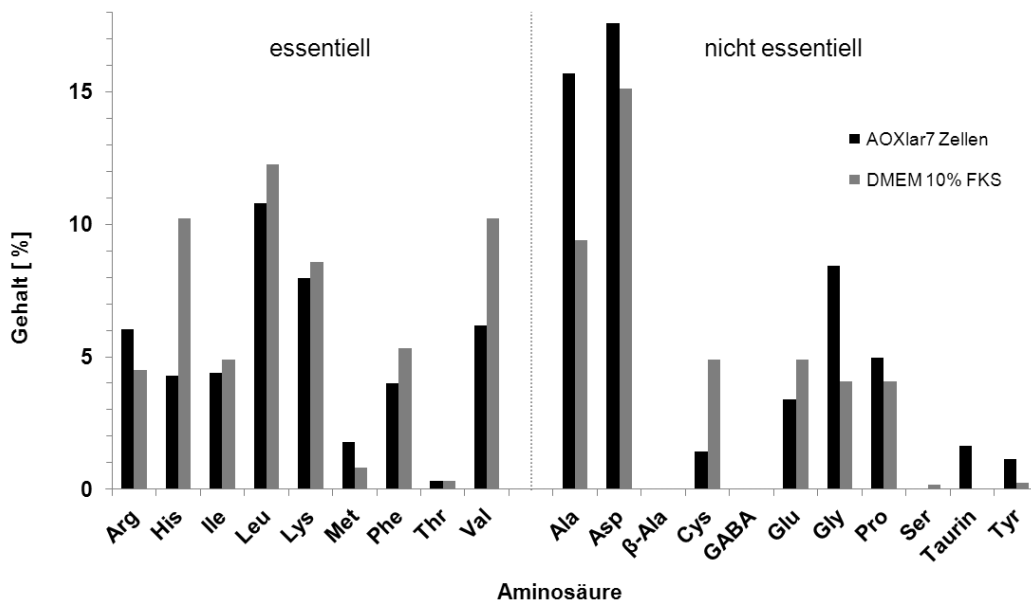


Abb. 16 | Aminosäurezusammensetzung von AOXlar7 Zellen. Dargestellt ist die prozentuale Aminosäurezusammensetzung (Dreibuchstabencode) von gefriergetrockneten AOXlar7 Zellen in Passage 36 (schwarze Balken) verglichen mit der Aminosäurezusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums (DMEM 10 % FKS, graue Balken). Für die bessere Übersichtlichkeit wurden die Aminosäuren in essentielle und nicht essentielle Aminosäuren unterteilt. Der Gehalt einer jeweiligen Aminosäure in „%“ ist bezogen auf den Gesamtgehalt aller Aminosäuren. Die Einzelwerte befinden sich im Anhang in der Tab. 10.

FKS: fötales Kälberserum, GABA: γ -Aminobuttersäure

3.1.2 Fettsäurezusammensetzung *in vitro* kultivierter Fischzellen

Für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung des verwendeten Nährmediums, wurde das fötale Kälberserum (FKS) analysiert. Ausgehend von diesem Analyseergebnis (siehe Anhang Tab. 11) wurde für DMEM mit 10 %igem bzw. 20 %igem Zusatz an FKS ein Gesamtfettsäuregehalt von rund 0,04 g bzw. 0,08 g je 100 ml berechnet. Die Verteilung des SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis von FKS war 33:19:48. Unter den PUFAs überwogen mit 33,3 % die Omega-3 Fettsäuren, der Anteil der Omega-6 Fettsäuren betrug 10,5 %. Der daraus resultierende n-3 / n-6-Quotient betrug 3,16. Die Omega-3 Fettsäuren ALA und EPA waren mit einem Anteil von 10,3 % bzw. 6,5 % enthalten. DHA wurde im FKS nicht detektiert.

Die unter Normalbedingungen kultivierten OMYsd1x Zellen enthielten 6,5 g Fettsäuren je 100 g Zell-Lyophilisat. Die Fettsäureklassen waren im Verhältnis von 27:53:20 verteilt. Palmitinsäure (16:0) und Ölsäure (*oleic acid*, OA, 18:1n-9) waren dabei die überwiegenden Fettsäuren der SFAs bzw. MUFAs. Da der Anteil an Omega-6 Fettsäuren überwog, betrug der n-3 / n-6-Quotient lediglich 0,27. Unter den Omega-3 Fettsäuren wurden ALA und EPA analytisch nicht erfasst, DHA jedoch mit einem Anteil von 2,7 %. Durch die sequenzielle Reduktion der Zellkulturtemperatur um 10 °C veränderte sich das SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis von 27:53:20 auf 24:47:29. Der erhöhte relative Anteil der PUFAs ergab sich aus den signifikanten Anstiegen von AA (+1,6 %, $p = 0,05$; t-Test), EPA (+0,9 %, $p = 0,02$; t-Test) und DHA (+1,3 %, $p = 0,04$; t-Test). Da die Omega-3 und die Omega-6 Fettsäuren gleichermaßen anstiegen, veränderte sich der n-3 / n-6-Quotient kaum (0,38). Allerdings reduzierte sich unter diesen Kultivierungsbedingungen der Fettsäuregehalt in den Zellen um 0,5 g auf 6 g je 100 g Zell-Lyophilisat.

OMYsd1x Zellen, die unter normalen Kultivierungsbedingungen mit zusätzlichen 130 µM ALA im Zellkulturmedium kultiviert wurden, zeigten eine deutlich erhöhte ALA Konzentration im Lyophilisat. Während ALA im OMYsd1x-Lyophilisat ohne diesen Zusatz nicht detektiert werden konnte, erhöhte sich der Anteil von ALA unter diesen Bedingungen signifikant (+15,6 %, $p = 0,003$; t-Test). Das SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis verschob sich von 27:53:20 auf 29:29:42. Ein dabei nahezu konstant gebliebener Anteil an Omega-6 Fettsäuren führte zu einem auf 1,77 erhöhten n-3 / n-6-Quotienten. Neben dem Anteil an ALA erhöhte sich der Anteil an EPA ebenfalls signifikant (+1,9 %, $p < 0,001$; t-Test), der Anteil an DHA blieb jedoch unverändert. Die Gesamt-

3. Ergebnisse

menge aller untersuchten Fettsäuren in den Zellen betrug 6,4 g je 100 g Zell-Lyophilisat. Die Kombination aus zusätzlichen 130 μM ALA im Zellkulturmedium und gleichzeitig reduzierter Kultivierungstemperatur führte, verglichen mit der Kultivierung unter Normalbedingungen, zu einer signifikanten Erhöhung des PUFA-Gehalts (+23 %, $p = 0,009$; t-Test), das SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis änderte sich von 27:53:20 auf 34:22:43. Wegen eines um 2 % reduzierten Anteils an Omega-6 Fettsäuren erhöhte sich der n-3 / n-6-Quotient auf 2,17. Zudem veränderte sich die Verteilung der Omega-3 Fettsäuren in den Zellen. ALA war mit einem Anteil von 8,6 % enthalten, der Anteil an EPA erhöhte sich signifikant auf 3,8 % ($p = 0,002$; t-Test), DHA blieb mit 2,8 % auf vergleichbarem Niveau. Der Gesamtgehalt aller Fettsäuren reduzierte sich unter diesen Bedingungen von ursprünglich 6,5 g auf 5,9 g (siehe Abb. 17).

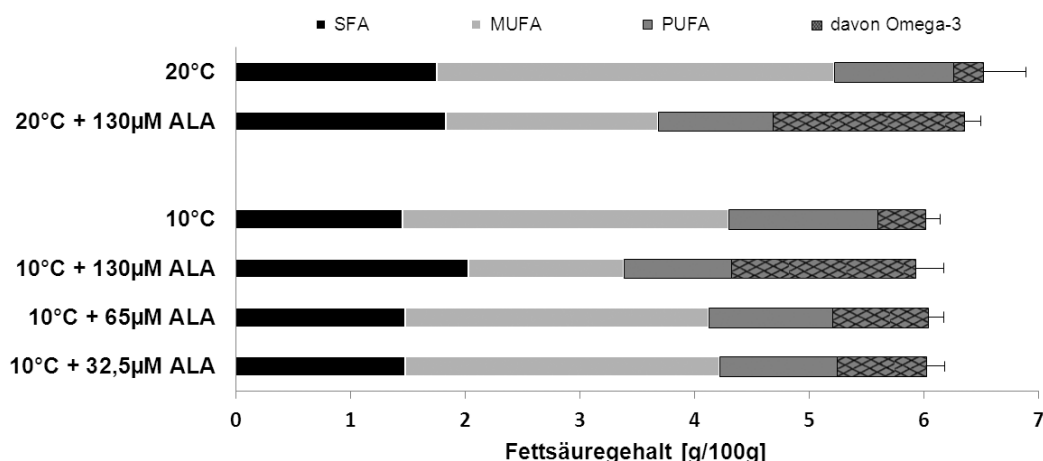


Abb. 17 | Übersicht über die Fettsäurezusammensetzung [g / 100 g] von OMYsd1x Zellen der Passagen 27 bis 31 bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Gezeigt ist sowohl der Einfluss der Kultivierungstemperatur (20 °C bzw. 10 °C), als auch der des Zusatzes an ALA (32,5 μM , 65 μM und 130 μM). Die enthaltenen Fettsäuren sind unterteilt in SFAs (schwarzer Balken), MUFAs (hellgrauer Balken) und PUFAs (dunkelgrauer Balken). Die PUFAs sind zusätzlich in Omega-6 Fettsäuren (dunkelgrau, nicht schraffiert) und Omega-3 Fettsäuren (dunkelgrau, schraffiert) unterteilt. Die angegebenen Messwerte sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung ($n = 3$). Die Einzelwerte sind im Anhang in der Tab. 12 hinterlegt.

ALA: α -Linolensäure, MUFA: einfach ungesättigte Fettsäure, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäure, SFA: gesättigte Fettsäure

In den vorangegangenen Versuchen wurde festgestellt, dass die zusätzliche Zufuhr von 130 μM ALA dazu führt, dass der Anteil an ALA im OMYsd1x-Lyophilisat signifikant anstieg. Wegen eventuell hemmender bzw. rückgekoppelter Mechanismen des

Fettsäuremetabolismus wurden zudem geringere Zusätze an ALA im Zellkulturmedium ausgewählt und der Effekt auf die Fettsäurezusammensetzung untersucht. Die Halbierung des Zusatzes auf 65 µM führte bei anschließend verringerter Kultivierungstemperatur erwartungsgemäß zu einer Reduktion des ALA-Anteils im Lyophilisat von 8,6 % auf 2,2 % ($p < 0,001$; t-Test). Gleichfalls reduzierte sich der Anteil der EPA von 3,8 % auf 2,3 % ($p = 0,004$; t-Test). DHA erhöhte sich signifikant von 2,8 % auf 3,1 % ($p = 0,004$; t-Test). Der n-3 / n-6-Quotient sank von 2,17 auf 0,9. Eine weitere Reduktion des Zusatzes auf 32,5 µM hatte zur Folge, dass der Anteil an PUFAs weiter abnahm. Auch der Anteil an ALA reduzierte sich auf 1,6 %. Der Gehalt an EPA war mit 2,3 % vergleichbar dem der Kultur mit 65 µM, DHA stieg weiter auf 3,3 %.

Die Fettsäurezusammensetzung von AOXlar7 Zellen kultiviert unter Normalbedingungen ergab einen Gesamtfettsäuregehalt von 6,3 g mit einem SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis von 43:40:17. Palmitinsäure (16:0) und OA waren dabei die dominierenden Fettsäuren der SFAs bzw. MUFAs. Bei den PUFAs war der Anteil der Omega-3 Fettsäuren mit 4 % gegenüber den Omega-6 Fettsäuren mit 11 % unterrepräsentiert, weshalb der n-3 / n-6-Quotient einen Wert von 0,37 erreichte. Durch den Zusatz von 130 µM ALA zu dem Zellkulturmedium stieg der Anteil an ALA in den Zellen signifikant an (+9,9 %, $p < 0,001$; t-Test), das SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis verschob sich auf 47:19:34. Unter den PUFAs wurde darüber hinaus auch ein signifikanter Anstieg weiterer Omega-3 Fettsäuren, wie z.B. EPA (+3,9 %, $p < 0,001$; t-Test), beobachtet. DHA blieb als einzige Omega-3 Fettsäure auf dem gleichen Niveau. Durch den signifikant gesunkenen Anteil an Omega-6 Fettsäuren (-2,7 %, $p < 0,001$; t-Test) erhöhte sich der n-3 / n-6-Quotient von 0,37 auf 3,1. Die Gesamtmenge aller Fettsäuren war mit 6,1 g leicht reduziert. Die schrittweise durchgeführte Reduktion der Zellkulturtemperatur ausgehend von 25 °C auf 15 °C verschob das SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis von 43:40:17 auf 30:41:29. Hierbei erhöhte sich der Anteil an der Omega-6 Fettsäure AA signifikant (+2,3 %, $p = 0,002$; t-Test), die Omega-3 Fettsäure EPA erhöhte sich leicht von 0,6 % auf 1,0 % und DHA erhöhte sich ebenfalls signifikant (+4,3 %, $p < 0,001$; t-Test). Der Anstieg der Omega-6 und Omega-3 Fettsäuren führte zu einer leichten Erhöhung des n-3 / n-6-Quotienten auf 0,64. Auffällig war jedoch, dass der Gesamtgehalt der Fettsäuren in diesen Zellen um mehr als 20 % auf 7,6 g je 100 g Zell-Lyophilisat erhöht war. Die Kombination aus zusätzlichen 130 µM ALA im Zellkulturmedium und der um 10 °C reduzierten Kultivierungstemperatur veränderte das Verhältnis der Fettsäureklassen von 43:40:17 auf 34:18:48. ALA erreichte unter diesen

3. Ergebnisse

Kultivierungsbedingungen einen Anteil von 15,1 % (+15 %, $p = 0,008$; t-Test), EPA 5,3 % (+4,7 %, $p = 0,02$; t-Test) und DHA 3,5 % (+1,4 %, $p = 0,05$; t-Test). Bei einem gleichbleibenden Anteil an Omega-6 Fettsäuren veränderte sich der n-3 / n-6-Quotient auf 3,76. Ebenfalls erhöhte sich hierbei der Gesamtgehalt aller Fettsäuren signifikant um 25 % auf 7,8 g je 100 g Zell-Lyophilisat ($p < 0,05$; ANOVA, siehe Abb. 18).

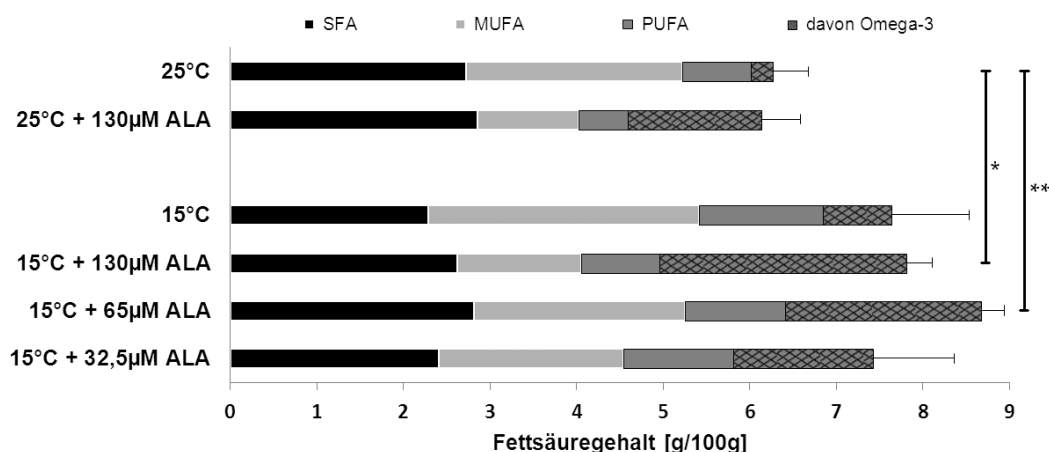


Abb. 18 | Übersicht über die Fettsäurezusammensetzung [g / 100 g] von AOXlar7 Zellen der Passagen 27 bis 29 bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

Gezeigt ist sowohl der Einfluss der Kultivierungstemperatur (25 °C bzw. 15 °C), als auch der des Zusatzes an ALA (32,5 µM, 65 µM und 130 µM). Die enthaltenen Fettsäuren sind unterteilt in SFAs (schwarzer Balken), MUFAs (hellgrauer Balken) und PUFAs (dunkelgrauer Balken). Die PUFAs sind zusätzlich in Omega-6 Fettsäuren (dunkelgrau, nicht schraffiert) und Omega-3 Fettsäuren (dunkelgrau, schraffiert) unterteilt. Die angegebenen Messwerte sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung ($n = 3$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA). Die Einzelwerte sind im Anhang in der Tab. 13 hinterlegt.

ALA: α -Linolensäure, MUFA: einfach ungesättigte Fettsäure, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäure, SFA: gesättigte Fettsäure

Bei den AOXlar7 Zellen wurde ebenfalls festgestellt, dass der Zusatz von 130 µM ALA zu dem Nährmedium dazu führt, dass die ALA in den Zellen bzw. deren Lyophilisat angereichert wird. Daher wurden auch die AOXlar7 Zellen mit niedrigeren Zusätzen kultiviert. Die Reduktion auf 65 µM ALA und die schrittweise durchgeführte Reduktion der Kultivierungstemperatur verschob das SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis von 34:18:48 auf 33:28:40¹. Der Anteil an ALA reduzierte sich signifikant auf 1,7 %, ($p = 0,009$; t-Test), EPA und DHA erhöhten sich ebenfalls signifikant auf 10,4 % ($p = 0,02$; t-Test) bzw. 5,2 % ($p = 0,03$; t-Test). Darüber hinaus reduzierte sich der n-3 / n-6-Quotient

¹ Abweichung durch Rundung

von 3,76 auf 2,4. Der Gesamtgehalt aller Fettsäuren erhöhte sich signifikant auf rund 8,7 g je 100 g Zell-Lyophilisat ($p < 0,01$; ANOVA, siehe Abb. 18). Eine weitere Reduktion des Zusatzes an ALA auf 32,5 μM bei verringerter Kultivierungstemperatur veränderte das SFA:MUFA:PUFA-Verhältnis kaum, mit 32:29:39 war es vergleichbar mit dem bei 65 μM ALA. Durch eine leichte Zunahme der Omega-6 Fettsäuren und leichte Reduktion der Omega-3 Fettsäuren verringerte sich der n-3 / n-6-Quotient auf einen Wert von 1,5. ALA und DHA hatten mit 1,8 % bzw. 5,6 % vergleichbare Werte wie bei dem Zusatz von 65 μM ALA. Der Anteil an EPA betrug unter diesen Bedingungen 7,5 %. Die Gesamtmenge aller Fettsäuren reduzierte sich ebenfalls auf 7,4 g je 100 g Zell-Lyophilisat.

3.1.3 Lipid-Färbung mit OilRedO

Ein großer Teil der zugesetzten ALA konnte in dem Zell-Lyophilisat wiedergefunden werden. Neben dieser Beobachtung traten zusätzlich morphologische Veränderungen der Zellen auf, besonders bei einem Zusatz von 130 μM ALA. Diese Veränderungen waren vesikuläre bzw. tröpfchenförmige Einschlüsse innerhalb der Zellen. Mit dem lipophilen Azofarbstoff OilRedO sollte in diesem Versuch überprüft werden, ob es sich bei den mikroskopischen Veränderungen um Lipidtröpfchen handelte.

Die Abb. 19 zeigt OMYsd1x Zellen, die mit steigenden Zusätzen an ALA kultiviert und anschließend gefärbt worden sind. Die ungefärbten Kontrollzellen zeigten bei den Zusätzen von 0 μM , 32,5 μM bzw. 65 μM ALA keine mikroskopischen Veränderungen. Einzig bei dem Zusatz von 130 μM ALA wurden vereinzelt Zellen beobachtet, die deutliche morphologische Veränderungen aufwiesen. Diese Zellen hatten im Zytoplasma eine Vielzahl von vesikulären bzw. tröpfchenförmigen Einschlüssen (Abb. 19 g), die von OilRedO allerdings nicht angefärbt wurden (Abb. 19 h).

Bei den AOXlar7 Zellen wurden ähnliche Veränderungen beobachtet. Bei den 32,5 μM und 65 μM Zusätzen waren – wenn überhaupt – lediglich vereinzelt tröpfchenförmige Veränderungen erkennbar. Der Zusatz von 130 μM führte hingegen in dem Großteil der Zellen zu tröpfchenförmigen Veränderungen (Abb. 20 g). Wie in der Abb. 20 h zu sehen ist, waren diese Tröpfchen fast ausschließlich kernnah lokalisiert und wurden mit dem lipophilen Farbstoff OilRedO positiv angefärbt. In der Abb. 20 sind die mikroskopischen Aufnahmen der AOXlar7 Zellen dargestellt.

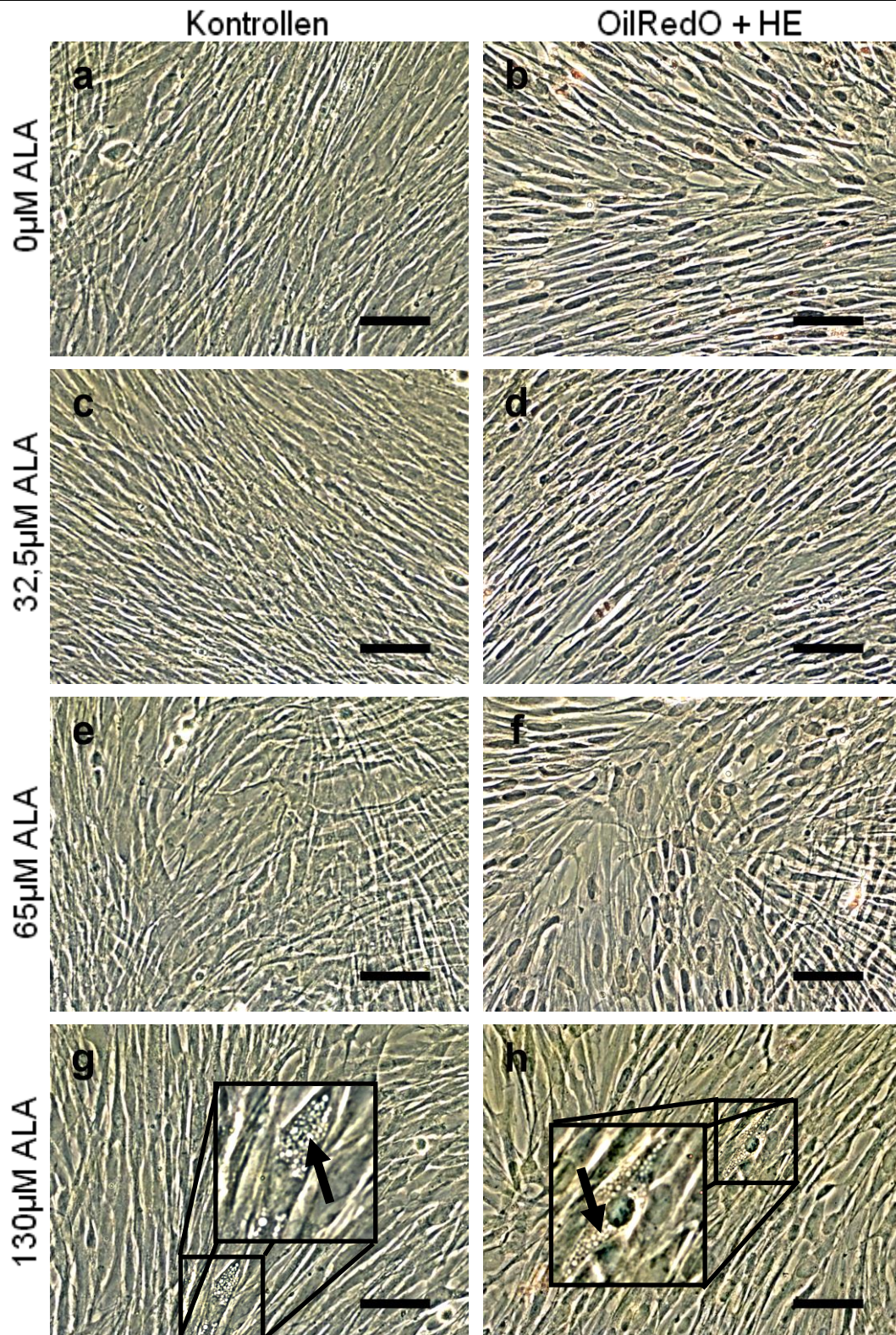


Abb. 19 | OilRedO-/HE-Färbung von OMYsd1x Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Dargestellt sind OMYsd1x Zellen in Passage 35 kultiviert mit zusätzlichen 32,5 μ M, 65 μ M bzw. 130 μ M ALA, die mit OilRedO und Hämatoxylin (HE) angefärbt wurden. Die Zellen der Abb. g und h zeigen vereinzelt tröpfchenförmige morphologische Veränderungen, die sich nicht mit OilRedO anfärben ließen (Pfeile). Maßstabsbalken = 50 μ m.

ALA: α -Linolensäure, HE: Hämatoxylin

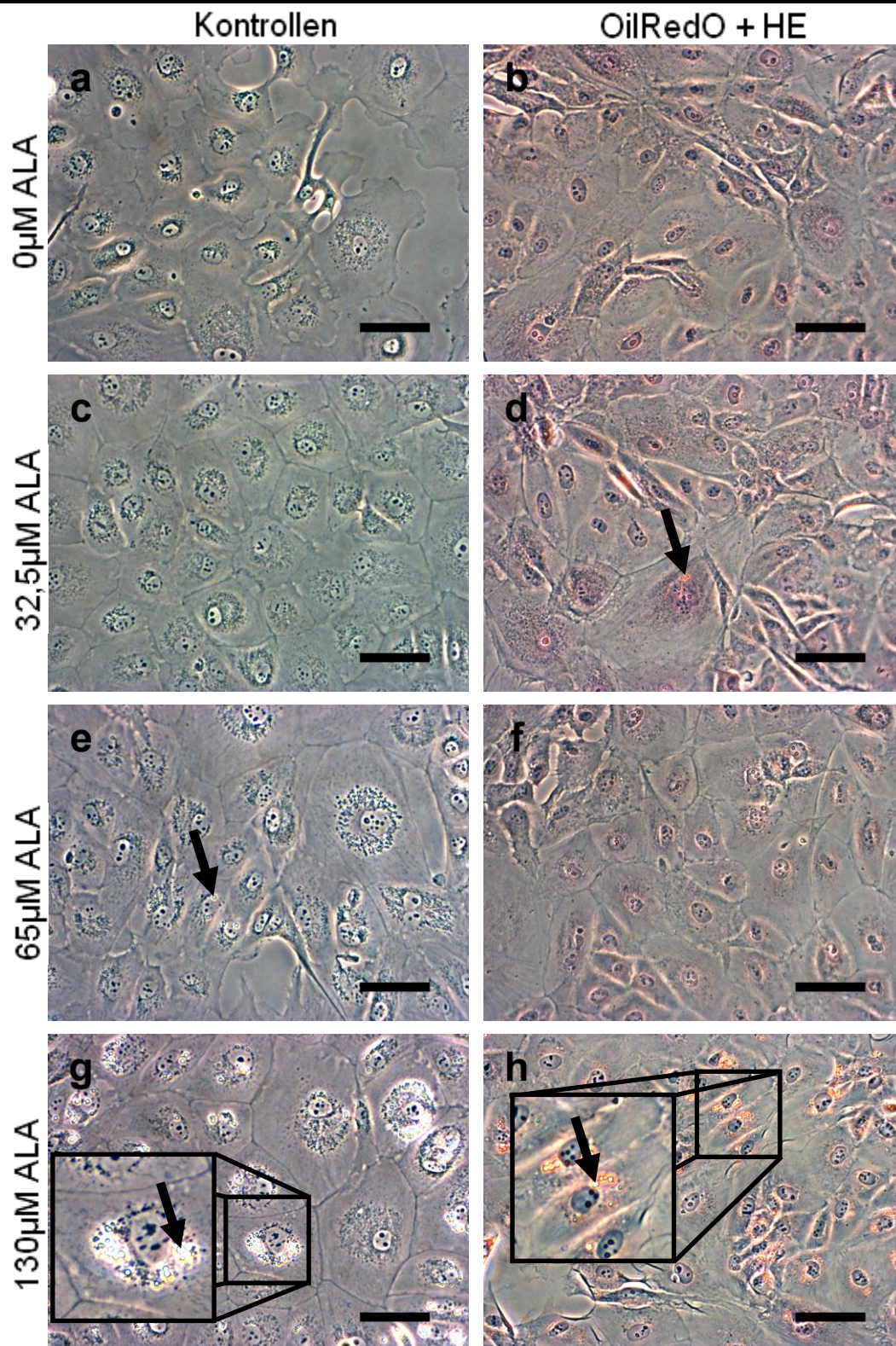


Abb. 20 | OilRedO-/HE-Färbung von AOXlar7 Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Dargestellt sind AOXlar7 Zellen in Passage 34 kultiviert mit zusätzlichen 32,5 μM , 65 μM bzw. 130 μM ALA und angefärbt mit OilRedO und Hämatoxylin (HE). Bei den Zusätzen von 32,5 μM bzw. 65 μM ALA zeigen sich vereinzelt kernnah lokalisierte tröpfchenförmige Veränderungen (d, e, Pfeil), wohingegen ein Zusatz von 130 μM ALA in den meisten Zellen zu tröpfchenförmige Veränderungen führt (g, Pfeil). Diese konnten mit OilRedO positiv angefärbt werden (h, Pfeil). Maßstabsbalken = 50 μm .

ALA: α -Linolensäure, HE: Hämatoxylin

3.1.4 Messung der relativen Lipidperoxidation

Um die relative Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren in den Zellen zu bestimmen, wurde der Farbstoff DPPP ausgewählt und die Fluoreszenzintensität des gebildeten DPPP-O gemessen. Dafür wurden die OMYsd1x Zellen vorerst unter Normalbedingungen (20 °C) bis zur Konfluenz kultiviert und die erste Messung vorgenommen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Lipidperoxidation durch den Zusatz an ALA ansteigt. Trotz vergleichsweise großer Standardabweichung innerhalb einer Gruppe konnte ein konzentrationsabhängiger, aber nicht linearer Trend der Lipidperoxidation erkannt werden. Bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen erhöhte sich die Lipidperoxidation entsprechend der jeweiligen ansteigenden Zusätze um den Faktor 1,30, 1,34 und 1,75. Im Anschluss daran wurde die Kultivierungstemperatur sequenziell reduziert, die Kultivierung fortgesetzt und die zweite Messung vorgenommen. Auch hierbei zeigte sich ein vergleichbarer konzentrationsabhängiger Trend der Lipidperoxidation. Bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen erhöhte sich die Lipidperoxidation entsprechend der steigenden Zusätze an ALA um den Faktor 1,11, 1,13 und 1,34. Aufgrund voneinander abweichender geräteinterner Verstärkungen konnte der Temperatureffekt auf die relative Lipidperoxidation nicht abschließend ermittelt werden. In der Abb. 21 sind die relativen Lipidperoxidationen von OMYsd1x Zellen bei 20 °C und 10 °C in Abhängigkeit des Zusatzes an ALA im Zellkulturmedium dargestellt.

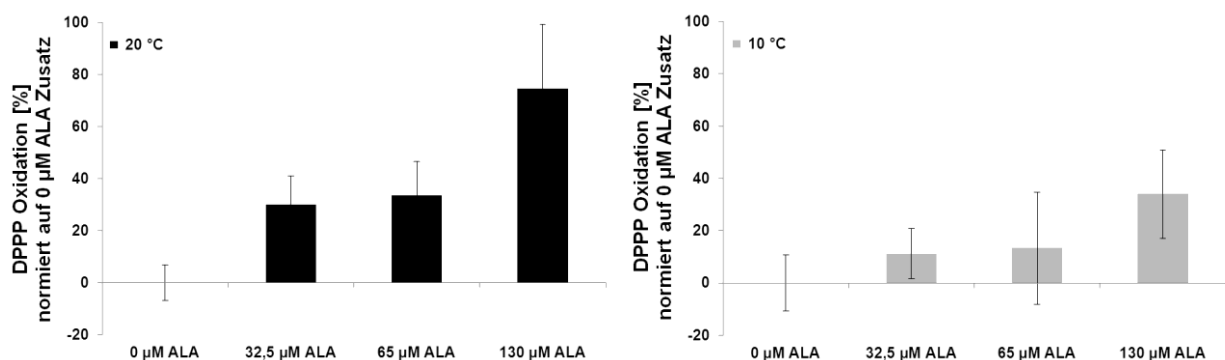


Abb. 21 | Relative Lipidperoxidation von OMYsd1x Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Dargestellt ist die prozentuale relative Lipidperoxidation (%) der OMYsd1x Zellen in Passage 38 bezogen auf den Zusatz an ALA (32,5 µM, 65 µM bzw. 130 µM) bei normaler (a; 20 °C, schwarze Balken) und reduzierter Kultivierungstemperatur (b; 10 °C, graue Balken) gemessen als DPPP-Oxid. Die Messwerte sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung (n = 4) normiert auf den Messwert der entsprechenden unbehandelten Kontrollzellen (0 µM ALA).

ALA: α -Linolensäure, DPPP: Diphenyl-1-pyrenylphosphin

3. Ergebnisse

Bei den AOXlar7 Zellen wurde ebenfalls die relative Lipidperoxidation mittels DPPP bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die relative Lipidperoxidation der AOXlar7 Zellen, welche unter Normalbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert wurden, annähernd exponentiell zunahm. Bei einem Zusatz von 65 μM ALA erhöhte sich, bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen, die relative Lipidperoxidation in den Zellen um den Faktor 1,49, bei 130 μM betrug dieser 3,18. Der niedrigste Zusatz an ALA war davon allerdings ausgenommen. Im Vergleich zu den Zellen, die ohne zusätzliche ALA kultiviert wurden, reduzierte sich durch den Zusatz von 32,5 μM ALA die relative Lipidperoxidation um einen Faktor von 1,18. Die anschließende sequenzielle Reduktion der Kultivierungstemperatur auf 15 °C gefolgt von einer Fortführung der Kultivierung führte zu einer Reduktion der relativen Lipidperoxidation. Bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen konnte in allen untersuchten Zellen eine geringere relative Lipidperoxidation gemessen werden. Vergleicht man die erhaltenen Messwerte mit dem der Kontrollzellen, so wurde bei den Zusätzen von 32,5 μM und 65 μM ALA eine Reduktion um den Faktor 1,08 bzw. 1,23 beobachtet. Bei dem Zusatz von 130 μM war die Lipidperoxidation auf gleichem Niveau, wie bei den unbehandelten Kontrollzellen. Die erhaltenen Messwerte sind in der Abb. 22 dargestellt.

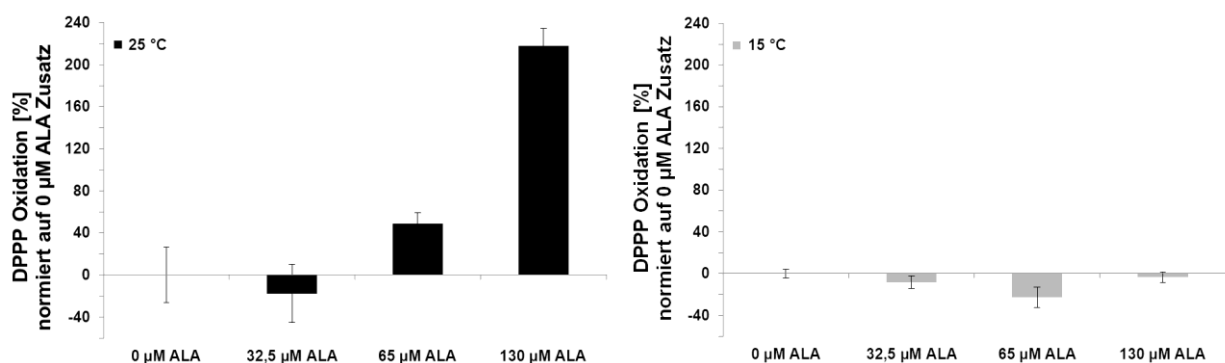


Abb. 22 | Relative Lipidperoxidation von AOXlar7 Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Dargestellt ist die prozentuale relative Lipidperoxidation (%) der AOXlar7 Zellen in Passage 53 bezogen auf den Zusatz an ALA (32,5 μM , 65 μM bzw. 130 μM) bei normaler (a; 25 °C, schwarze Balken) und reduzierter Kultivierungstemperatur (b; 15 °C, graue Balken) gemessen als DPPP-Oxid. Die Messwerte sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung ($n = 4$) normiert auf den Messwert der entsprechenden unbehandelten Kontrollzellen (0 μM ALA).

ALA: α -Linolensäure, DPPP: Diphenyl-1-pyrenylphosphin

3.1.5 Wachstumsanalyse von Langzeit-Fischzellkulturen

Für die Verwendung von *in vitro* kultivierten Fischzellen als Fischmehlersatz oder Futtermittelzusatz würden große Mengen an Zellen benötigt werden. Daher sollte das Wachstumsverhalten von OMYsd1x und AOXlar7 Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 nähergehend untersucht werden.

Bei den OMYsd1x Zellen war das Wachstum zu Beginn identisch. Am 3. Tag nach der Einsaat war die Zellzahl der Zellen in Passage 20 mit 6.210 Zellen / cm² rund 30 % niedriger als die der Passage 40 und 60, deren Wachstum bis zum 5. Tag identisch war. Erst ab dem 6. Tag nach der Einsaat war die Zellzahl der Zellen in Passage 60 mit 29.400 Zellen / cm² etwa 20 % höher als die in Passage 40. In den folgenden sechs Kultivierungstagen stieg die Zellzahl in Passage 60 deutlich schneller an als die der niedrigeren Passagen. Nach der 12-tägigen Dauerkultivierung von OMYsd1x Zellen wurden in Passage 60 rund 93.000 Zellen / cm² gezählt, in Passage 40 und 20 waren es 47.000 Zellen / cm² bzw. 25.000 Zellen / cm². In der Abb. 23 sind die Zellzahlen von OMYsd1x Zellen in den untersuchten Passagen als Wachstumskurven dargestellt.

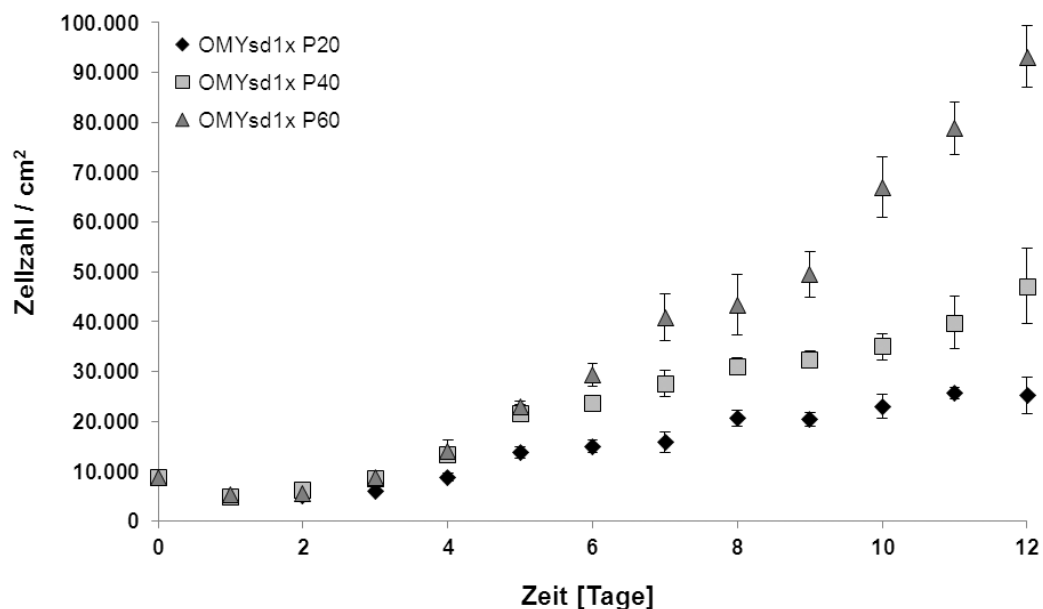


Abb. 23 | Wachstumsverhalten von OMYsd1x Zellen in Abhängigkeit von der Passagenzahl. Gezeigt ist das Zellwachstum von OMYsd1x Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 über einen Zeitraum von 12 Tagen. Dabei erfolgte keine Subkultivierung bei Erreichen einer konfluenten Zellkultur. Die dargestellten Zellzahlen sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung (n = 3).

3. Ergebnisse

Nach Beendigung der 12-tägigen Dauerkultivierung wurden die unterschiedlichen OMYSd1x Zellkulturen mikroskopisch beurteilt (Abb. 24). In Passage 20 wuchsen die Zellen weitestgehend als Zellmonolayer. Allerdings wurden bei diesen Zellen vereinzelt Bereiche beobachtet, die im Phasenkontrast heller erschienen. Die genauere Betrachtung zeigte, dass es sich dabei um Zellen handelt, die offensichtlich begannen, ihre direkten Nachbarn zu überwachsen, wodurch Zellmultilayer entstanden. Die Zellen in Passage 40 wuchsen deutlich dichter als die Zellen in Passage 20. Zusätzlich wurde ebenfalls eine Zunahme der Bereiche mit Zellmultilayern beobachtet. Bei den Zellen in Passage 60 wurden kaum noch Zellen erkannt, die nicht von ihren unmittelbaren Nachbarn überwachsen wurden. Der Zellrasen glich einem mehrlagigen Geflecht aus Zellen.

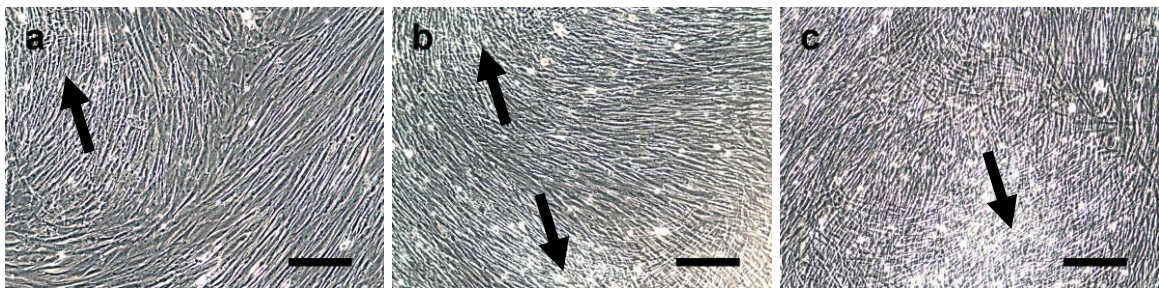


Abb. 24 | Übersichtsaufnahmen von OMYSd1x Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 am 12. Tag nach der Einsaat. Die Zellen in Passage 20 wachsen weitestgehend als Zellmonolayer, nur wenige Zellen im oberen linken Bereich beginnen ihre direkten Nachbarn zu überwachsen, wodurch Zellmultilayer entstehen (a, Pfeil). Die Zellen in Passage 40 wachsen deutlich dichter als die in Passage 20 und zeigen ebenfalls Bereiche mit Zellmultilayern (b, Pfeile). Bei den Zellen in Passage 60 sind die Zellmultilayer wesentlich ausgeprägter, deutlich erkennt man sehr helle Bereiche innerhalb der Zellkultur, die auf eine mehrlagige Schichtung der Zellen hinweisen (c, Pfeil). Der Maßstabsbalken entspricht 100µm.

Neben den Wachstumskurven wurde zusätzlich die relative Anzahl mitotischer Zellen abgeschätzt. Dafür wurden OMYSd1x Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 am 4. Tag nach der Einsaat mit 7-AAD gefärbt und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Bei den Zellen in Passage 20 war das Dichtediagramm relativ homogen verteilt, weshalb eine Abschätzung des Anteils mitotischer Zellen nicht vorgenommen werden konnte. Bei den Zellen in Passage 40 hingegen, zeigten sich zwei voneinander getrennte und unterschiedlich große Regionen (*M1* und *M2*), welche bei den Zellen in Passage 60 wesentlich deutlicher voneinander abgegrenzt waren. Bei der Darstellung als Histogramm konnte beobachtet werden, dass in dieser Region ein zusätzlicher Peak entstand. Anhand dieser Regionen erfolgte die Zuordnung der mitotischen Zellen. Die

3. Ergebnisse

Zellen der Region *M1*, deren geometrisches Mittel bei 248 lag, wurden als nicht mitotische Zellen (G_1 - bzw. G_0 -Phase) definiert. Demzufolge sollte das geometrische Mittel der mitotischen Zellen (G_2 -Phase bzw. Mitose) im Idealfall einen verdoppelten Wert, also 496 erreichen. Mit 487 entsprach das geometrische Mittel der Region *M2* einem nahezu verdoppelten Chromosomensatz (Faktor 1,96), wodurch die Region *M2* den mitotischen Zellen zugeordnet werden konnte. Zudem konnte besonders bei den Zellen in Passage 60 eine dritte Region oberhalb der Region *M2* beobachtet werden. In der Abb. 25 sind die Histogramme bzw. deren Dichtediagramme der FACS-Analyse dargestellt.

Die relative Quantifizierung der mitotischen Zellen ergab für die Passage 60 einen Anteil von rund 14 %, bei den Zellen in Passage 40 waren es rund 13 %. Für die Zellen in Passage 20 wurde der Anteil mitotischer Zellen auf rund 9 % geschätzt.

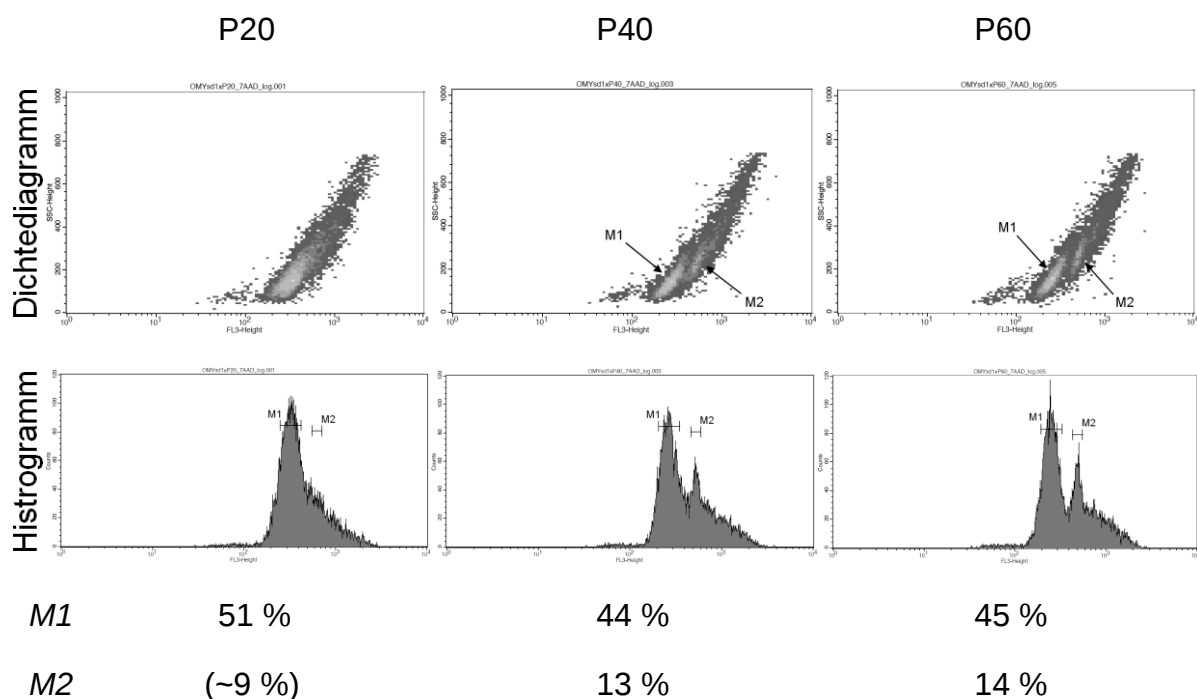


Abb. 25 | Relative Anzahl mitotischer OMYSd1x Zellen in den Passagen 20, 40 und 60. Dargestellt sind die FACS-Histogramme der OMYSd1x Zellen gefärbt mit 7-AAD. Bei den Dichtediagrammen ist die Fluoreszenzintensität von 7-AAD gegen die Granularität aufgetragen, bei den Histogrammen gegen die Anzahl der Ereignisse. In den Dichtediagrammen der Passagen 40 und 60 sind zwei voneinander getrennte Zellpopulationen zu erkennen (Pfeile). Diese wurden entsprechend dem Zellzyklus als Region *M1* (G_1 - / G_0 -Phase) bzw. *M2* (G_2 -Phase / Mitose) definiert. Anhand der Histogramme konnte der Flächeninhalt dieser Regionen bestimmt und die relative Anzahl der Zellen bestimmt werden. Bei den Zellen in Passage 20 wurde die Anzahl der mitotischen Zellen annäherungsweise abgeschätzt. Die relativen Verteilungen der Regionen *M1* und *M2* sind in der Tabelle den Passagen entsprechend zugeordnet.

7-AAD: 7-Aminoactinomycin D, FACS: Durchflusszytometer

3. Ergebnisse

In Analogie zu den untersuchten Wachstumsparametern von OMYsd1x Zellen wurden AOXlar7 Zellen analysiert. Aufgrund der kürzeren Verdopplungszeit von AOXlar7 Zellen betrug die Gesamtkultivierungsdauer lediglich acht Tage. Innerhalb der ersten 48 Stunden verhielten sich die Zellen der unterschiedlichen Passagen identisch. Am 3. Tag nach der Einsaat wurde bei den Zellen in Passage 60 mit 15.750 Zellen / cm² die höchste Zellzahl bestimmt. Am 4. Tag nach der Einsaat wurden bei den Zellen in Passage 20 mit 13.000 Zellen / cm² die geringste Zellzahl gezählt, die der Passagen 40 und 60 erreichten 20.000 Zellen / cm² bzw. 29.000 Zellen / cm². Ab diesem Zeitpunkt stiegen die Zellzahlen der Passagen 20 und 40 moderat an, während die in Passage 60 stark anwuchs. Am 8. Tag bzw. dem Ende der Kultivierung wurden rund 24.000 Zellen / cm² in Passage 20 gezählt, bei den Zellen in Passage 40 waren es 41.000 Zellen / cm² bzw. 106.000 Zellen / cm² in Passage 60. In der Abb. 26 sind die Wachstumskurven der AOXlar7 Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 dargestellt.

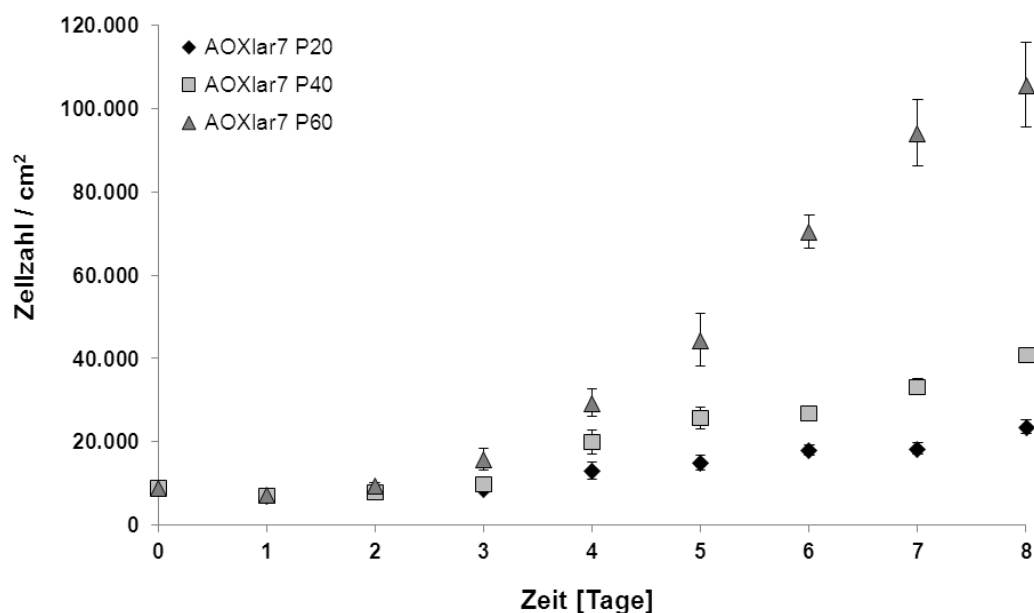


Abb. 26 | Wachstumsverhalten von AOXlar7 Zellen in Abhängigkeit von der Passagenzahl. Gezeigt ist das Zellwachstum von AOXlar7 Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 über einen Zeitraum von acht Tagen. Dabei erfolgte keine Subkultivierung bei Erreichen einer konfluenten Zellkultur. Die dargestellten Zellzahlen sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung ($n = 3$).

Nach der 8-tägigen Kultivierung der AOXlar7 Zellen in Passage 20, 40 und 60 wurden die Zellkulturen mikroskopisch aufgenommen. Deutlich war zu erkennen, dass die

3. Ergebnisse

Zellen der Passagen 20 und 40 ausschließlich als Zellmonolayer wuchsen. Die Zellen in Passage 40 wuchsen allerdings dichter. Demgegenüber war die Dichte des Zellrausens bei den AOXlar7 Zellen in Passage 60 deutlich höher als die in Passage 40. Hierbei wurde beobachtet, dass die Zellen so dicht beieinander lagen, dass teilweise nicht zu unterscheiden war, ob sie nebeneinander oder übereinander wuchsen. In der Abb. 27 sind die AOXlar7 Zellen der Passagen 20, 40 und 60 am 8. Tag nach der Einsaat dargestellt.

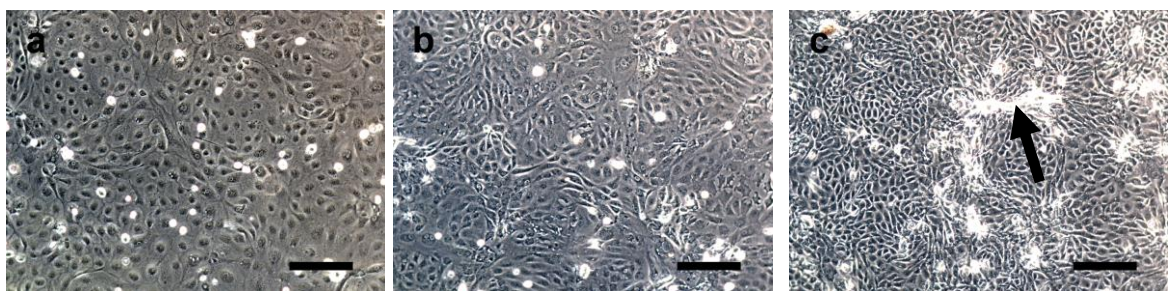


Abb. 27 | Übersichtsaufnahmen von AOXlar7 Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 am 8. Tag nach der Einsaat. Die AOXlar7 Zellen wuchsen fast ausschließlich in Zellmonolayern, deren Dichte mit steigender Passagenzahl zunahm. Bei den Zellen in Passage 20 (a) und 40 (b) sind im konfluenten Stadium keine Zellmultilayer zu beobachten. Bei den Zellen in Passage 60 ist zu erkennen, dass die Zellen sehr kompakte und hell erscheinende Bereiche bilden, in denen einzelne Zellen nicht mehr unterschieden werden können (c, Pfeil). Der Maßstabsbalken entspricht 100µm.

Bei den AOXlar7 Zellen wurde gleichfalls, allerdings am 3. Tag nach der Einsaat eine Färbung der Zellen mit 7-AAD durchgeführt. Das Dichtediagramm der Zellen in Passage 20 zeigte eine homogen verteilte Region. Auch bei den Zellen in Passage 40 wurde lediglich eine Region erkannt, die dezent in zwei langgestreckte Regionen getrennt war. Wegen der nicht eindeutigen Zuordnung der Regionen *M1* und *M2* konnte der relative Anteil der mitotischen Zellen bei den AOXlar7 Zellen in Passage 20 und 40 nicht vorgenommen werden. Bei den Zellen in Passage 60 wurden teilweise überlappende Regionen beobachtet. Die geometrischen Mittelwerte dieser Regionen lagen bei 234 (*M1*, G_1 - bzw. G_0 -Phase) bzw. 424 (*M2*, G_2 -Phase bzw. Mitose), welche mit einem Faktor von 1,81 annäherungsweise einem verdoppelten Chromosomensatz entsprachen. Im Rahmen der relativen Quantifizierung wurde für den mitotischen Anteil der AOXlar7 Zellen ein annäherungsweise steigender Trend bei zunehmenden Passagenzahlen festgestellt (siehe Abb. 28).

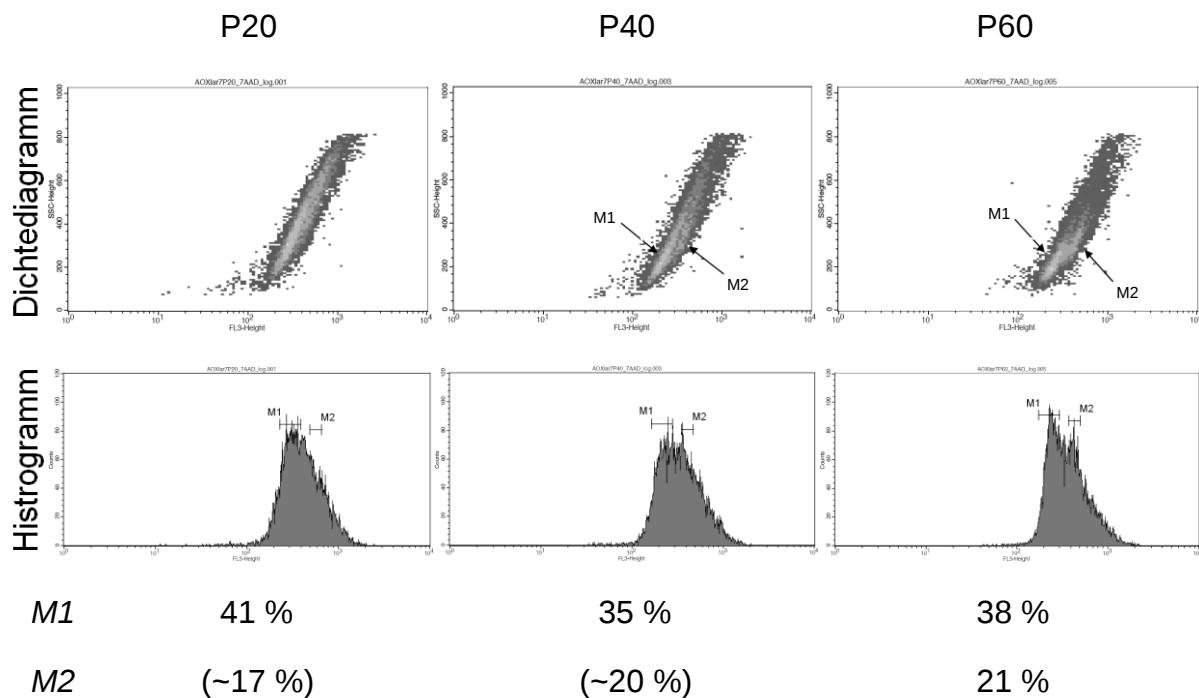


Abb. 28 | Relative Anzahl mitotischer AOXlar7 Zellen in den Passagen 20, 40 und 60. Dargestellt sind die FACS-Histogramme der AOXlar7 Zellen gefärbt mit 7-AAD. Bei den Dichtediagrammen ist die Fluoreszenzintensität von 7-AAD gegen die Granularität aufgetragen, bei den Histogrammen gegen die Anzahl der Ereignisse. Die Dichtediagramme der untersuchten Passagen zeigen keine eindeutig voneinander getrennten Zellpopulationen. Anders als bei der Passage 20 sind in den Passagen 40 und 60 zwei relativ stark überlappende Regionen zu erkennen (Pfeile). Anhand der Passage 60 wurden die zwei Regionen M1 (G_1 - / G_0 -Phase) und M2 (G_2 -Phase / Mitose) annäherungsweise abgeschätzt, entsprechend dem Zellzyklus zugeordnet und in die Histogramme der Passagen 20 und 40 übertragen. Die daraus resultierenden relativen Verteilungen der Regionen M1 und M2 sind in der Tabelle darunter aufgelistet.

7-AAD: 7-Aminoactinomycin D, FACS: Durchflussszytometer

3.2 Zellkultur scale-up und Biomasseproduktion von AOXlar7 Zellen

Ausgehend von den Erkenntnissen des biologischen Teils, sollte in dem vorliegenden technologischen Teil dieser Arbeit überprüft werden, inwieweit sich AOXlar7 Zellen in einen automatisierten und technisch kontrollierten Kultivierungsprozess überführen lassen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die AOXlar7 Zellen überwiegend in Zellkulturflaschen mit 150 cm² Wachstumsoberfläche kultiviert. Unter diesen Kultivierungsbedingungen ist die Verwertung dieser Zellen, z.B. als Fischmehlersatz bzw. Futtermittelzusatz, unter ökonomischen Gesichtspunkten ausgeschlossen. Für die Bio-

massekultivierung standen zwei Bioreaktorsysteme zur Verfügung, die in dem vorliegenden technologischen Teil dieser Arbeit mit AOXlar7 Zellen kultiviert wurden.

3.2.1 Kultivierung von AOXlar7 Zellen im BioLevigator™

Für die Kultivierung von AOXlar7 Zellen im BioLevigator™ wurden gelatinebeschichtete GEM™ vorgelegt und mit einer Zellsuspension inokuliert (2.2.2.1). Da bisher keinerlei Erfahrungen einer Kultivierung von AOXlar7 Zellen auf suspendierten GEM™ vorlagen, wurden vor der eigentlichen Kultivierung verschiedene Inokulationsbedingungen untersucht. Aus diesen Vorversuchen ging hervor, dass sich die gelatinebeschichteten GEM™ zwar erfolgreich mit AOXlar7 Zellen besiedeln lassen, die erwartete Zellzahl lag jedoch deutlich unterhalb der, wie sie üblicherweise bei Säugetierzellen beobachtet werden konnte. Aus diesen Erfahrungswerten wurde zum einen die Inokulationsdauer verlängert und zum anderen die Rotationsgeschwindigkeit reduziert.

Ausgehend von diesen Inokulationsvorversuchen, wurden die AOXlar7 Zellen auf gelatinebeschichtete GEM™ mit einer Wachstumsoberfläche von rund 100 cm^2 ($250 \text{ } \mu\text{l}$ GEM™) bzw. rund 50 cm^2 ($125 \text{ } \mu\text{l}$ GEM™) inokuliert und über einen Zeitraum von 21 Tagen in Suspension kultiviert. Die dabei erhaltenen Zellzahlen sind in der Abb. 29 graphisch dargestellt. Bei den GEM™ mit einer Wachstumsoberfläche von 100 cm^2 wurden am Ende des Inokulationsprotokolls $15.521 \text{ Zellen / cm}^2$ gezählt. Während der gesamten Kultivierungsdauer betrug die mittlere Zellzahl $14.304 \text{ Zellen / cm}^2$ und blieb damit konstant zwischen $10.000 \text{ Zellen / cm}^2$ und $20.000 \text{ Zellen / cm}^2$. Ausgenommen davon war lediglich der Ausreißer am 7. Tag, an dem eine Zellzahl von $27.305 \text{ Zellen / cm}^2$ gezählt wurde. Am Ende der Kultivierung wurden auf den GEM™ nur noch $1.916 \text{ Zellen / cm}^2$ gezählt.

Bei den GEM™ mit einer Wachstumsoberfläche von rund 50 cm^2 wurde am Ende des Inokulationsprotokolls hingegen eine Zellzahl von $51.162 \text{ Zellen / cm}^2$ gezählt. In den folgenden fünf Tagen reduzierte sich diese Zellzahl um 66 % auf $17.246 \text{ Zellen / cm}^2$ und blieb daraufhin über ca. acht Tage relativ konstant. Erst am 21. Tag bzw. am Ende der Kultivierung erhöhte sich die Zellzahl leicht auf $25.868 \text{ Zellen / cm}^2$. Über den gesamten Kultivierungszeitraum betrachtet betrug die Zellzahl im Mittel $27.839 \text{ Zellen / cm}^2$.

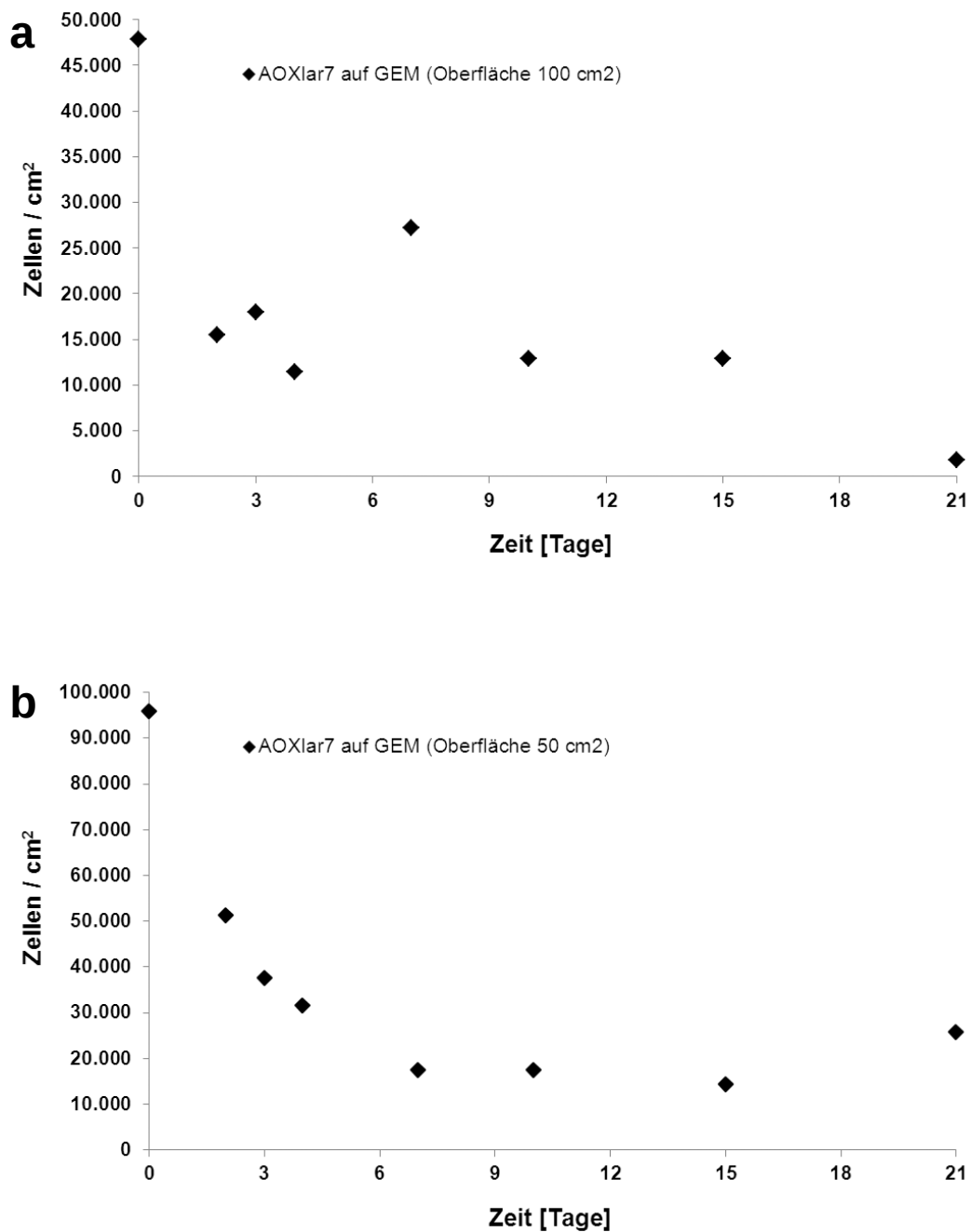


Abb. 29 | Suspensionszellkultur von AOXlar7 im BioLevigator™. Abgebildet ist das Wachstumsverhalten von AOXlar7 Zellen in Passage 29 auf GEM™ als Suspensionszellkultur. 5×10^6 Zellen wurden auf gelatinebeschichtete GEM™ mit einer Gesamtoberfläche von rund 100 cm² (a) bzw. rund 50 cm² Wachstumsoberfläche (b) inokuliert und über einen Zeitraum von 21 Tagen im BioLevigator™ kultiviert.

GEM™: Global Eukaryotic Microcarrier

Neben den Wachstumskurven wurden zusätzlich mikroskopische Aufnahmen der GEM™ aufgenommen. Die Abb. 30 zeigt einen Ausschnitt der GEM™, welche mit AOXlar7 Zellen besiedelt und insgesamt 21 Tage im BioLevigator™ kultiviert wurden.

Deutlich ist zu erkennen, dass nur wenige der enthaltenen GEMTM mit AOXlar7 Zellen besiedelt waren. Der Großteil der übrigen GEMTM trug keine erkennbaren Zellen.

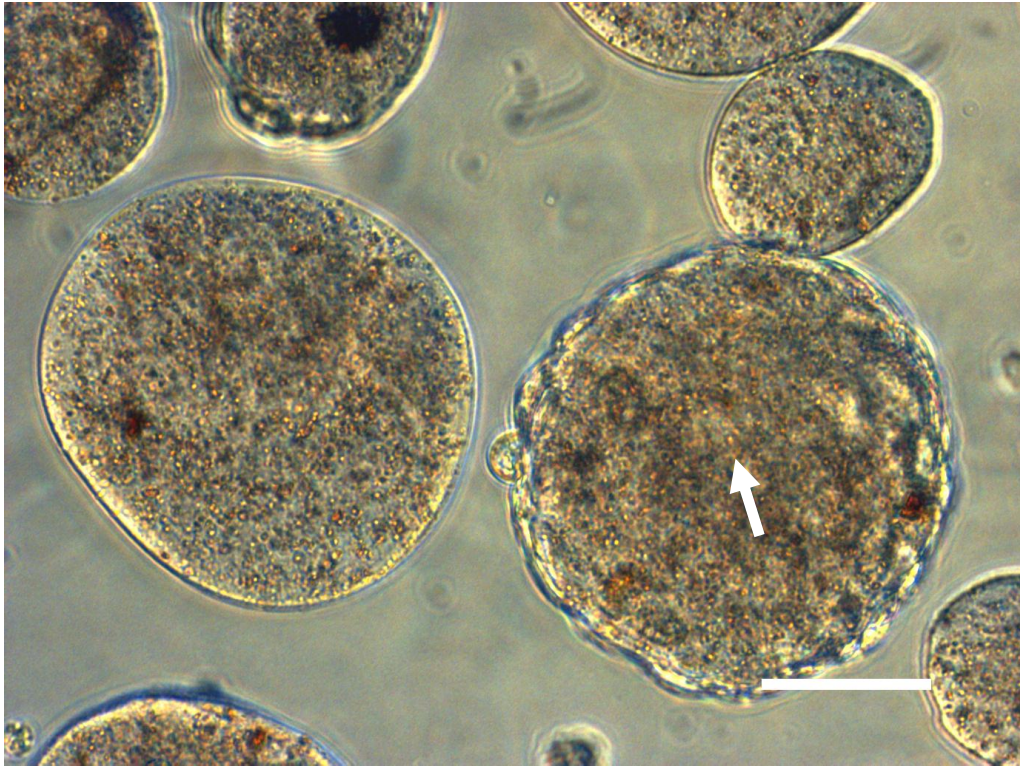


Abb. 30 | AOXlar7 Zellen auf GEMTM. Dargestellt sind gelatinebeschichtete GEMTM, welche mit AOXlar7 Zellen in Passage 29 inokuliert und insgesamt 21 Tage im BioLevigatorTM kultiviert wurden. In dem rechten Teil der Abbildung ist ein voll bewachsener GEMTM zu erkennen (Pfeil), alle übrigen tragen keine Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.
GEMTM: Global Eukaryotic Microcarrier

3.2.2 Kultivierung von AOXlar7 im Z®RP breeder

Für die Kultivierung der AOXlar7 im Z®RP breeder waren Sponceram® Scheiben vorgesehen. In einem Vorversuch sollte daher untersucht werden, welche der verschiedenen Sponceram® Herstellungsarten für die Kultivierung von AOXlar7 Zellen am geeignetsten war. Dafür sollten unterschiedliche Sponceram® Discs mit verschiedenen Konzentrationen einer AOXlar7-Zellsuspension inokuliert und kultiviert werden. Die Bestimmung der Anzahl der Zellen erfolgte dabei indirekt durch die Messung der Stoffwechselaktivität der Zellen. Hierfür wurden vorerst AOXlar7 Zellen auf herkömmlichen Zellkulturoberflächen kultiviert und anschließend vier Stunden mit dem MTT-Medium inkubiert. Dabei wurde festgestellt, dass ein annähernd linearer Zusammen-

hang zwischen der ermittelten Zellzahl und der gebildeten Menge an Formazan besteht ($R^2 = 0,986$, Abb. 31 a). Aufgrund dessen konnte die Zellzahl der AOXlar7 Zellen mit dem MTT-Assay indirekt bestimmt werden.

Die Inokulation unterschiedlicher Sponceram® Discs mit verschiedenen Konzentrationen einer AOXlar7-Zellsuspension gefolgt von einer anschließenden, insgesamt 5-tägigen Kultivierung führte zu unterschiedlichen Absorptionswerten des Formazans. Wie in der Abb. 31 b dargestellt ist, wurden alle in diesem Versuch eingesetzten getesteten Sponceram® Oberflächeneigenschaften erfolgreich mit AOXlar7 Zellen besiedelt. Dabei zeigten die Oberflächenmodifikationen 160AL-30-130 und 160AL-20-130 miteinander vergleichbare Besiedelungserfolge. Bei einer Einsaatzellzahl von 200.000 Zellen wurde für beide Oberflächenmodifikationen, entsprechend der linearen Korrelation, eine Zellzahl von rund 60.000 Zellen bestimmt. Im Vergleich dazu wurden bei der Sponceram® 160AL-20-00 deutlich höhere Absorptionen des Formazans erhalten. Bei einer Einsaatzellzahl von 100.000 und 200.000 Zellen wurden, entsprechend der linearen Korrelation, Zellzahlen von rund 55.000 bzw. 110.000 Zellen errechnet.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Oberflächenbeschaffenheit der 160AL-20-00 Keramik deutlich höhere Zellzahlen aufwies, konnte diese Sponceram® Scheibe nicht für eine Kultivierung im Z®RP *breeder* verwendet werden. Anders als in dem hier demonstrierten Inokulationsversuch, rotiert die Sponceram® Scheibe im Z®RP *breeder* während der Inokulation um die horizontale Achse. Da die 160AL-20-00 Keramik eine glänzende bzw. sehr glatte Oberfläche aufweist (Abb. 11), ist sie für eine Inokulation im Z®RP *breeder* eher ungeeignet. Daher wurde zusammen mit dem betreuenden Applikationsspezialisten der Firma Zellwerk vorerst die 160AL-30-130 Keramik für eine Kultivierung ausgewählt und mit insgesamt $1,9 \times 10^8$ Zellen, verteilt auf zwei Sponceram® Scheiben, inokuliert. Die am Ende der Kultivierung mit Giemsa gefärbten Sponceram® Scheiben trugen jedoch keine Zellen, so dass die Kultivierung im Z®RP *breeder* nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Um dennoch eine Expansion von AOXlar7 im Bioreaktor zu erreichen, wurde alternativ zu den Sponceram® Oberflächen ein horizontales Drehbett in den Z®RP *breeder* eingesetzt und mit $1,48 \times 10^8$ Zellen in Passage 50 besiedelt. Bei dieser zweidimensionalen Kultivierung wurden nach 14 Tagen $1,7 \times 10^8$ Zellen geerntet, was einem Zellwachstum von knapp 15 % entspricht.

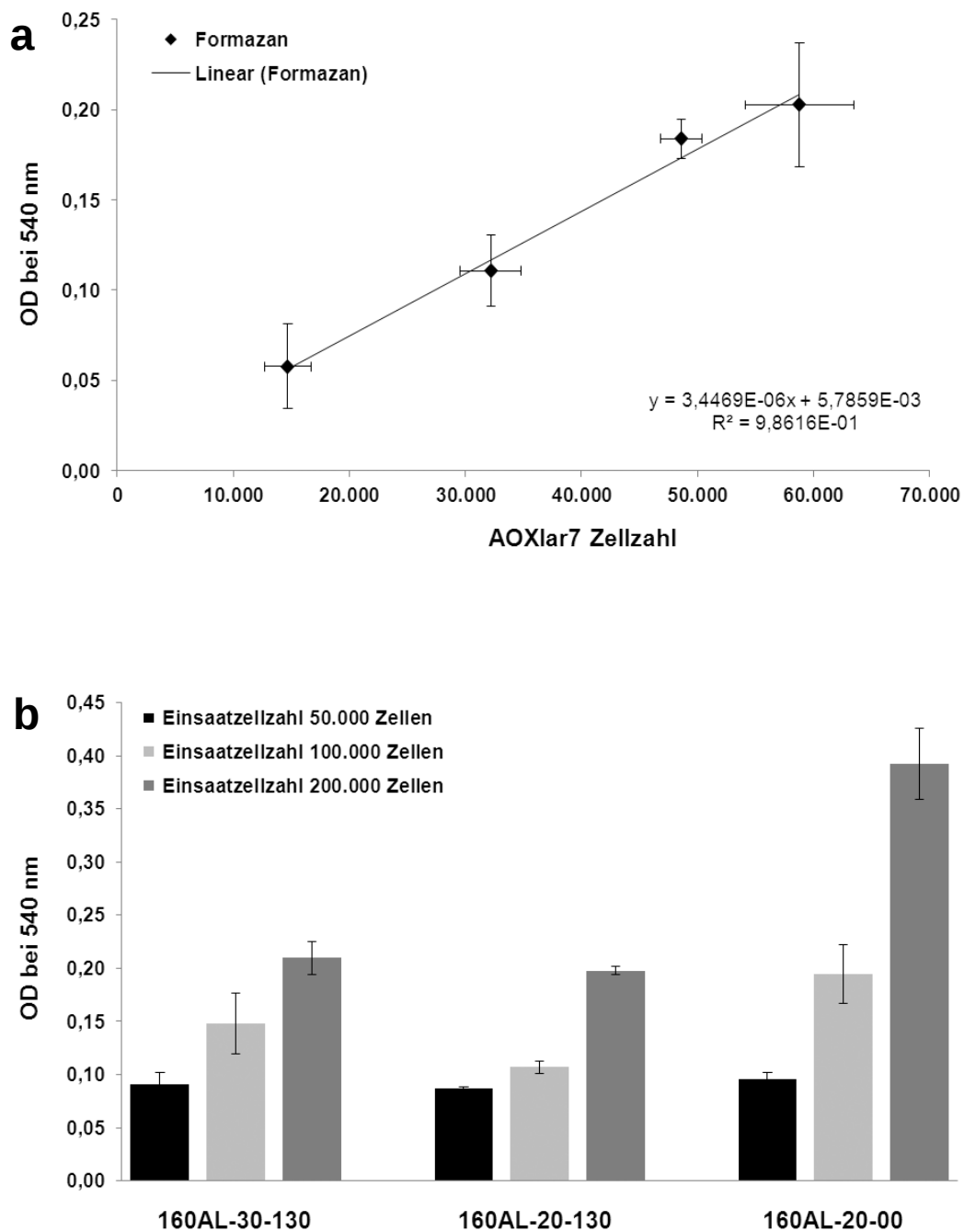


Abb. 31 | Wachstum von AOXlar7 Zellen auf unterschiedlichen Sponceram® Oberflächen. Gezeigt sind die Messergebnisse des MTT-Assays aufgetragen als Formazanabsorption (OD-Wert bei 540 nm) gegen die ermittelte Zellzahl. Die Formazanabsorption der AOXlar7 Zellen in Passage 37 zeigt einen annähernd linearen Zusammenhang mit der Zellzahl (a, $R^2 = 0,986$). Die Formazanabsorption der AOXlar7 Zellen in Passage 39 kultiviert auf Sponceram® Oberflächen ist sowohl abhängig von der eingesäten Zellzahl, als auch von dem verwendeten Sponceram® Material (b). Die angegebenen Werte sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung ($n = 3$).

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid, OD: optische Dichte

3.2.3 Entwicklung eines neuartigen Kultivierungskonzeptes

Die bis hierhin getesteten Bioreaktorsysteme waren nicht bzw. nur bedingt geeignet AOXlar7 Zellen in großen Mengen zu kultivieren. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein völlig neuartiges Kultivierungskonzept entwickelt. Als Wachstumsfläche wurden dafür Netzgewebe mit einer Maschenweite von 200 μm ausgewählt. Da bisher keinerlei Kultivierungserfahrungen auf Netzgeweben bestanden, wurde für die Methodenetablierung die robuste und schnell wachsende Rattenzellkultur Z29 verwendet. Die Besiedelung der Netzgewebe mittels suspendierter Z29 Zellen erwies sich allerdings als ungeeignet, da die Zellen durch die Netzmaschen sedimentierten und bevorzugt den Boden unterhalb des Netzgewebes besiedelten. Daher wurden die Z29 Zellen vorerst auf Glasperlen mit einem mittleren Durchmesser von 375 μm inokuliert. Bereits vier Stunden nach der Inokulation der Glasperlen wurden rund 98,5 % der eingesäten Z29 Zellen als adhärenz gezählt. In der Abb. 32 sind exemplarisch Glasperlen gezeigt, die erfolgreich mit Z29 Zellen besiedelt wurden.

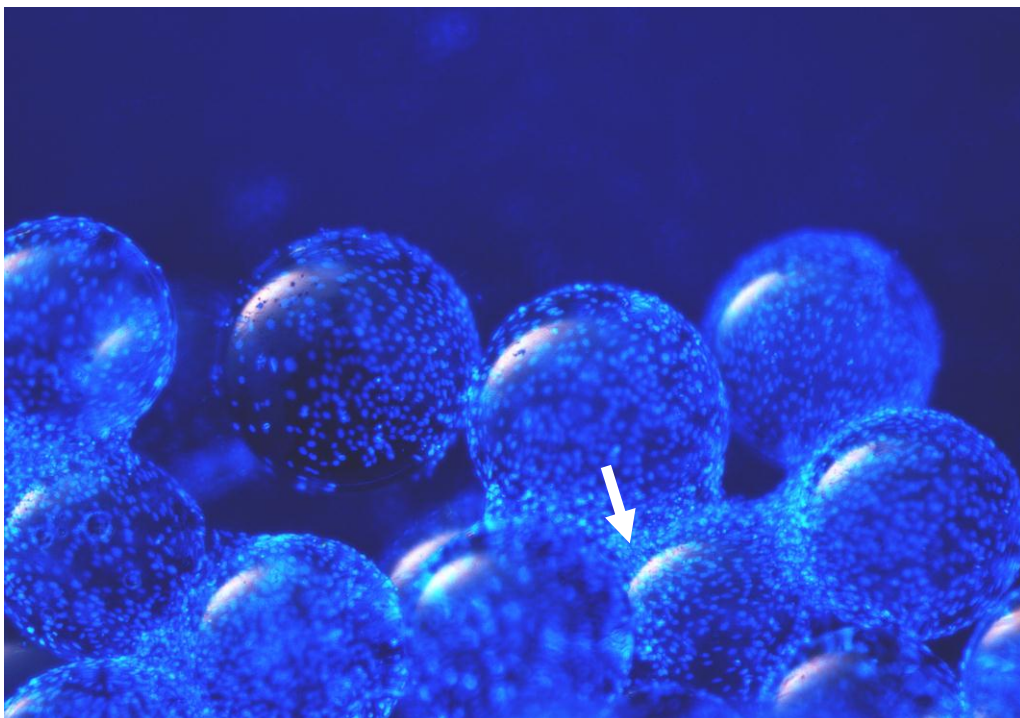


Abb. 32 | Glasperlen besiedelt mit Z29 Zellen. Dargestellt sind gelatinebeschichtete Glasperlen mit einem mittleren Durchmesser von 375 μm besiedelt mit Z29 Zellen in Passage 67 und gefärbt mit dem Kernfarbstoff DAPI. Durch den direkten Kontakt der Glasperlen untereinander haben die Zellen Quervernetzungen zwischen den Glasperlen hergestellt (Pfeil). Die Vergrößerung beträgt 62-fach.

DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Diese Glasperlen wurden anschließend durch Pipettieren auf die Netzgewebe übertragen. Genauere Untersuchungen zeigten, dass es bei dem Pipettieren zu einem Verlust der Zellen auf den Glasperlen kommt. Durch das Ansaugen der besiedelten Glasperlen und die mechanische Beanspruchung während des Pipettierens, reduzierte sich die Zellzahl um rund 44 %. Nur gut die Hälfte der ursprünglich bei der Inokulation der Glasperlen eingesäten Zellen befanden sich nach diesem Arbeitsschritt auf den Glasperlen. Ausgehend davon migrierten die Z29 Zellen von den Glasperlen auf das Netzgewebe. In der Abb. 33 ist ein Netzgewebe mit aufliegenden Glasperlen dargestellt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass sich Zellen auf den Netzstegen befinden.

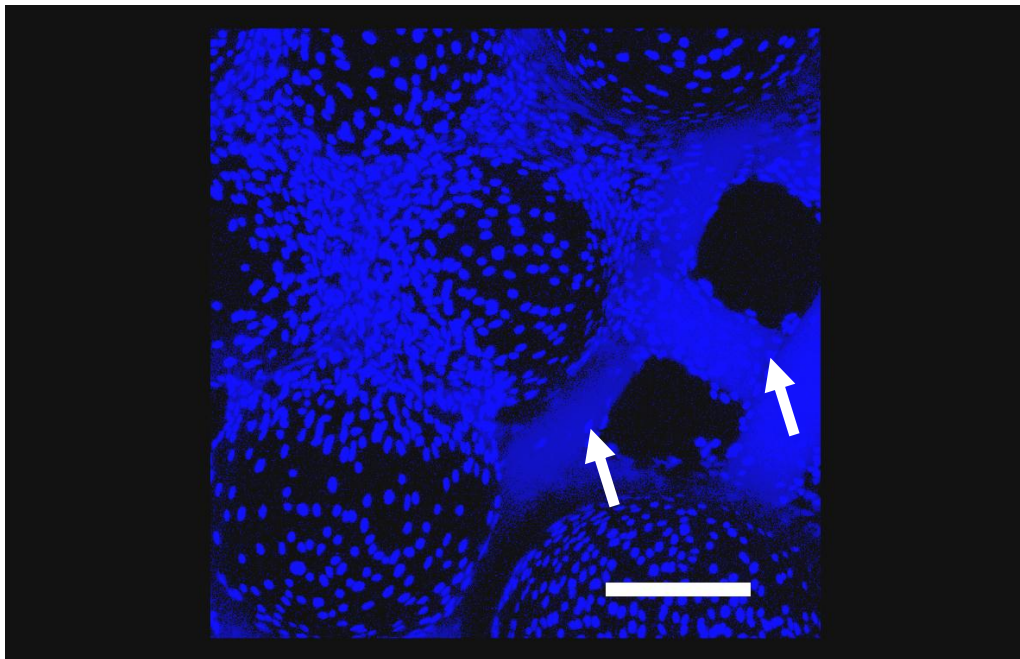


Abb. 33 | Besiedelte Glasperlen auf Netzgeweben. Gezeigt sind gelatinebeschichtete Glasperlen besiedelt mit Z29 Zellen in Passage 45, die auf ein Polyethylen-Netzgewebe pipettiert wurden. Die Zellen auf den Glasperlen migrieren auf die Netzgewebe (Pfeile). Die Zellkerne sind mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Für die maximale Ausbeute an Zellen sollte untersucht werden, wie lange die besiedelten Glasperlen auf den Netzgeweben verbleiben müssen, um eine ausreichende Anzahl an Zellen auf dem Netzgewebe zu erhalten. Nur wenn genügend Zellen von den Glasperlen auf das Netzgewebe migriert sind, kann das Netzgewebe vollständig

von den Zellen besiedelt werden. Hierfür wurden Netzgewebe mit Glasperlen inokuliert und über einen Zeitraum von insgesamt sieben Tagen kultiviert. Während dieser Inkubation wurden alle 24 Stunden von einem Teil der Netzgewebe die Glasperlen vollständig entfernt und die Netzgewebe ohne Glasperlen bis zum Erreichen des 7. Tages weiter kultiviert.

Die Zellzahlen der Zellen auf den Glasperlen und dem Wellboden unterhalb des Netzgewebes entsprachen einer üblichen Wachstumskurve. Dabei wurde beobachtet, dass die Zellzahlen der Zellen auf den Glasperlen innerhalb der ersten fünf Tage nach der Inokulation der Netzgewebe von 23.360 Zellen / cm² auf 139.580 Zellen / cm² kontinuierlich anstiegen. Ab dem 6. Tag wurde mit 113.530 Zellen / cm² eine rückläufige Zellzahl auf den Glasperlen beobachtet. Bei den Glasperlen, die nicht von den Netzgeweben entfernt wurden (7. Tag nach der Inokulation), betrug die Zellzahl auf den Glasperlen 101.300 Zellen / cm². Auf den Wellböden unterhalb der Netzgewebe wurde ein stetiger Anstieg der Zellzahlen beobachtet. Während des gesamten Kultivierungszeitraumes stieg die Zellzahl von 17.820 Zellen / cm² auf 114.790 Zellen / cm² an. Die Zellzahlen auf den Glasperlen und dem Wellboden unterhalb des Netzgewebes sind in der Abb. 34 a dargestellt.

Auf den Netzgeweben wurde beobachtet, dass bei der Abnahme der Glasperlen am ersten Tag nach der Inokulation mit rund 129.000 Zellen / cm² die höchste Zellzahl erhalten wurde. Die Entfernung der Glasperlen am Folgetag führte zu einer leichten Reduktion der Zellzahl auf 116.000 Zellen / cm². Daraufhin stieg die Zellzahl wieder an und erreichte bei einer Abnahme der Glasperlen am 4. Tag nach der Inokulation 128.000 Zellen / cm². Danach fiel die Anzahl der Zellen bis zum Ende des Experiments kontinuierlich bis auf eine Zellzahl von 92.000 Zellen / cm² ab. In der Abb. 34 b sind die Zellzahlen auf den Netzgeweben bis zum 7. Tag nach der Inokulation dargestellt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass für Z29 Zellen eine Inokulationszeit von 24 Stunden ausreichte, um die verwendeten Netzgewebe innerhalb von sechs Tagen vollständig zu bewachsen. Alle folgenden Versuche mit Z29 Zellen auf Netzgeweben wurden daher lediglich 24 Stunden mit Glasperlen inokuliert.

Um einen Eindruck von der Effektivität dieser Inokulationsmethode zu erhalten, wurden die Zellzahl der ursprünglich eingesetzten Zellsuspension und die der Netzgewebe nach 24-stündiger Inokulation gegenübergestellt. Dabei wurde festgestellt, dass sich knapp 10 % bzw. 38.000 Zellen / cm² auf den Netzgeweben befinden.

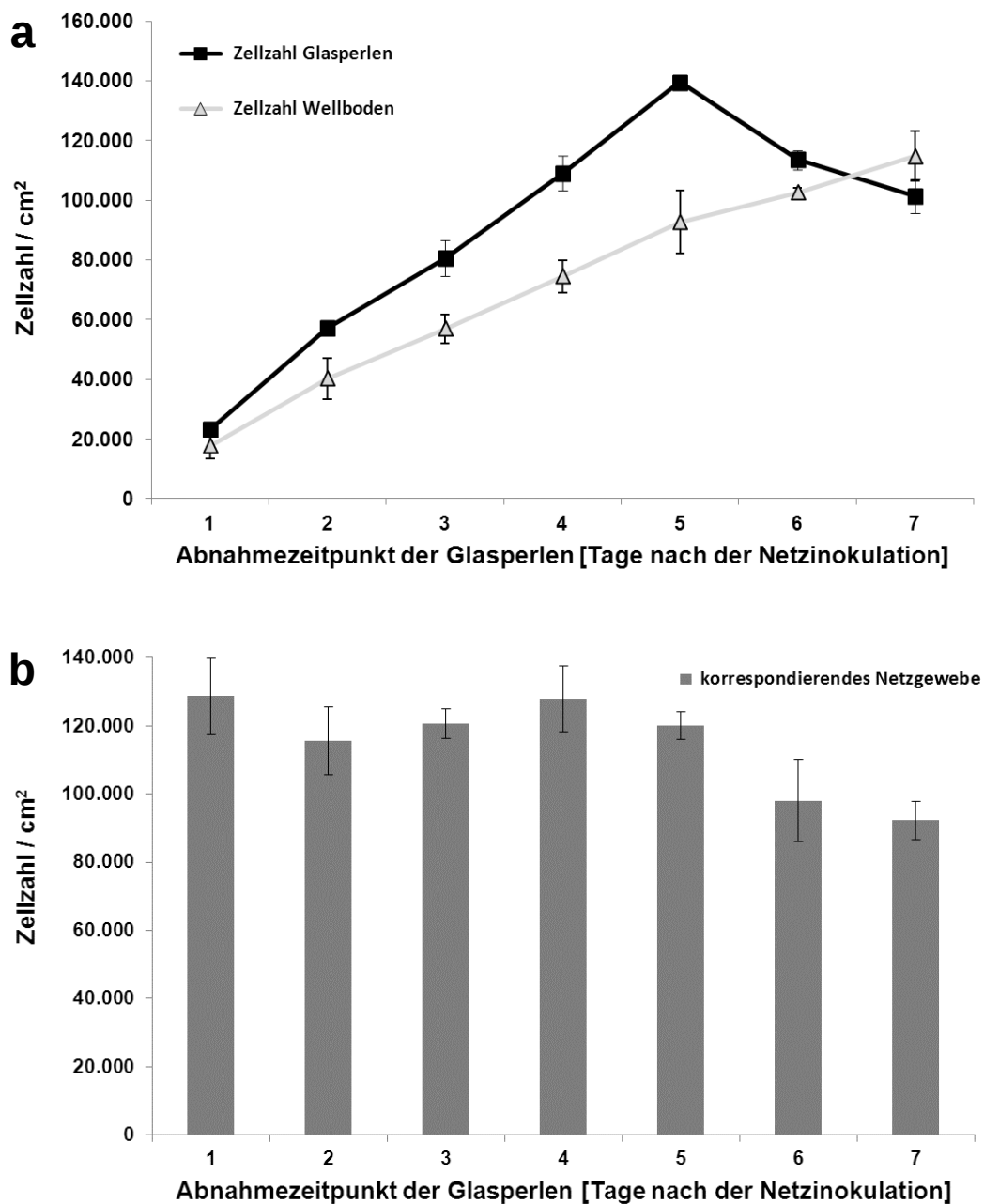


Abb. 34 | Bestimmung des optimalen Abnahmezeitpunktes der Glasperlen. Dargestellt sind die Zellzahlen (Zellen / cm²) von Z29 Zellen in Passage 58 auf sieben unterschiedlich lang inokulierten Polyethylen-Netzgeweben. Nach der Inokulation wurden täglich die Zellzahlen auf den Glasperlen und den Wellböden unterhalb der Netzgewebe bestimmt (a), die Netzgewebe allerdings weiterkultiviert. Am 7. Tag wurden dann die Zellzahlen aller Netzgewebe bestimmt (b), so dass alle Netze zwar gleich lange kultiviert, aber unterschiedlich lange inokuliert wurden. Die angegebenen Zellzahlen sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (n = 3).

Ausgehend davon sollte nun untersucht werden, ob einmalig besiedelte Glasperlen für eine wiederholende Inokulation neuer Netzgewebe verwendet werden können. Das Ziel dieses Versuchs bestand darin, mittels einer Ausgangsmenge an besiedelten

3. Ergebnisse

Glasperlen mindestens zehn Netzgewebe zu inokulieren. Dafür wurden Glasperlen nach einer 24-stündigen Inokulation von den Netzgeweben entfernt und für die Inokulation neuer Netzgewebe verwendet. Die Netzgewebe wurden im Anschluss daran weitere sechs Tage kultiviert und die Zellzahl auf dem Netzgewebe bestimmt. Auf dem 1. Netzgewebe wurden nach einer Kultivierungszeit von insgesamt sieben Tagen 236.000 Zellen / cm² gezählt. Auf den darauf folgenden Netzgeweben wurden schwankende, aber stets geringere Zellzahlen gezählt. Die Zellzahl auf dem 7. Netzgewebe war mit 243.000 Zellen / cm² erstmals höher als die des 1. Netzgewebes. Die Zellzahlen der darauf folgenden Netzgewebe stiegen anschließend kontinuierlich an. Auf dem 10. Netzgewebe wurde eine Zellzahl von 306.000 Zellen / cm² bestimmt. In der Abb. 35 sind die erhaltenen Zellzahlen der jeweiligen Netzgewebe dargestellt.

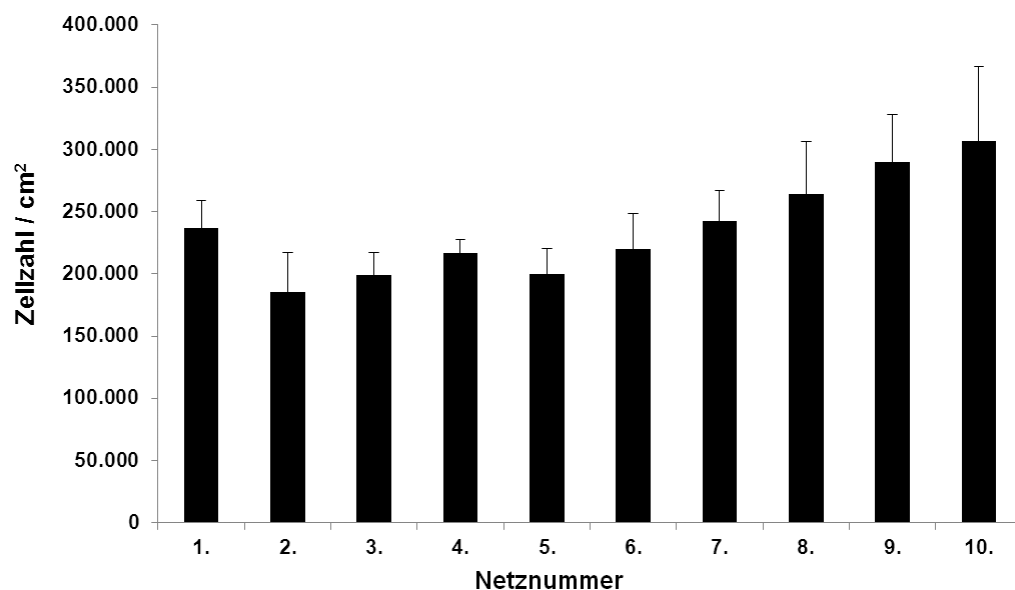


Abb. 35 | Wiederholte Inokulation von Netzgeweben. Abgebildet sind die Zellzahlen von Z29 Zellen in Passage 45 (Zellen / cm²). Die Polyethylen-Netzgewebe wurden aufeinanderfolgend jeweils 24 Stunden mit immer den gleichen Glasperlen inokuliert und anschließend weitere sechs Tage kultiviert. Die angegebenen Zellzahlen sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung (n = 3).

Die Glasperleninokulation war geeignet, um grobmaschige Netzgewebe mehrfach mit Zellen zu besiedeln. In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob es zudem möglich ist, die Zellen von einem besiedelten Netzgewebe auf neue und unbesiedelte Glasperlen zu übertragen. Dafür wurden Netzgewebe mittels Glasperlen inokuliert und anschließend sechs Tage kultiviert. Am 7. Tag befanden sich im Mittel

3. Ergebnisse

157.000 Zellen / cm² auf den Netzgeweben. Auf diese Netzgewebe wurden unbesiedelte Glasperlen pipettiert und die Zellzahl auf den Glasperlen nach drei bzw. sechs Tagen bestimmt. Am 3. Tag betrug die Zellzahl auf den Glasperlen 36.000 Zellen / cm², die Netzgewebe, von denen diese Glasperlen abgenommen wurden, trugen 251.000 Zellen / cm². Auf den Kontrollnetzgeweben wurden im Mittel 293.000 Zellen / cm² gezählt. Auf den Netzgeweben die mit Glasperlen bedeckt waren, befanden sich demnach rund 14 % weniger Zellen. Nach weiteren drei Tagen befanden sich 70.000 Zellen / cm² auf den Glasperlen, auf den korrespondierenden Netzgeweben wurden 277.000 Zellen / cm² gezählt. Das Kontrollnetzgewebe hatte 371.000 Zellen / cm² und damit rund 25 % mehr Zellen. Selbst die Summe der absoluten Zellzahlen auf den Netzgewebe und den Glasperlen lag am 3. Tag (Netzgewebe 3,30 x 10⁶ Zellen; Glasperlen 321.000 Zellen) bereits 5,9 % unterhalb der Zellzahl des Kontrollnetzgewebes (3,85 x 10⁶ Zellen). Am 6. Tag waren auf den Netzgeweben und Glasperlen sogar 12,7 % weniger Zellen als auf den Kontrollnetzgeweben. In der Abb. 36 sind die Zellzahlen der Glasperlen, der Netzgewebe und deren Kontrollnetzgewebe dargestellt.

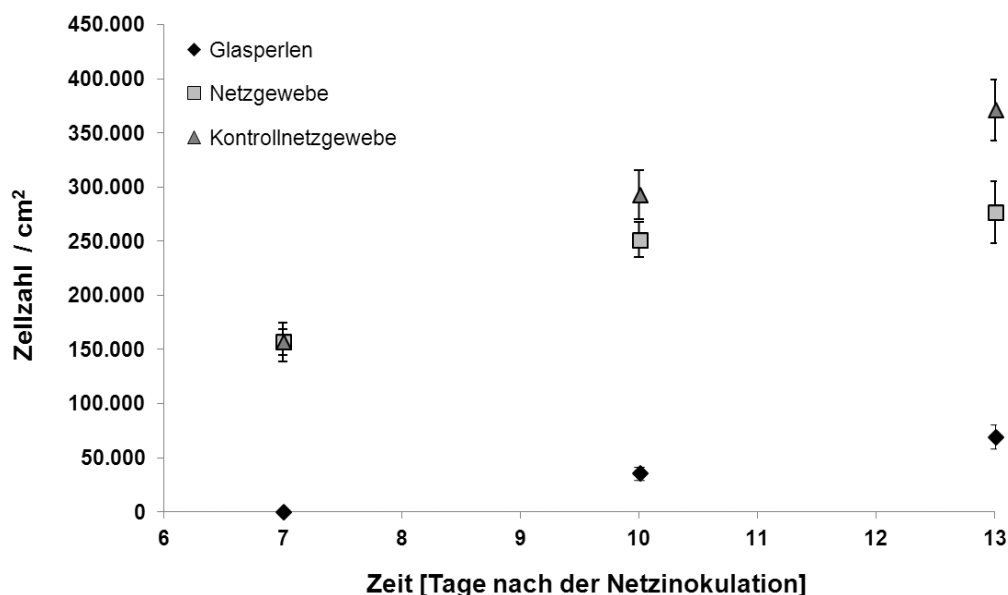


Abb. 36 | Inokulation von Glasperlen mittels besiedelter Netzgewebe. Aufgetragen ist das Zellwachstum von Z29 Zellen in Passage 44 auf Polyethylen-Netzgeweben mit aufliegenden unbesiedelten Glasperlen. Bevor die Glasperlen auf das Netzgewebe gelegt wurden, wurde es mit Zellen inokuliert und vorkultiviert. Am 7. Tag nach der Netzinokulation wurden unbesiedelte Glasperlen auf das Netzgewebe pipettiert und die Zellzahlen auf den Glasperlen nach weiteren drei bzw. sechs Tagen bestimmt. Bei den Kontrollen handelt es sich um besiedelte Netzgewebe, die nicht mit Glasperlen bedeckt wurden. Die dargestellten Zellzahlen sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung ($n = 3$).

Zusätzlich zu den ermittelten Zellzahlen wurden ebenfalls mikroskopische Aufnahmen der Glasperlen auf den Netzgeweben gemacht. Dabei konnte beobachtet werden, dass Glasperlen, die insgesamt sechs Tage auf den besiedelten Netzgewebe kultiviert worden waren, fast vollständig von den Z29 Zellen besiedelt wurden. Einige der Glasperlen waren allerdings unvollständig besiedelt, wobei die Tonsuren ziemlich exakt auf der dem Netzgewebe gegenüberliegenden Seite lokalisiert waren. Darüber hinaus wurden bei den kleineren Glasperlen Quervernetzungen untereinander beobachtet (Abb. 37).

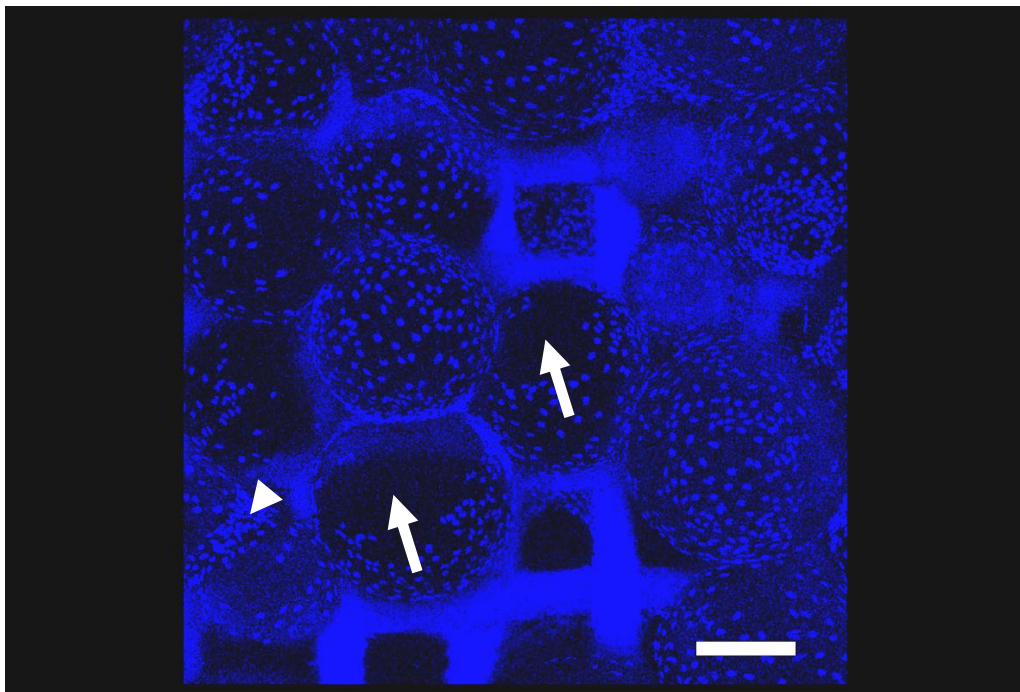


Abb. 37 | Glasperlen inokuliert durch ein besiedeltes Netzgewebe. Dargestellt sind gelatinebeschichtete Glasperlen, welche sechs Tage auf einem mit Z29 Zellen in Passage 44 besiedelten, konfluent bewachsenen Polyethylen-Netzgewebe kultiviert wurden. Nur wenige der Glasperlen sind, an der vom Netzgewebe gegenüberliegenden Seite, nicht vollständig besiedelt (Pfeile). Ebenfalls sind zwischen zwei Glasperlen erste Quervernetzungen zu erkennen (Pfeilspitze). Die Zellkerne sind mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Z29 Zellen in gleicher Weise von einem bereits besiedelten Netzgewebe (Netzgewebe A) auf ein unbesiedeltes Netzgewebe (Netzgewebe B) übertragen werden können. Dafür wurde Netzgewebe A mit Z29 Zellen inokuliert und sechs Tage vorkultiviert. Dadurch wurde ein konfluentes

3. Ergebnisse

Netzgewebe erhalten, welches im Mittel mit 182.000 Zellen / cm² besiedelt war. Auf dieses Gewebe wurde das Netzgewebe B aufgelegt, die Kultivierung fortgesetzt und die Zellzahlen nach drei bzw. sechs Tagen gezählt. Am 3. Tag wurden auf dem Netzgewebe B lediglich 2.600 Zellen / cm² gezählt, wobei Netzgewebe A und das Kontrollnetzgewebe mit 347.000 Zellen / cm² bzw. 340.000 Zellen / cm² nahezu identische Zellzahlen aufwiesen. Weitere drei Tage später wurden auf dem Netzgewebe B 57.800 Zellen / cm² gezählt und auf dem Netzgewebe A 383.000 Zellen / cm². Damit wurden auf dem Netzgewebe A rund 10 % weniger Zellen gezählt als auf den dazugehörigen Kontrollnetzgeweben (Abb. 38).

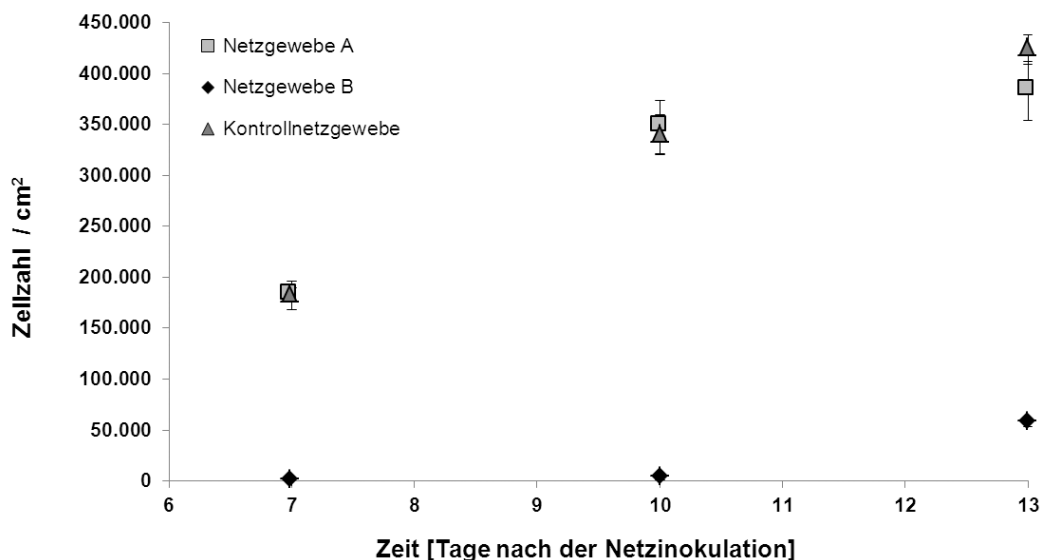


Abb. 38 | Inokulation von Netzgeweben mittels besiedelter Netzgewebe. Dargestellt ist das Zellwachstum von Z29 in Passage 67 auf Polyethylen-Netzgeweben. Dabei wurde das Netzgewebe A insgesamt 24 Stunden mit Glasperlen inokuliert und weitere sechs Tage vorkultiviert. Am 7. Tag wurde das Netzgewebe A mit einem neuen und unbesiedelten Netzgewebe (Netzgewebe B) bedeckt und die Kultivierung fortgesetzt. Die Bestimmung der Zellzahlen auf dem Netzgewebe B erfolgte am 3. bzw. 6. Tag nachdem es auf Netzgewebe A aufgelegt wurde. Die Kontrollgewebe wurden ohne ein weiteres Gewebe kultiviert. Die Zellzahlen sind das arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung ($n = 3$).

Wie in der Abb. 38 gut zu erkennen ist, reduziert sich die Zellzahl auf dem Netzgewebe A leicht, sobald die Zellzahl auf dem Netzgewebe B ansteigt. Betrachtet man jedoch die Summe der Zellzahlen von Gewebe A und B, so ist die Gesamtzellzahl rund 4 % höher als die der Kontrollnetzgewebe. Die mikroskopische Beurteilung der Netzgewebe zeigte, dass das Netzgewebe B relativ inhomogen besiedelt war. In

einigen Bereichen wurden keine Zellen auf dem Netzgewebe B beobachtet, wohingegen dort, wo die Inokulation erfolgreich war, relativ viele Zellen beobachtet wurden. In der Abb. 39 ist exemplarisch ein Ausschnitt des Netzgewebes B gezeigt, in dem die Inokulation mit dem Netzgewebe A erfolgreich war.

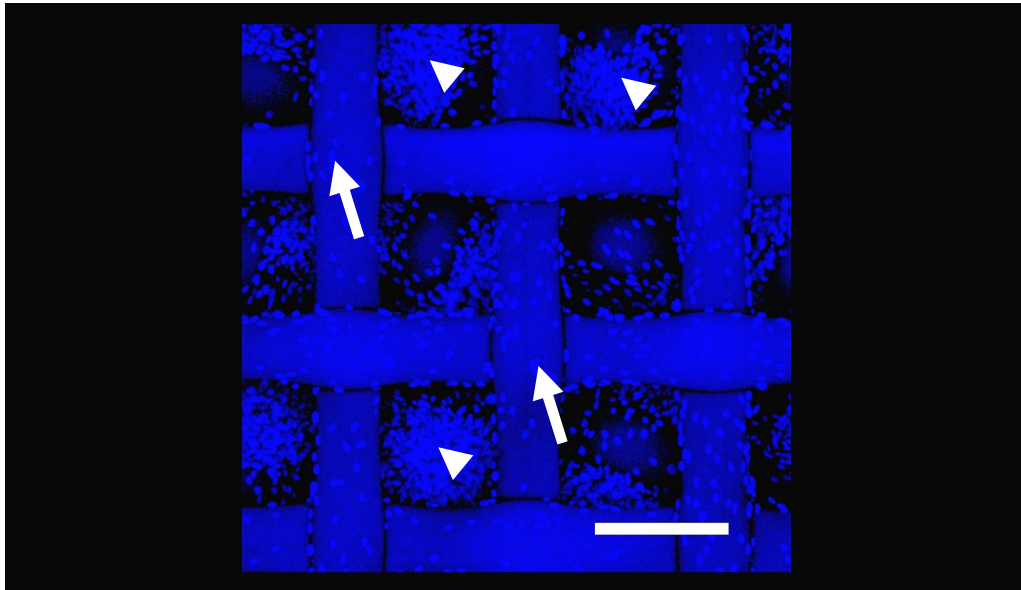


Abb. 39 | Inokulation eines Netzgewebes durch ein besiedeltes Netzgewebe. Dargestellt ist ein Polyethylen-Netzgewebe (Netzgewebe B), welches insgesamt sechs Tage auf einem bereits mit Z29 in Passage 67 besiedelten Polyethylen-Netzgewebe (Netzgewebe A) kultiviert wurde. Das konfluente Netzgewebe A ist im Hintergrund der Abbildung, bzw. durch die Netzmaschen des Netzgewebes B zu erkennen (Pfeilspitzen). Das Netzgewebe B ist mit einer Vielzahl von Zellen besiedelt (Pfeile). Die Zellkerne sind mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Netzgewebe für die adhärent wachsenden Z29 Zellen eine geeignete Wachstums-oberfläche darstellen. Weiterhin wurde beobachtet, dass neben den soliden Oberflächen des Netzgewebes auch die Maschen des Netzgewebes von den Z29 Zellen als Wachstums-oberfläche erschlossen wurden. Dabei kommt es, wie in der Abb. 33 und Abb. 39 zu sehen ist, vorerst zu einer Besiedelung der Stege und Kreuzungen des Netzgewebes. Ausgehend von den Ecken der Maschen bewuchsen die Zellen nach und nach den Innenraum der Masche, bis dieser vollständig bewachsen war. In der Abb. 40 ist ein Netzgewebe gezeigt, bei dem die Maschen unterschiedlich dicht von Z29 Zellen besiedelt wurden.

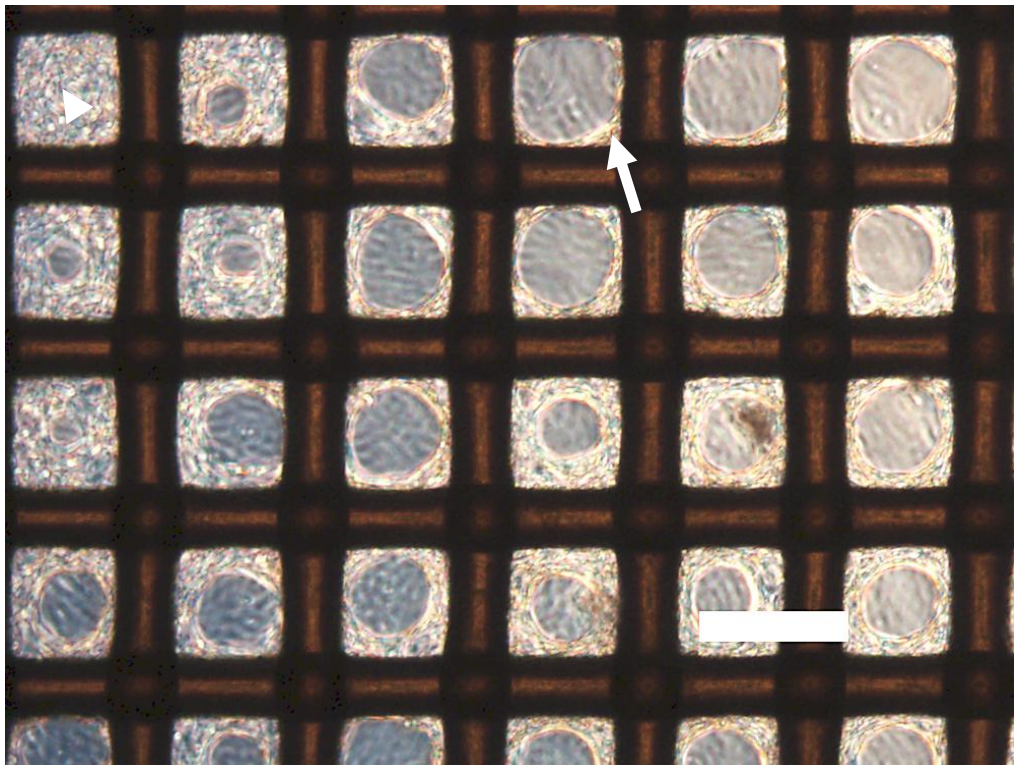


Abb. 40 | Zellwachstum von Z29 Zellen auf Netzgeweben. Gezeigt ist die durchlichtmikroskopische Aufnahme eines Polyethylen-Netzgewebes, das mit Z29 Zellen in Passage 49 besiedelt worden ist. Ausgehend von den Ecken besiedeln die Z29 Zellen auch die Netzmasche (Peil), bis die Masche vollständig zugewachsen ist (Pfeilspitze). Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

Mit den vorliegenden Kultivierungserfahrungen von Z29 Zellen auf Netzgeweben wurde die Methodenentwicklung abgeschlossen und ein neuartiges technisches Kultivierungskonzept für Netzgewebe entwickelt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die adhärent wachsenden Zellen auf Netzgeweben in einem Sprühnebel aus Nährmedium kultiviert werden können. Für die Machbarkeitsstudie einer Kultivierung im Sprühnebel musste zunächst eine geeignete Sprühvernebelungseinrichtung gefunden werden. Hinsichtlich dessen, wurden insgesamt fünf unterschiedliche Sprühdüsen bei einem Arbeitsdruck zwischen 1 bar und 7 bar betrieben und die Sprüheigenschaften qualitativ und quantitativ beurteilt.

Vier der fünf getesteten Sprühdüsen konnten bei einem Arbeitsdruck zwischen 1 bar und 7 bar betrieben werden. Lediglich die MRS 0.3 Sprühdüse zeigte erst ab einem Arbeitsdruck von 7 bar einen schwachen Sprühstrahl bei einer Durchflussmenge von 17,5 ml / Minute und einem Sprühwinkel von 40°. Abgesehen davon, wurde bei der MRS 0.2 Sprühdüse die niedrigste Durchflussmenge bestimmt. Diese betrug, in Ab-

3. Ergebnisse

hängigkeit vom angelegten Arbeitsdruck, 12,7 ml bis 26,7 ml / Minute bei einem Sprühwinkel von 50° bis 60°. Die Durchflussmenge der Rauch WD 04 Sprühdüse lag lediglich 25 % bis maximal 50 % oberhalb der der MRS 0.2, ihr Sprühwinkel war allerdings mit 30° bis 40° deutlich kleiner. Verglichen mit der MRS 0.2 Sprühdüse war die Durchflussmenge der MRS 0.5 mehr als doppelt so hoch. Das in einer Minute versprühte Volumen lag zwischen 31,4 ml und 78,7 ml, bei einem Sprühwinkel zwischen 90° und 100°. Die Schlick 123 Sprühdüse hatte mit Abstand die höchste Durchflussmenge. Bei einem Arbeitsdruck von 7 bar betrug die Durchflussmenge 140 ml / Minute und war damit etwa doppelt so hoch wie bei der MRS 0.5 Sprühdüse. Der Sprühkegel der Schlick 123 Düse hatte Winkel zwischen 90° und 110° und das Sprühbild entsprach einem hohlen Kegel. In der Tab. 4 sind die Ergebnisse der quantitativen Sprühbildanalyse übersichtlich zusammengefasst.

Tab. 4 | Durchflussmenge [ml / min] und Sprühwinkel [°] unterschiedlicher Sprühdüsen bei einem Arbeitsdruck zwischen 1 bar und 7 bar.

		Sprühdüse				
		MRS 0.2	MRS 0.3 Anti-Tropf	MRS 0.5	Rauch WD 04	Schlick 123
Durchflussmenge [ml/min] / Sprühwinkel bei	1bar	12,7 / 50°	-	31,4 / 90°	15,8 / 30°	62,3 / 90°
	2bar	16,3 / 50°	-	38,8 / 90°	21,9 / 30°	79,7 / 80°
	3bar	19,0 / 50°	-	54,9 / 95°	26,3 / 30°	97,2 / 85°
	4bar	21,1 / 55°	-	59,7 / 95°	29,7 / 35°	108,2 / 90°
	5bar	23,1 / 55°	-	62,6 / 95°	32,9 / 35°	120,0 / 95°
	6bar	24,9 / 60°	-	69,1 / 100°	36,0 / 40°	130,2 / 100°
	7bar	26,7 / 60°	17,5 / 40°	78,7 / 100°	39,3 / 40°	140,0 / 110°

Während des Sprühens wurden die Sprühbilder der unterschiedlichen Düsen zusätzlich mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet und anschließend qualitativ beurteilt. Als Beispiel ist in der Abb. 41 die qualitative Sprühbildanalyse der MRS 0.5 Sprühdüse aufgeführt. Wie auf den Videoaufzeichnungen der MRS 0.5 deutlich zu erkennen ist, entstanden bei einem Arbeitsdruck von 1 bar überwiegend grobe Sprühtropfen und der Sprühstrahl war einseitig nach links orientiert. Durch eine kontinuierliche Erhöhung des Arbeitsdrucks auf 2 bar bzw. 3 bar wurden zwar zunehmend feine-

re Sprühtropfen erzeugt, die Orientierung des Sprühstrahls blieb jedoch erhalten. Erst ab einem Arbeitsdruck von 4 bar zeigte sich ein gleichförmig zentriertes Sprühbild. Durch die Steigerung des Arbeitsdrucks erhöhte sich der Anteil der feinen Sprühtropfen und ab 5 bar wurde eine Kernzone beobachtet. Diese Kernzone befand sich ziemlich exakt im Zentrum des Sprühkegels und fiel dadurch auf, dass die Fallgeschwindigkeit des Sprühnebels in diesem Bereich deutlich verlangsamt war. Ab einem Druck von 6 bar wurde diese Kernzone wesentlich präsenter. In der Abb. 41 sind die Einzelbildausschnitte der Hochgeschwindigkeitsfilmsequenzen und das Durchflussmengendiagramm der MRS 0.5 Sprühdüsen zusammengestellt. Die Sprühbildanalysen der weiteren, ebenfalls getesteten Sprühdüsen sind im Abschnitt 6.2 des Anhangs hinterlegt.

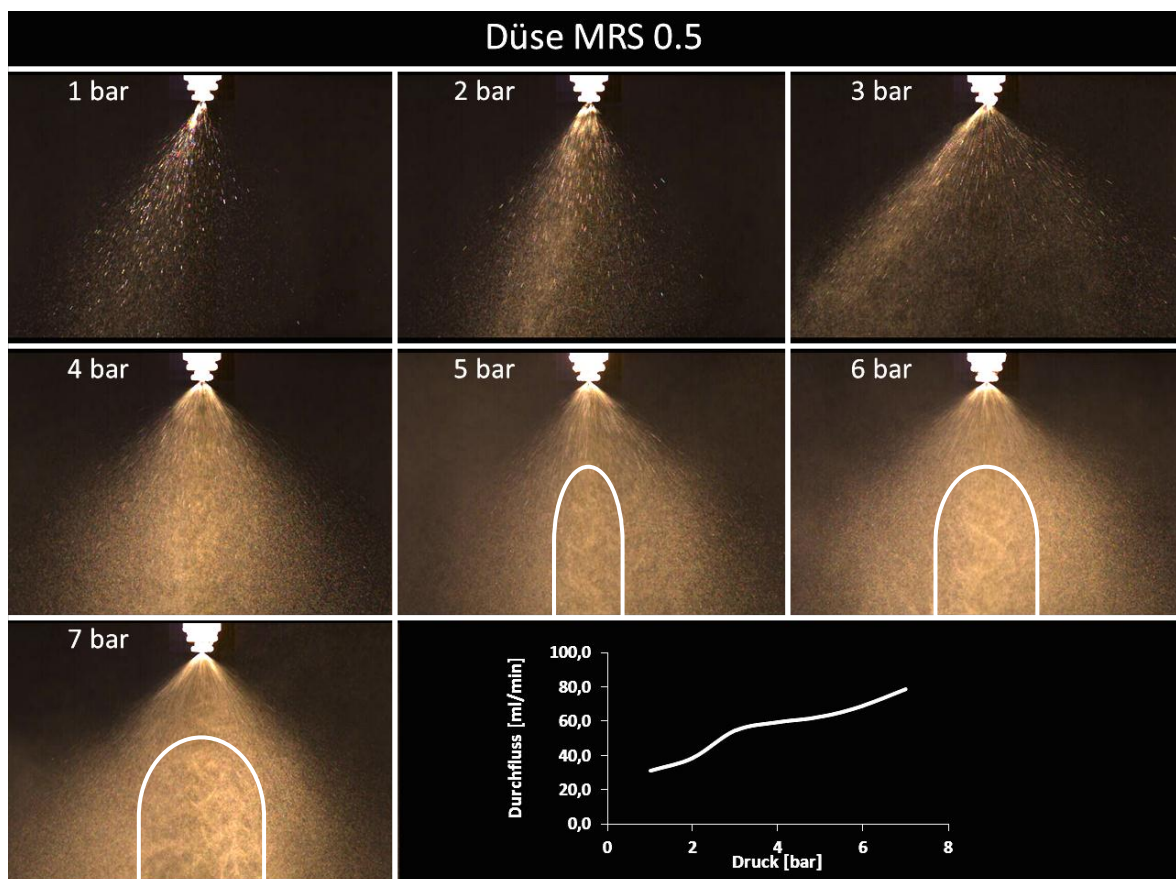


Abb. 41 | Qualitative Sprühbildanalyse der MRS 0.5 Sprühdüse. Abgebildet sind die Einzelbildausschnitte der Hochgeschwindigkeitsfilmsequenzen und das Durchflussmengen-Diagramm bei einem Arbeitsdruck zwischen 1 bar und 7 bar. Ab einem Arbeitsdruck von 5 bar ist eine Kernzone des Sprühnebels zu beobachten (eingerahmt), die mit steigendem Druck zunimmt. Die Videodateien befinden sich auf der beigefügten DVD.

Auf Grundlage der Sprühbildanalysen wurde die MRS 0.5 Sprühdüse als Sprühvernebelungseinrichtung ausgewählt. Für den Einbau der MRS 0.5 Sprühdüse in den Multifors® 2 Bioreaktor wurde ein Blindstopfen eines Sondenports durchbohrt und mit den notwendigen Gewinden und Adaptern versehen (Abb. 14). Mit diesem so präparierten Blindstopfen wurden vorerst Sprühtests im Inneren des Reaktorkessels durchgeführt, welche ebenfalls mit der Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet wurden. Dabei sollte die Ausbreitung des Sprühnebels in dem Kultivierungsgefäß untersucht werden. Die Düse wurde um etwa 15° in Richtung des Gefäßzentrums geneigt und die Ausbreitung des feinen Sprühnebels aufgezeichnet. Dabei wurde festgestellt, dass sich bei einem Arbeitsdruck von 4 bar bis 7 bar der Sprühnebel im gesamten Reaktorkessel ausbreitete. Am unteren geschwungenen Teil des Reaktorgefäßes wurde eine Umlenkung des Sprühnebels beobachtet. In der Abb. 42 sind die Einzelausschnitte der Sprühbildanalysen mit der MRS 0.5 Sprühdüse bei einem Druck zwischen 4 bar und 7 bar dargestellt.

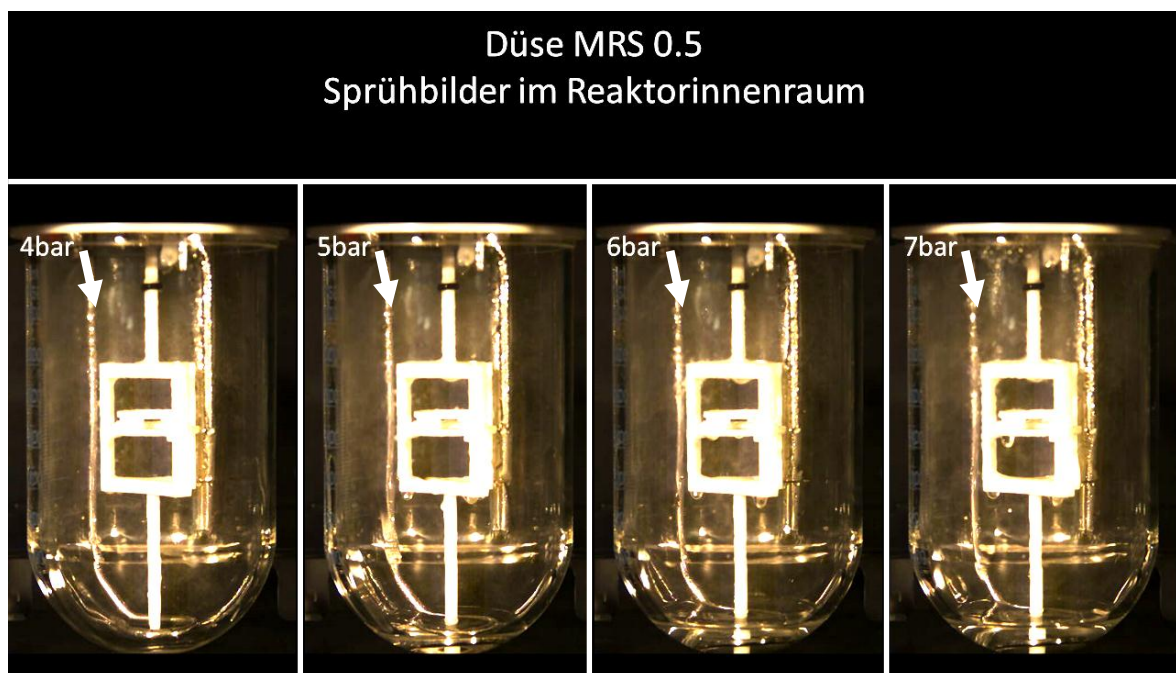


Abb. 42 | Qualitative Sprühbildanalyse der MRS 0.5 Sprühdüse im Reaktorinnenraum. Dargestellt sind die Einzelausschnitte der Hochgeschwindigkeitsfilmsequenzen der MRS 0.5 Sprühdüse, welche in den Reaktorinnenraum des Multifors® 2 Bioreaktors eingebaut wurde. Die Position der Sprühdüse und deren Sprührichtung sind durch einen Pfeil dargestellt. Bei dem getesteten Arbeitsdruck zwischen 4 bar und 7 bar entwickelt sich ein Sprühnebel, der im unteren geschwungenen Teil des Gefäßes umgelenkt wird und dadurch den gesamten Reaktorkessel erfasst. Für die exakte Beurteilung, besonders der Unterschiede bei steigendem Druck, ist es notwendig die Videodateien der beigefügten DVD abzuspielen.

3.2.3.1 Kultivierung von Z29 Zellen im modifizierten Multifors® 2

Die Kultivierung von Z29 Zellen auf Netzgeweben im Sprühnebel erfolgte in dem modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor. Die Netzgewebe wurden mit Z29 Zellen inokuliert, in Netzträgern fixiert (Abb. 13 c) und 72 Stunden in Petrischalen vorkultiviert, wonach diese mit 79.200 Zellen / cm² besiedelt waren. Diese Netzgewebe wurden in die Netzhalterung eingesetzt und weitere 96 Stunden im Sprühnebel kultiviert. Dabei wurden Netzgewebe erhalten, die im Mittel 1,08x10⁶ Zellen / cm² trugen. Verglichen mit den Zellzahlen der Kontrollnetzgewebe (446.000 Zellen / cm²) war die Zellzahl auf den Netzen kultiviert im Sprühnebel rund 2,4-mal höher als bei den Kontrollnetzgeweben kultiviert in Petrischalen im Inkubator. In der Abb. 43 ist die erreichte Zellzahl der Reaktorkultur verglichen mit der in Petrischalen dargestellt.

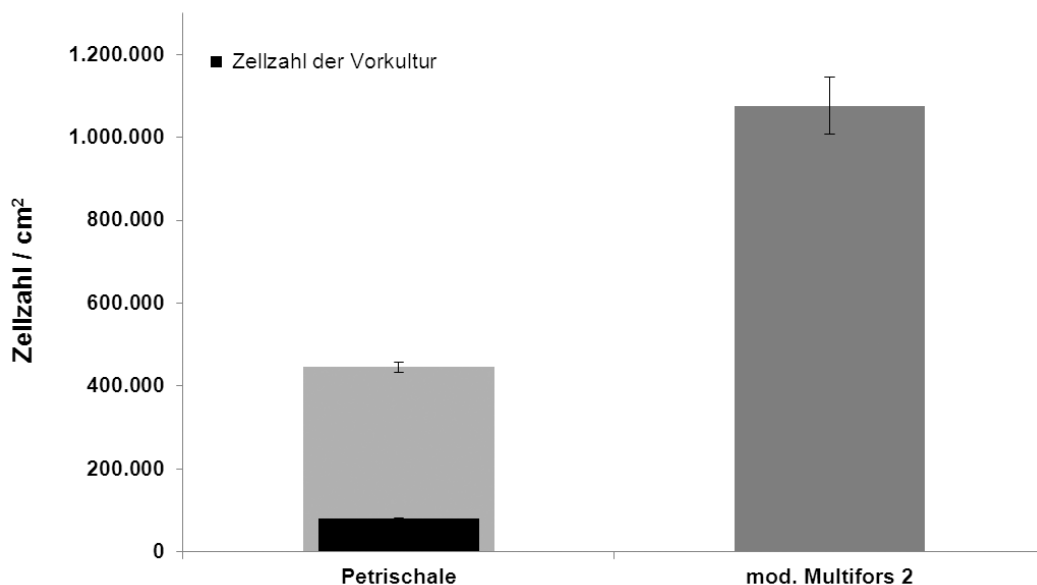


Abb. 43 | Kultivierung von Z29 Zellen im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor. Gezeigt sind die Zellzahlen der Z29 Zellen in Passage 68 (Zellen / cm²) kultiviert auf Polyethylen-Netzgeweben. Vor der Kultivierung in dem modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor wurden die Netzgewebe mittels Glasperlen inokuliert und in Petrischalen vorkultiviert. Dadurch entstanden Netzgewebe, die mit rund 79.000 Zellen / cm² besiedelt waren (schwarzer Balken) und in den Bioreaktor überführt wurden. Die im Bioreaktor fortgesetzte Kultivierung ergab eine Zellzahl von 1,08x10⁶ Zellen / cm² (dunkelgrauer Balken) und damit rund 630.000 Zellen / cm² mehr als auf den Kontrollnetzgeweben im Zellkulturinkubator (hellgrauer Balken).

3.2.3.2 Kultivierung von AOXlar7 Zellen im modifizierten Multifors® 2

Nachdem die Kultivierung von Z29 Zellen im Sprühnebel gelang, wurden die bis dahin entwickelten Techniken und Methoden für die Kultivierung von AOXlar7 Zellen adaptiert. Dabei wurde festgestellt, dass lediglich 23 % der inokulierten AOXlar7 Zellen durch das Pipettieren der Glasperlen übertragen werden konnten. Um also eine ausreichend hohe Anzahl an Zellen auf den Glasperlen zu haben, wurden die Netzgewebe mit der zweifachen Menge an Glasperlen inokuliert. Da die AOXlar7 Zellen im Allgemeinen viel langsamer als Z29 Zellen wachsen, wurde sowohl das Inokulationsprotokoll der Glasperlen, als auch das der Netzgewebe verlängert (siehe dazu 2.2.1.5 bzw. 2.2.1.6). Aus den Wachstumskurven der AOXlar7 Zellen (Abb. 26) geht zudem hervor, dass diese Zellen eine ausgeprägte Latenzphase zeigen, weswegen die Glasperlen nicht nach 24 Stunden entfernt, sondern insgesamt fünf Tage auf den Netzgeweben kultiviert wurden. Entsprechend dieser Inokulationsprozedur wurden Netzgewebe unterschiedlicher Materialien (Polyethylen und Polyamid) mit und ohne zusätzliche Gelatinebeschichtung inokuliert. Dabei zeigte sich, dass sowohl Polyethylen-, als auch Polyamid-Netzgewebe mit und ohne Gelatinebeschichtung erfolgreich inokuliert wurden. Auf den unbeschichteten Polyamid-Netzgeweben wurde allerdings mit 15.665 Zellen / cm² die höchste Zellzahl gezählt.

Wie bei den Z29 Zellen wurden die Glasperlen von dem Netzgewebe entfernt und die Netzgewebe anschließend weiterkultiviert. Wegen der deutlich langsameren Proliferation wurden die AOXlar7 Zellen weitere fünf Tage in Petrischalen im Inkubator kultiviert und anschließend die Zellzahl auf den Netzgeweben bestimmt. Da allerdings die Startzellzahlen der unterschiedlichen Netzgewebe voneinander abwichen, konnten die endgültig erreichte Zellzahl der Netzgewebe nicht direkt untereinander verglichen werden. Um sie dennoch miteinander vergleichen zu können, wurde der Quotient aus der erreichten Zellzahl und der ursprünglichen Startzellzahl berechnet. Bei den beschichteten und den unbeschichteten Polyethylen-Netzgeweben war dieser Quotient in etwa gleichgroß und erreichte einen Wert um 2,8. Bei den Polyamid-Netzgeweben zeigte sich zwar ein leichter Unterschied zwischen den beschichteten und den unbeschichteten Netzgeweben, mit 3,3 bzw. 3,7 lag der Quotient der Zellzahlen jedoch oberhalb von dem der Polyethylen-Netzgewebe. In der Abb. 44 sind die Zellzahlen der unterschiedlichen Netzgewebe aufgetragen.

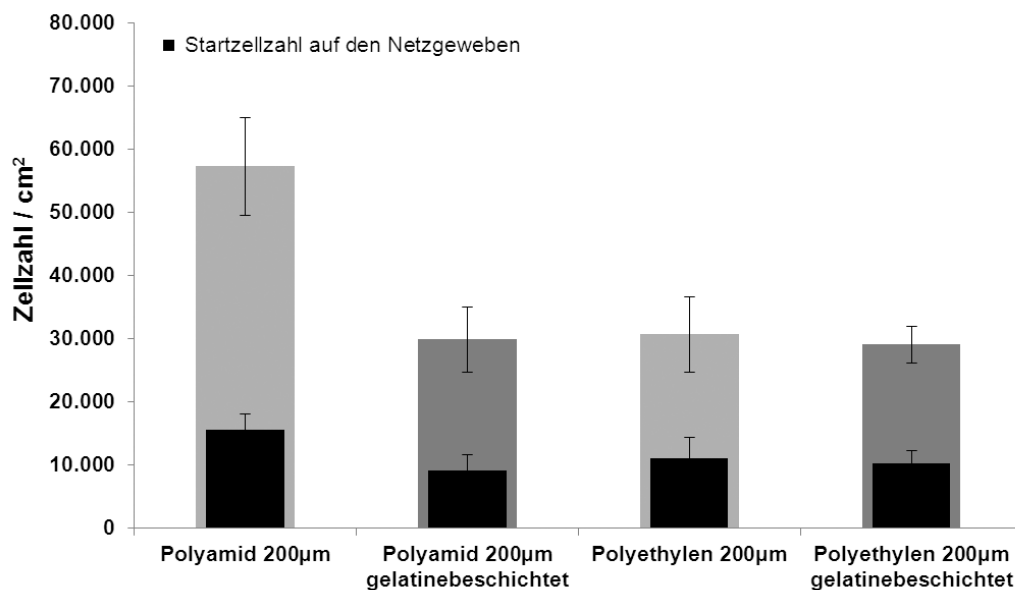


Abb. 44 | Wachstumsvergleich von AOXlar7 Zellen in Passage 51 auf gelatinebeschichteten bzw. nicht mit Gelatine beschichteten Polyethylen- bzw. Polyamid-Netzgeweben. Die mit Gelatine beschichteten Netzgewebe sind in dunkelgrauen Balken dargestellt, die jeweiligen nicht mit Gelatine beschichteten Netzgewebe in hellgrauen Balken. Für die Inokulation der Netzgewebe wurden besiedelte Glasperlen verwendet. Die Inokulation ergab Netzgewebe, deren Zellzahlen sich voneinander unterschieden (schwarze Balken). Bei den nicht mit Gelatine beschichteten Polyamid-Netzgeweben wurden mit rund 15.700 Zellen / cm² die höchsten Zellzahlen gezählt. Die anschließende Kultivierung der Netzgewebe in Petrischalen ergab wiederum unterschiedliche Zellzahlen, wobei die, der nicht mit Gelatine beschichteten Polyamid-Netzgewebe, mit rund 57.300 Zellen / cm² die höchste war. Unter Berücksichtigung der Startzellzahl wurde bei den nicht mit Gelatine beschichteten Netzgeweben mit einem Faktor von 3,7 die höchste Zellvermehrung bestimmt.

Wie in der Abb. 44 gezeigt werden konnte, wachsen AOXlar7 Zellen offensichtlich bevorzugt auf Polyamid-Netzgeweben. Sowohl die Inokulationszellzahl, als auch die am Ende des Experiments bestimmte Zellzahl auf den Netzgeweben war höher als bei den Polyethylen-Netzgeweben. Dementsprechend wurden inokulierte Polyamid-Netzgewebe in Netzträgern fixiert, in den modifizierten Multifors® 2 überführt und im Sprühnebel kultiviert. Nach einer 5-tägigen Kultivierung im modifizierten Multifors® 2 wurden allerdings keine Zellen auf den Netzgeweben gezählt. Erst durch die Veränderung der Zusammensetzung der Inkubatoratmosphäre (2.2.3.2, Tab. 3) wurde ein Zellwachstum auf den Netzgeweben im modifizierten Multifors® 2 erhalten (Abb. 45). Die Reduktion des Sauerstoffanteils auf 5 %, führte zu einer Besiedelung der Polyamid-Netzgewebe mit 44.500 Zellen / cm², was einem Zellwachstum von rund 190 % entspricht. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass sich auf den Kontrollgeweben, welche in dem Hypoxie-Inkubator bei 5 % Sauerstoff kultiviert worden waren, mit rund

3. Ergebnisse

60.500 Zellen / cm² etwa 16 % mehr Zellen befanden, als bei den Kontrollgeweben, die bei ~20 % Sauerstoff kultiviert worden waren. Die Zellzahlen der AOXlar7 Zellen im Multifors® 2 bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen, verglichen mit den Kontrollkulturen in Petrischalen im Inkubator, sind in der Abb. 45 zusammengefasst und übersichtlich dargestellt.

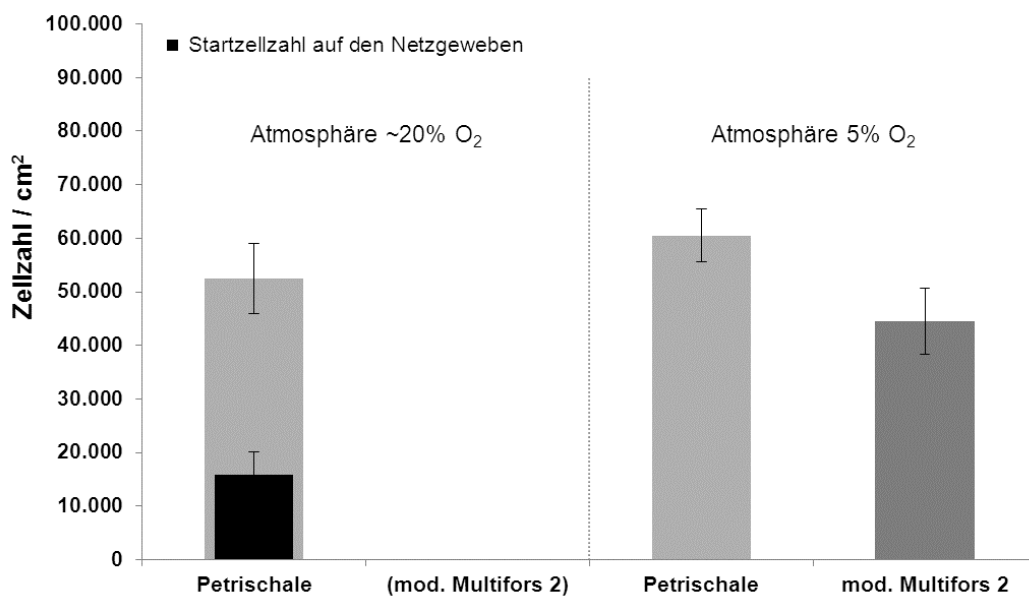


Abb. 45 | Kultivierung von AOXlar7 Zellen in Passage 58 im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor. Dargestellt sind die Zellzahlen der AOXlar7 Zellen kultiviert auf Polyamid-Netzgeweben. Mit Hilfe von Glasperlen wurden diese Netzgewebe mit rund 15.000 Zellen / cm² inokuliert (schwarzer Balken). Ausgehend davon wurden diese Netzgewebe in den modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor überführt und die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen fortgesetzt (5 % Sauerstoffanteil in der Reaktoratmosphäre). Hierdurch wurden Netzgewebe erhalten, die mit rund 44.500 Zellen / cm² besiedelt waren (dunkelgrauer Balken). Auf den entsprechenden Kontrollnetzgeweben kultiviert in Zellinkubatoren in Petrischalen bei ~20 % O₂ und 5 % O₂ wurden 52.400 Zellen / cm² bzw. 60.500 Zellen / cm² gezählt (hellgraue Balken). Vorangegangene Kultivierungen im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor zeigten bereits, dass ein normoxischer Sauerstoffanteil in der Reaktoratmosphäre zu einem Absterben der Zellen im modifizierten Multifors® 2 führte (dargestellt in Klammern).

Anders als bei den Z29 Zellen (Abb. 40) wurden bei den AOXlar7 Zellen die Netzmaschen nicht als Wachstumsoberfläche erschlossen. Wie in der Abb. 46 dargestellt, befanden sich die Zellen ausschließlich auf den soliden Oberflächen der Netzstege. In Übereinstimmung mit den in 3.1.5 beschriebenen Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der AOXlar7 Zellen auf zweidimensionalen Wachstumsoberflächen, wurde ein dichter Zellrasen beobachtet.

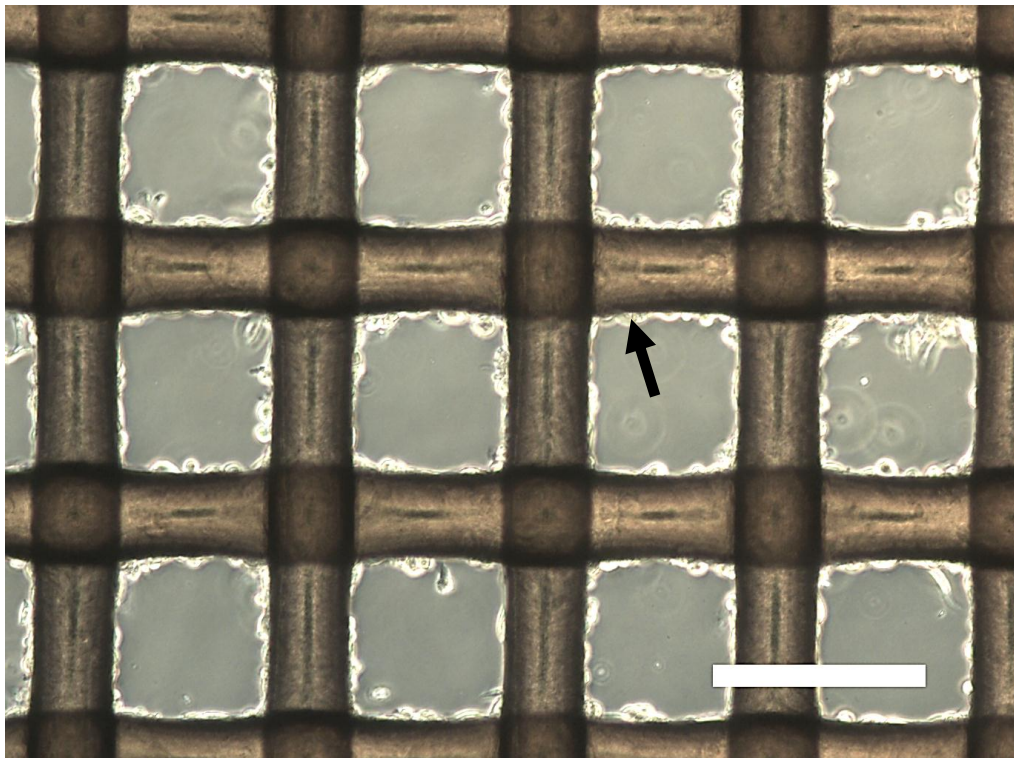


Abb. 46 | AOXlar7 Zellen in Passage 58 kultiviert auf Polyamid-Netzgeweben im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor. Dargestellt ist das oberste Netzgewebe (Abb. 13 c) nach einer 5-tägigen Kultivierung im Sprühnebel bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 %. Für diese Aufnahme wurde das mit AOXlar7 Zellen bewachsene Netzgewebe aus dem Reaktor entnommen und in eine Petrischale mit PBS überführt. Deutlich ist zu erkennen, dass die Zellen die Netzoberfläche als Wachstumsfläche erschlossen haben (Pfeil) und nicht innerhalb der Maschen wuchsen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in erster Line untersucht werden, ob sich Fischzellkulturen als Fischmehlersatz bzw. Futtermittelzusatz eignen. Zusätzlich dazu sollte durch die Überführung dieser Fischzellkulturen in einen technisch kontrollierten Kultivierungsprozess ein erster Grundstein für eine zukünftige industrielle bzw. biotechnologische Produktion dieser Fischzellen gelegt werden.

Neben der Verwendung als Lebensmittel ist Fisch der Rohstoff für die industriell genutzten Produkte Fischmehl und Fischöl [Jackson 2012], welche die traditionellen Futterbestandteile in der Aquakultur sind [Hardy 2010]. Ihre Marktpreise sind, aufgrund der infolge intensiver Befischung der Weltmeere knapper werdenden natürlichen Fischbestände, in den vergangenen Jahren drastisch gestiegen [Hardy 2010, Jackson 2012]. Um den Kostendruck in der Aquakultur zu senken, werden zunehmend alternative, meist pflanzliche Bestandteile dem Zuchtfutter beigefügt [Ayadi *et al.* 2012], welche allerdings nicht zwingend den physiologischen Bedarf an Nährstoffen decken und darüber hinaus unerwünschte Inhaltsstoffe enthalten [Gatlin *et al.* 2007]. Diese antinutritiven Inhaltsstoffe, wie z.B. komplexe Kohlenhydrate, haben unter Umständen einen negativen Einfluss auf die Futterverwertung und das Schlachtgewicht, wodurch der Produktionserfolg geschmälert sein kann. Aus diesem Grund wurden verschiedene Strategien entwickelt, die dazu beitragen sollten, den Anteil an essentiellen Nahrungsbestandteilen zu erhöhen und gleichzeitig den Anteil der antinutritiven Inhaltsstoffe zu reduzieren [Gatlin *et al.* 2007]. Das in dieser Arbeit vorgestellte Fischzell-Lyophilisat stellt im Idealfall ein fischspezifisches Additiv dar, welches solcher Anpassungsstrategien nicht bedarf.

Für die Durchführung des vorliegenden Forschungsvorhabens wurden zwei bereits zellbiologisch charakterisierte Langzeit-Fischzellkulturen ausgewählt, welche unter ernährungsphysiologischen Gesichtspunkten weitergehend charakterisiert werden sollten. Dabei steht die Langzeit-Zellkultur der Regenbogenforelle stellvertretend für eine exklusiv karnivore Fischart. Die zu den lachsartigen Fischen (*Salmoniformes*) gehörende Regenbogenforelle wird typischerweise in etwa 12 °C warmem Süßwasser gezüchtet und ist zusammen mit den verwandten Arten Bachforelle (*Salmo trutta fario*) und Seeforelle (*Salmo trutta lacustris*) die bedeutendste Fischart in der deutschen

Aquakultur. Obwohl die Regenbogenforelle eine der wichtigsten Aquakulturspezies in Deutschland ist, betrug ihr Marktanteil 2012 lediglich 3,4 % [FIZ]. Als weitere Langzeit-Fischzellkultur wurde die des Atlantischen Störs verwendet. Als anadrome Fischart wandert der Stör im Laufe seiner Entwicklung von seiner Geburtsstätte im Süßwasser ins Salzwasser und ernährt sich dabei omnivor von überwiegend benthisch lebenden Organismen [Smith 1985]. In Deutschland spielt die Störzucht zwar eine untergeordnete Rolle, weltweit gesehen ist sie für die Kaviarproduktion allerdings äußerst bedeutsam [Bronzi *et al.* 2011].

4.1 Ernährungsphysiologische Charakterisierung der Langzeit-Fischzellkulturen

Bei der ernährungsphysiologischen Charakterisierung der verwendeten Fischzellkulturen wurde ein besonderes Augenmerk auf die essentiellen Aminosäuren und die Omega-3 Fettsäuren gelegt. Der Gehalt an den Omega-3 LC-PUFAs EPA und DHA war dabei von übergeordnetem Interesse. Durch die Veränderung der jeweiligen Zellkulturbedingungen sollte untersucht werden, inwieweit sich deren Anteil während der Kultivierung maximieren lässt.

4.1.1 Proteingehalt und Aminosäurezusammensetzung

Aus der Summe aller quantitativ bestimmten Aminosäuren wurde der jeweilige Gesamtaminosäuregehalt der Fischzell-Lyophilisate berechnet. Obwohl dieser Gesamtaminosäuregehalt nicht dem exakten Proteingehalt entspricht, wurden dennoch beide Bezeichnungen synonym zueinander verwendet, da sich hierdurch die erzielten Messergebnisse mit den Literaturwerten vergleichen lassen.

Der Proteingehalt der OMYsd1x Zellen ist mit rund 63 g je 100 g Zell-Lyophilisat mehr als doppelt so hoch wie bei den AOXlar7 Zellen (rund 29 g je 100 g). Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise durch die Herkunft der OMYsd1x Zellen erklären. Die aus einem Vollhautexplantat der Regenbogenforelle gewonnene OMYsd1x Zellkultur besteht überwiegend aus spindelförmigen Fibroblasten [Rakers *et al.* 2011], die in ihrem dermalen Ursprungsgewebe die Bildung einer extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) übernehmen [Le Pillouer-Prost 2003, Ingerslev *et al.*

2010]. Die ECM besteht im Wesentlichen aus verschiedenen Proteinen, welche ein komplexes Geflecht bilden und dem Gewebe unter anderem ein stützendes Gerüst bieten [Kleinman *et al.* 2003]. Rakers *et al.* konnten für OMYsd1x Zellen nachweisen, dass Kollagen vom Typ I einer der ECM-Bestandteile ist [Rakers *et al.* 2011]. Es ist daher durchaus möglich, dass diese extrazellulären Matrixproteine den Proteingehalt des OMYsd1x-Lyophilisats erhöht haben. Demgegenüber konnte die exakte Herkunft der AOXlar7 Zellen bisher nicht abschließend bestimmt werden. Nach der Isolation der Zellen aus larvalem Gewebe entstand eine heterogene Zellkultur, deren Morphologie bei höheren Passagen zunehmend homogener wurde [Grunow *et al.* 2011a]. Es ist allerdings offensichtlich (Abb. 20 bzw. Abb. 27), dass der überwiegende Teil der Zellen nicht spindelförmig und daher aller Wahrscheinlichkeit nach nicht dermalen Ursprungs ist.

Anders als bei den hier untersuchten Fischzell-Lyophilisaten werden für die Herstellung von traditionellem Fischmehl ganze Fische aber auch Abfälle aus der fischverarbeitenden Industrie verwendet [Jackson 2012], woraus ein heterogen zusammengesetztes Mehl entsteht, dessen Bestandteile in Abhängigkeit der verwendeten Fischarten variieren. Der mittlere Proteingehalt solcher Fischmehle liegt bei rund 73 g je 100 g, pflanzliche Ersatzmehle enthalten lediglich 33 g Protein je 100 g. Das überwiegend eingesetzte Sojabohnenmehl hat mit 49 g je 100 g einen etwas höheren Proteingehalt, die ebenfalls verfügbaren Sojaproteinkonzentrate und -isolate enthalten 67 g bzw. 91 g Protein je 100 g [Ayadi *et al.* 2012]. Das OMYsd1x-Lyophilisat hat demnach einen Proteingehalt, welcher vergleichbar mit dem des natürlichen Fischmehls ist. Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist jedoch, abgesehen von dem Proteingehalt, die Zusammensetzung der essentiellen Aminosäuren von besonderer Bedeutung. Im Allgemeinen gelten die Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin für Fische als essentiell und müssen notwendigerweise über das Zuchtfutter zugeführt werden [Wilson und Halver 1986]. Die in der Aquakultur eingesetzten pflanzlichen Ersatzmehle, gewonnen aus terrestrischen Nutzpflanzen, enthalten allerdings nur sehr geringe Mengen an Lysin, Methionin und / oder Threonin [Matthews 1999], weshalb diese essentiellen Aminosäuren zusätzlich zugefügt werden müssen, sofern der Fischmehlanteil ganz oder partiell durch ein pflanzliches Ersatzmehl substituiert worden ist.

Bei der detaillierten Betrachtung der jeweiligen essentiellen Aminosäuren in den untersuchten Fischzell-Lyophilisaten konnte festgestellt werden, dass die beiden Fischzellkulturen individuelle Unterschiede aufweisen, welche mit den spezieübergreifenden Beobachtungen *in vivo* übereinstimmen [Mambrini und Kaushik 1995]. Auffällig war jedoch, dass der Gehalt an Threonin bei den AOXlar7 Zellen mit rund 0,1 g je 100 g relativ gering ist. Quantitative Vergleichsanalysen dazu finden sich in der Literatur lediglich für *in vivo* Störgewebe. Dabei konnten weder bei den Geweben des Weißen Störs (*Acipenser transmontanus*) noch bei denen des Belugastörs (*Huso huso*) auffällig geringe Anteile an Threonin festgestellt werden [Ng und Hung 1994, Kaya *et al.* 2008]. Der vergleichsweise geringe Threoningehalt der AOXlar7 Zellen könnte durchaus ein individuelles Charakteristikum des Atlantischen Störs oder eines der *in vitro* kultivierten larvalen Zellpopulation sein. In der Tab. 5 sind die essentiellen Aminosäuren der OMYsd1x- und AOXlar7-Lyophilisate verglichen mit denen in Fisch- und Sojabohnenmehl übersichtlich dargestellt.

Tab. 5 | Vergleich der absoluten Konzentrationen [g/100g] essentieller Aminosäuren in gefriergetrockneten AOXlar7 bzw. OMYsd1x Zellen, Fischmehl und Sojabohnenmehl.

Aminosäure	AOXlar7	OMYsd1x	FM*	SBM*
Arg	1,73	4,18	4,40	3,70
His	1,23	1,56	2,05	1,30
Ile	1,26	3,08	3,16	2,15
Leu	3,09	5,17	5,19	4,05
Lys	2,28	5,11	5,46	3,40
Met	0,51	1,75	2,00	0,70
Phe	1,15	2,94	2,80	2,35
Thr	0,09	3,20	2,82	2,05
Val	1,77	3,81	3,72	2,35
Summe	13,11	30,80	31,60	22,05

FM: Fischmehl, SBM: Sojabohnenmehl, * Daten gemittelt aus [Ayadi *et al.* 2012]

Neben den essentiellen Aminosäuren sind weitere nicht essentielle Aminosäuren in den Fischzell-Lyophilisaten enthalten, die durchaus von ernährungsphysiologischem

Interesse sind. Darunter ist z.B. Taurin, eine nichtessentielle Aminosulfonsäure, die für mehrere karnivore Fischarten bedingt essentiell ist [Gaylord *et al.* 2006]. In beiden untersuchten Fischzellkulturen konnte Taurin mit einem Gehalt von 0,5 g je 100 g bestimmt werden. Taurin wird im Fisch normalerweise endogen, ausgehend von Methionin über Cystein synthetisiert und zeigte in experimentellen Fütterungsstudien einen nachhaltigen Einfluss auf das Wachstum einer japanischen Flunderart (*Paralichthys olivaceus*) [Takeuchi 2001]. Pflanzliche Ersatzmehle enthalten üblicherweise keine signifikanten Mengen an Taurin. So konnten beispielsweise Gaylord *et al.* einen Tauringehalt von 0,2 g je 100 g im Fischmehl bestimmen, der eines ebenfalls analysierten pflanzlichen Mehls lag allerdings unterhalb der Nachweisgrenze [Gaylord *et al.* 2006].

4.1.2 Fettgehalt und Fettsäurezusammensetzung

Wie bereits für den Proteingehalt erläutert wurde, ist auch hier die Bezeichnung Gesamtfettsäuregehalt, berechnet aus der Summe der analytisch erfassten Fettsäuren, mit dem Fettgehalt gleichgesetzt. In diesem Sinne konnte für beide Fischzellkulturen ein nahezu identischer Fettgehalt bestimmt werden. Mit etwas mehr als 6 g je 100 g Fischzell-Lyophilisat enthalten die *in vitro* kultivierten Fischzellen in etwa so viel Fett wie ein traditionell eingesetztes Fischmehl, welches üblicherweise zwischen 6 g und 10 g Fett enthält [Cho und Kim 2010]. Obwohl augenscheinlich eine Korrelation des Fettgehalts der Fischzellen und dem Fischmehl besteht, muss jedoch beachtet werden, dass während der Fischmehlherstellung eine lipophile Phase als Fischöl abgetrennt wird, wodurch in dem Fischmehl lediglich ein Restgehalt an Fett enthalten bleibt [Cho und Kim 2010]. Demnach entspricht der Fettgehalt der untersuchten Fischzellkulturen strenggenommen lediglich dem Restfettgehalt des Fischmehls.

Der Restfettgehalt des Fischmehls ist hauptsächlich dadurch gekennzeichnet, dass die Omega-3 LC-PUFAs EPA und DHA in besonders hohen Anteilen enthalten sind [Gatlin *et al.* 2007, Cho und Kim 2010]. Damit sind diese Fettsäuren das exklusive und zugleich ernährungsphysiologisch wertvolle Merkmal des Fischmehls. Ein beispielsweise ausgewähltes Fischmehl, gewonnen aus dem Atlantischen Menhaden (*Brevoortia tyrannus*), enthält rund 12 % EPA und 8 % DHA [Cho und Kim 2010]. Von den durchschnittlich 6,5 g Fett je 100 g sind ungefähr 2 g den Omega-3 Fettsäuren zuzuordnen und der n-3 / n-6 Quotient hat einen Wert von rund 13 [Gatlin *et al.* 2007, Cho

und Kim 2010]. Die in dieser Arbeit untersuchten Fischzell-Lyophilisate enthielten demgegenüber lediglich rund 0,3 g Omega-3 Fettsäuren und einen n-3 / n-6 Quotient, welcher deutlich kleiner als 0,5 war. Damit enthielten die Fischzell-Lyophilisate rund achtmal weniger Omega-3 Fettsäuren als das Fischmehl des Menhaden. Der Grund für den geringen Anteil an Omega-3 Fettsäuren liegt vermutlich in der Fettsäurezusammensetzung des verwendeten Serumzusatzes [Ghioni *et al.* 1997b], eine Vermutung, die bereits in frühen Untersuchungen postuliert wurde. Tocher *et al.* analysierten die Fettsäurezusammensetzung unterschiedlicher, in FKS haltigen Nährmedien kultivierter Fischzellkulturen und stellten fest, dass der *in vitro* Anteil der Omega-3 Fettsäuren fünf- bis zehnmal geringer war, als in vergleichbaren *in vivo* Geweben [Tocher *et al.* 1988]. Auch der äußerst geringe n-3 / n-6 Quotient scheint typisch für *in vitro* kultivierte Fischzellen zu sein und ist möglicherweise ein Anzeichen eines zellulären Defizits an Omega-3 PUFAs [Tocher und Sargent 1990].

Bezogen auf die Zusammensetzung der enthaltenen Fettsäuren konnte in der Literatur eine Arbeit gefunden werden, in der ebenfalls *in vitro* kultivierte Hautzellen der Regenbogenforelle beschrieben wurden. Ghioni *et al.* untersuchten dabei die qualitativen Veränderungen der Fettsäuren in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer und stellten fest, dass die Fettsäurezusammensetzung der Primärzellkultur vergleichbar mit der Fischhaut *in vivo* ist und sich im Verlauf der Kultivierung drastisch ändert [Ghioni *et al.* 1997a, Ghioni *et al.* 1997b]. Über die Dauer von neun Subkultivierungen konnten sie unter anderem einen Rückgang der Gesamtheit aller PUFAs sowie der Omega-3 Fettsäuren zeigen, wohingegen die Omega-6 Fettsäuren leicht zunahmen. In der Summe konnte eine deutliche Reduktion des n-3 / n-6 Quotienten festgestellt werden [Ghioni *et al.* 1997b]. Obwohl Ghioni *et al.* ihre Regenbogenforellenzellen mit einem 10 %igen Zusatz an FKS und bei 22 °C kultivierten, lassen sich die dabei beobachteten *in vitro* Tendenzen interessanterweise gut auf die hier untersuchten und viel länger kultivierten OMYsd1x Zellen übertragen. Für die bessere Nachvollziehbarkeit sind die für diese Arbeit relevanten Tendenzen in der Tab. 6 übersichtlich aufgelistet.

Neben der Fettsäureanalyse haben Ghioni *et al.* indirekt die Aktivitäten jener Enzyme bestimmen können, die an der Fettsäuremetabolisierung beteiligt sind. Dabei konnten sie beobachten, dass sich die Aktivität der Delta-5 Desaturase und der Delta-6 Desaturase mit zunehmender Kultivierungsdauer erhöht [Ghioni *et al.* 1997b]. Diese Beobachtung ist aller Wahrscheinlichkeit nach auch die Begründung dafür, dass DHA in

Tab. 6 | Vergleich mehrfach ungesättigter Fettsäuren [%] der Regenbogenforellenhaut *in vivo* und *in vitro*.

Fettsäure- klasse	Haut <i>in vivo</i> *	Primär- kultur**	4 Monate später**	<i>in vitro</i> Tendenz	OMYsd1x Passage 27
n-3 PUFA [%]	35,4	25,0	9,2	↓	3,9
n-6 PUFA [%]	4,4	8,6	11,8	↑	14,5
PUFA [%]	40,4	35,2	26,1	↓	19,9
n-3/n-6	8,2	2,9	0,8	↓	0,3

*n-3: Omega-3, n-6: Omega-6, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäure, ↑: steigende Tendenz, ↓: fallende Tendenz, * Daten übernommen aus [Ghioni et al. 1997a] ** Daten übernommen aus [Ghioni et al. 1997b], die Angaben in (%) beziehen sich auf den Fettanteil.*

den OMYsd1x Zellen mit einem relativen Anteil von 2,7 % enthalten war, obwohl in dem hierbei verwendeten Zellkulturmedium keine DHA detektiert werden konnte. Da die physiologische Zusammensetzung der Fettsäuren sowohl durch die Nahrungsfette, als auch durch die endogene Metabolisierungskapazität bestimmt wird [Ruyter et al. 2003], ist es durchaus nachvollziehbar, dass DHA während der *in vitro* Kultivierung metabolisiert worden ist.

In dem vorliegenden Forschungsvorhaben konnte anschaulich gezeigt werden, dass ein Zusatz von 130 μ M ALA im Nährmedium zu einem signifikanten Anstieg des ALA-Gehalts in beiden untersuchten Fischzellkulturen führte. Zudem wurde bei den AOXlar7 Zellen beobachtet, dass dieser Zusatz zu vesikulären Tröpfchen führte, welche sich durch OilRedO anfärben ließen. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Lipidtröpfchen aus ALA bestehen, da diese immer dann entstanden, wenn die Zellen mit Nährmedium kultiviert wurden, welches mit 130 μ M ALA versetzt worden war. Vergleichbare Lipidtröpfchen konnten auch bei anderen als den hier untersuchten Fischzellkulturen beschrieben werden. In diesem Fall vermuteten die Autoren, dass es sich dabei um Speicherlipide handelt, welche sich infolge hoher Zufuhr extern zugesetzter Fettsäure intrazellulär bildeten [Tocher et al. 1989, Tocher und Dick 1990]. Übereinstimmend mit dieser Vermutung reduzierten sich die Lipidtröpfchen bei geringeren Zusätzen an ALA. Bei den OMYsd1x Zellen wurden zwar ebenfalls vesikuläre morphologische Veränderungen beobachtet, ein lipophiler Nachweis gelang hier allerdings nicht. Dieses Verhalten lässt vermuten, dass die OMYsd1x Zellen tendenziell weniger Speicherlipide ausbilden als die AOXlar7 Zellen. Für *in vitro* kultivierte Haut-

zellen der Regenbogenforelle konnte anhand von radioaktiv markierten Fettsäuren gezeigt werden, dass sich rund 98 % einer zusätzlich zugesetzten ALA in Form von Membranlipiden wiederfinden lassen [Ghioni *et al.* 1997b]. Diese Untersuchungen bestätigen damit das Ausbleiben von Speicherlipiden bzw. Lipidtröpfchen bei den OMYsd1x Zellen. Die dennoch aufgetretenen morphologischen Veränderungen lassen sich womöglich durch die Vermutung von Viegas *et al.* erklären. An einer Zelllinie der Dorade (*Sparus aurata*) konnten sie beobachten, dass der Zusatz von 100 μM AA, EPA oder DHA zu vergleichbaren Veränderungen führt, welche als zelluläre Stressreaktion gedeutet wurden [Viegas *et al.* 2012].

Neben dem signifikanten Anstieg der ALA in den Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zufuhr von 130 μM ALA bei beiden untersuchten Langzeit-Fischzellkulturen zu einer signifikanten Zunahme des Anteils an EPA führte, wohingegen sich der Anteil an DHA sowohl bei den OMYsd1x, als auch bei den AOXlar7 Zellen leicht reduziert. Dieses gegensätzlich verlaufende und spezieübergreifende Verhalten lässt sich vermutlich durch die Betrachtung der enzymatischen Fettsäuremetabolisierung (Abb. 2) erklären. Ausgehend von der essentiellen Fettsäure ALA werden die biologisch aktiven Fettsäuren EPA und DHA synthetisiert [Tocher 2003]. Der dafür verantwortliche Stoffwechselweg konnte bereits vor rund 20 Jahren für die Regenbogenforelle aufgeklärt werden und zeigt eine sequenzielle Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen [Buzzi *et al.* 1996, 1997]. Die dabei unter anderem beteiligte Delta-6 Desaturase hat gegenüber anderer Desaturasen eine besondere Stellung, da sie zuerst an der Bildung von EPA und anschließend an der von DHA beteiligt ist [Tocher *et al.* 2003]. Wird nun eines ihrer Substrate durch den Zusatz an ALA im Zellkulturmedium überproportional erhöht, verändert sich das Verhältnis aller möglichen Substrate untereinander. Die daraus resultierende Konkurrenz der unterschiedlich konzentrierten Substrate um die Bindungstasche der Delta-6 Desaturase, führt vermutlich dazu, dass der Anteil an EPA ansteigt, wohingegen sich der Anteil an DHA leicht reduziert.

Zusätzlich zu den bisherigen Beobachtungen konnte in beiden untersuchten Fischzellkulturen gezeigt werden, dass der Zusatz von 130 μM ALA dazu führt, dass der Anteil der SFAs leicht ansteigt, wohingegen der der MUFAs sehr stark abnimmt. Darüber hinaus war auffällig, dass trotz zusätzlicher ALA im Nährmedium der Fettgehalt der Lyophilisate leicht reduziert ist (Abb. 17 und Abb. 18). Dieses Verhalten zeigt anschaulich, dass die zusätzlich zugeführte ALA zu Ungunsten der MUFAs aufgenom-

men wurde. Diese ebenfalls speziesübergreifende Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die Eigenschaften biologischer Membranen erklären. Da der hochgradig ungeordnete bzw. flüssig-kristalline Zustand der Lipiddoppelschicht in erster Linie durch die physikalischen Eigenschaften der enthaltenen Fettsäuren bestimmt wird [Hazel 1995] verändern sich, aufgrund der zusätzlich aufgenommenen ALA, höchstwahrscheinlich die charakteristischen Merkmale der betroffenen Membranen. Für die Aufrechterhaltung der Homöostase scheint es daher plausibel, die Zusammensetzung der Membranlipide so umzugestalten, dass die physiologische Integrität der Membranen erhalten bleibt. Bei der Regulation bzw. dem Erhalt der physiologischen Membraneigenschaften ist die HVA der führende Mechanismus [Hazel 1995, Guschina und Harwood 2006b]. Die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen der Fettsäureklassen stehen im exakten Einklang mit den kompensatorischen Effekten der HVA. Durch eine vermutliche Erhöhung der Fluidität durch die zusätzlich zugeführte ALA kommt es zu einer Reduktion der MUFAs und zu einem Anstieg der SFAs.

Die Reduktion der Kultivierungstemperatur führte in beiden Fischzellkulturen zu qualitativ und quantitativ unterschiedlich stark ausgeprägten Effekten. In diesem Zusammenhang gilt, dass die Veränderung der Umgebungstemperatur der bedeutendste Umweltstressor für poikilotherme Organismen ist [Guschina und Harwood 2006b]. In Fischen beeinflusst eine Reduktion der Umgebungstemperatur sowohl die temperaturabhängigen physiologischen Stoffwechselprozesse, als auch die Fluidität bzw. die Funktion der biologischen Membranen, wodurch adaptive Anpassungsmechanismen aktiviert werden [Hazel 1995, Ruyter *et al.* 2003, Tocher *et al.* 2004, Guschina und Harwood 2006b, Vagner und Santigosa 2011, Snyder *et al.* 2012]. Obwohl die qualitativen Effekte unterschiedlich stark ausgeprägt waren, konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten Langzeit-Fischzellkulturen der Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Zusammensetzung der Fettsäuren anschaulich bestätigt werden. Entsprechend der kompensatorischen Anpassung im Rahmen der HVA enthielten die Fischzellkulturen nach der Absenkung der Kultivierungstemperatur einem signifikant erhöhten Anteil an den LC-PUFAs AA und DHA, wohingegen der Anteil der SFAs reduziert war. Gemeinsam mit Gottwald war es gelungen, die Genexpression der Delta-6 Desaturase der OMYsd1x Zellen zu untersuchen. Entsprechend den *in vivo* Ergebnissen von Tocher *et al.* konnte dabei gezeigt werden [Tocher *et al.* 2004], dass die Reduktion der Kultivierungstemperatur um 10 °C zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression der Delta-6 Desaturase *in vitro* führt [Gottwald 2012].

Obwohl die von der HVA abgeleiteten qualitativen Effekte zumindest tendenziell vergleichbar waren, konnte bei beiden Fischzellkulturen ein erheblicher quantitativer Unterschied im Fettgehalt festgestellt werden. Infolge der Absenkung der Kultivierungstemperatur reduzierte sich der Fettgehalt bei den OMYsd1x Zellen um rund 8 %, wohingegen der Fettgehalt der AOXlar7 Zellen um beachtliche 22 % zunahm. Nach eingehender Literaturrecherche konnte diesbezüglich keine vergleichbare Untersuchung an *in vitro* kultivierten Fischzellen gefunden werden. Bei tierexperimentellen Fütterungsstudien an Regenbogenforellen konnte jedoch beobachtet werden, dass die Absenkung der Hälterungstemperatur um 5 °C zu einem erhöhten Protein- und einem reduzierten Fettgehalt führt [Weatherley und Gill 1983]. Diese generelle Beobachtung lässt sich jedoch nicht auf alle Gewebe übertragen, denn bei den roten Muskelfasern wurde ein gegensätzliches Verhalten beobachtet [Ingemansson *et al.* 1993]. Auch im Streifenbarsch (*Morone saxatilis*) konnten vergleichbare Ergebnisse gezeigt werden [Guderley 2004, Richard 2006]. Als möglichen Grund für einen veränderten Fettgehalt postulieren Caldwell und Vernberg (1970) eine temperaturbedingte quantitative Veränderung der Speicherlipide. Es bleibt daher ungeklärt, ob der reduzierte bzw. deutlich erhöhte Fettgehalt in den untersuchten Fischzellkulturen ein speziesspezifisches Phänomen oder ein Artefakt der jeweiligen *in vitro* kultivierten Zellpopulation ist.

Aus physiologischer Sicht lassen sich die bis hierhin beschriebenen Einzeleffekte möglicherweise durch eine speziesspezifische Metabolisierungskapazität der Fettsäuren erklären. Tocher konnte in einer zusammenfassenden Übersichtsarbeit zeigen, dass die Fettsäuremetabolisierung *in vivo* von den Eigenschaften des Habitats abhängt, denn die meisten Süßwasser- und Wanderfische decken ihren physiologischen Bedarf an EPA und DHA alleinig durch die Metabolisierung der essentiellen Fettsäure ALA. Dem gegenüber besitzen die meisten marinen Fischarten keine ausreichende Metabolisierungskapazität, um ihren Bedarf an EPA und DHA zu decken, weshalb diese Arten auf die zusätzliche Zufuhr dieser Fettsäuren über das Futter angewiesen sind. Für sie sind EPA und DHA semiessentielle Fettsäuren [Tocher 2010]. Abgesehen davon konnte beobachtet werden, dass besonders die exklusiv karnivoren Arten eine sehr viel schlechtere Fettsäuremetabolisierung aufweisen, als herbivore bzw. omnivore Fischarten [Sargent *et al.* 2002]. Neben diesen speziesspezifischen Charakteristika konnte beispielsweise für den Offiziersbarsch (*Rachycentron canadum*) anhand von mRNA Expressionsanalysen gezeigt werden, dass die Expression der Del-

ta-6 Desaturase gewebspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt ist [Zheng *et al.* 2009]. Es ist daher offensichtlich, dass die in dieser Arbeit festgestellten qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen OMYsd1x und AOXlar7 Zellen in erster Linie durch die habitat- bzw. ernährungsbedingten Unterschiede der Regenbogenforelle und des Atlantischen Störs grundlegend determiniert sind und lediglich den jeweiligen gewebspezifischen Metabolisierungskapazitäten entsprechen können. Allerdings gelten hinsichtlich der Fettsäuremetabolisierung (Abb. 2) in Fischen insbesondere das intestinale und das hepatische Gewebe als metabolisch aktiv. Aus diesem Grund war es besonders überraschend, dass sowohl bei den OMYsd1x Zellen gewonnen aus der Vollhaut, als auch bei den AOXlar7 Zellen gewonnen aus larvalem Gewebe sowohl EPA, als auch DHA in zum Teil überaus hohen Konzentrationen gefunden werden konnten. Dies könnte dadurch begründet werden, dass eine zeitintensive hepatische Fettsäuremetabolisierung mit anschließendem Transport der Fettsäuren in die Gewebe möglicherweise keinen ausreichend Schutz für kurzfristig auftretende Temperaturschwankungen im Habitat darstellt. Unter dieser Voraussetzung wäre eine gewebspezifische bzw. zelluläre Metabolisierungskapazität vermutlich die schnellste physiologische Anpassung.

Nichtsdestotrotz handelt es sich bei den hier untersuchten Zellen um *in vitro* bzw. langzeitkultivierte Fischzellkulturen, weshalb es durchaus als möglich erscheint, dass die festgestellten qualitativen und quantitativen Ausprägungen auch durch die semi-kontinuierliche Kultivierung der Zellen in artifizieller Umgebung beeinflusst sein könnten. Dieser Gedanke begründet sich zum einen auf vergleichende Genexpressionsanalysen und zum anderen auf immunocytochemischen Untersuchungen. Bei vergleichenden Genexpressionsanalysen humaner Muskelzellen konnte beobachtet werden, dass die Isolation aus adultem Gewebe und der Transfer in eine Primärkultur einen derart starken Einfluss auf die Zellen ausübt, dass sich das Expressionsprofil einer Vielzahl von Genen signifikant ändert [Zaitseva *et al.* 2006]. Ebenfalls konnten immunocytochemische Untersuchungen an humanen Pankreaszellen zeigen, dass neben der Isolation auch die anschließende *in vitro* Kultivierung bzw. die Subkultivierung der Zellen das Auftreten und das Ausmaß unterschiedlicher Markerproteine nachhaltig beeinflusst [Rapoport *et al.* 2009]. Bezogen auf den Fettsäuremetabolismus wurde bereits diskutiert, dass sich die Aktivität der beteiligten Desaturasen mit zunehmender Kultivierungsdauer signifikant erhöht [Ghioni *et al.* 1997b]. Es kann daher nicht aus-

geschlossen werden, dass die in dieser Arbeit dargestellten Einzeleffekte durch die jeweiligen *in vitro* Kultivierungsbedingungen zusätzlich beeinflusst wurden.

Die Kombination eines Zusatzes an 130 μM ALA mit der anschließenden Reduktion der Kultivierungstemperatur um 10 °C führte in beiden Fischzellkulturen zu einer Kombination der bereits dargestellten Einzeleffekte. Dabei konnte für die AOXlar7 Zellen gezeigt werden, dass sich durch die Halbierung des Zusatzes an ALA sowohl der Anteil an EPA, als auch der an DHA signifikant erhöhte. Der gleichermaßen signifikant gesunkene Anteil an ALA deutet auf eine Inhibition des Fettsäuremetabolismus durch die überschüssig zugesetzte ALA hin. Diese Vermutung konnte durch die bereits erwähnten Genexpressionsanalysen zumindest für die OMYsd1x Zellen bestätigt werden. Die durch die Reduktion der Kultivierungstemperatur erhöhte Genexpression der Delta-6 Desaturase wird durch steigende Zusätze an ALA zunehmend herabgesetzt [Gottwald 2012]. Damit widersprechen sowohl die quantitativen Fettsäureanalysen dieser Arbeit, als auch die molekularbiologischen Untersuchungen von Gottwald den Ergebnissen von Tocher und Sargent. Sie konnten zwar zeigen, dass zwischen 90 % und 98 % der zugesetzten ALA in den Membranlipiden wiedergefunden wurde, die Reduktion der Zellkulturtemperatur um 12 °C führte allerdings weder bei Lachszielen, noch bei den Zellen der Regenbogenforelle oder des Steinbutts (*Scophthalmus maximus*) zu einer Erhöhung der Omega-3 LC-PUFAs [Tocher und Sargent 1990].

Durch die Halbierung des Zusatzes an ALA erhöhte sich in den AOXlar7 Zellen neben den Anteilen an EPA und DHA auch der Fettgehalt. Mit rund 8,7 g je 100 g Lyophilisat, war dieser gut 38 % höher als bei den Zellen, die unter normalen Kultivierungsbedingungen kultiviert worden waren. Der signifikant erhöhte Fettgehalt bei reduzierten Kultivierungstemperaturen lässt sich besonders anschaulich anhand der quantitativen Fettsäureanalysen nachvollziehen (Tab. 13). Die Reduktion der Kultivierungstemperatur führte in erster Linie dazu, dass der Anteil der zugesetzten ALA in den AOXlar7 Zellen verdoppelt wurde. Gleiches konnte sowohl bei einer Zellkultur der Regenbogenforelle, als auch bei einer des Steinbutts beobachtet werden [Tocher und Sargent 1990]. Die OMYsd1x Zellen verhielten sich hingegen völlig entgegengesetzt, denn deren Anteil der zusätzlich zugesetzten ALA wurde durch die Absenkung der Kultivierungstemperatur halbiert (Tab. 12). Durch die Reduktion des Zusatzes an ALA auf 65 μM kam es bei beiden untersuchten Zellkulturen zu einer signifikanten Abnahme des Anteils an ALA in den Zellen. Obwohl sich bei den OMYsd1x Zellen die Sum-

me aller Omega-3 Fettsäuren halbierte, reduziert sich die der AOXlar7 Zellen lediglich um rund 20 %. Da gleichzeitig der Anteil der MUFAs nahezu verdoppelt wurde, blieb der Fettgehalt der OMYsd1x Zellen relativ betrachtet konstant, wohingegen der Fettgehalt der AOXlar7 Zellen weiter anstieg. Dieses Ergebnis verdeutlicht das bereits dargestellte Abhängigkeitsverhältnis zwischen ALA und den MUFAs.

In der Zusammenfassung konnte mit den in dieser Arbeit untersuchten Kultivierungsbedingungen anschaulich demonstriert werden, dass sich der Anteil an EPA und DHA in beiden Langzeit-Fischzellkulturen während der *in vitro* Kultivierung erhöhen lässt. Dabei erreichte das Fischzell-Lyophilisat der AOXlar7 Zellen eine Fettsäurezusammensetzung, die in vielerlei Hinsicht vergleichbar mit der des Fischmehls des Atlantischen Menhaden ist. Obwohl sich die Fettsäurezusammensetzung der OMYsd1x Zellen nur geringfügig in Richtung höherer EPA und DHA Gehalte anpassen ließ, zeigen diese Zellen dennoch einen überaus hohen Proteingehalt und eine nahezu äquivalente Aminosäurezusammensetzung. Entsprechend dieser Untersuchungen ist es möglich, in Abhängigkeit der verwendeten Zellkultur, sowohl den Protein-, also auch den Fettanteil des Fischmehls durch *in vitro* kultivierte Fischzellen zu ersetzen. Eine abschließende Gegenüberstellung der ernährungsphysiologischen Charakterisierung der untersuchten Fischzellkulturen verglichen mit den Literaturwerten dieses Fischmehls ist in der Tab. 7 dargestellt.

Die Kultivierung der Langzeit-Fischzellkulturen in einem Nährmedium, welches zusätzlich mit ALA versetzt worden war, führte sowohl bei den OMYsd1x Zellen, als auch bei den AOXlar7 Zellen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der membranären Lipidperoxide. Dieser, durch eine zusätzlich zugeführte PUFA verursachte Anstieg der Lipidperoxidation, konnte bereits ausführlich an humanen Leberkarzinomzellen untersucht und beschrieben werden. Auch wenn der Zusammenhang zwischen der jeweiligen Fettsäure und dem Anstieg der Lipidperoxide nicht abschließend geklärt werden konnte, vermuten die Autoren dennoch, dass die Art der verwendeten PUFA ursächlich für den Anstieg der Lipidperoxidation ist [Araseki *et al.* 2005]. Da in früheren *in vitro* Untersuchungen an murinen Lymphomzellen gezeigt werden konnte, dass die Oxidierbarkeit ungesättigter Fettsäuren mit der Anzahl der olefinischen Bindungen linear zunimmt [Wagner *et al.* 1994], und die dreifach ungesättigte ALA zudem eine vergleichsweise hohe Instabilität gegenüber oxidativen Veränderungen aufweist [Miyashita *et al.* 1993], ist es durchaus nachvollziehbar, dass die Aufnahme der

zusätzlichen ALA in die Zellmembranen einen Einfluss auf die Lipidperoxidation haben kann.

Darüber hinaus belegen mechanistische Untersuchungen, dass die nichtenzymatische Oxidation ungesättigter Fettsäuren über radikalische Zwischenstufen verläuft und sich daher wie eine radikalische Kettenreaktion verhält [Gardner 1989, Yin *et al.* 2011]. Eine Erhöhung der membranären Lipidperoxide durch ALA könnte sich, begünstigt durch den flüssig-kristallinen Zustand biologischer Membranen, auch auf weitere ungesättigte Fettsäuren innerhalb der Membran ausbreiten. Diese theoretische Überlegung könnte erklären, warum der konzentrationsabhängige Anstieg der Lipidperoxidation eher einem exponentiellen Verlauf folgt, obwohl die Konzentration der zugesetzten ALA lediglich linear anstieg. Entsprechend dieser Vermutung zeigten Wagner *et al.* an murinen Lymphomzellen, dass die Oxidierbarkeit von unterschied-

Tab. 7 | Ernährungsphysiologischer Vergleich zwischen Fischmehl und dem AOXlar7- bzw. OMYsd1x-Lyophilisat.

	Fischmehl (Menhaden)	AOXlar7- Lyophilisat [‡]	OMYsd1x- Lyophilisat [‡]
Arginin (g/100 g)	3,75*	1,73	4,18
Lysin (g/100 g)	4,72*	2,28	5,11
Methionin (g/100 g)	1,75*	0,51	1,75
Threonin (g/100g)	2,5*	0,09	3,20
Proteingehalt (g/100g)	65 – 72*	28	62
SFA (%)	≥34,2**	32,5	24,5
MUFA (%)	≥28,1**	28,1	43,9
EPA (%)	12,2**	10,2	2,3
DHA (%)	7,9**	5,4	3,1
n-3 PUFA (%)	22,6**	26,0	13,9
n-3 PUFA (g/100g)	~2*	2,3	0,85
PUFA (%)	24,3**	39,5	31,7
Fettgehalt (g/100g)	5 – 8*	8,7	6,0
n-3/n-6	13,3**	2,4	0,9

MUFA: einfach ungesättigte Fettsäure, n-3: Omega-3, n-6 Omega-6, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäure, SFA: gesättigte Fettsäure * Daten übernommen aus [Gatlin *et al.* 2007], ** Daten übernommen aus [Cho und Kim 2010], ‡ + 65 µM ALA nach Temperaturreduktion um 10 °C, die Angaben in (%) beziehen sich auf den Fettanteil.

lichen PUFAs exponentiell ansteigt, je höher deren Gehalt in den Zellen ist [Wagner *et al.* 1994]. Obwohl unter normalen Kultivierungsbedingungen lediglich der Zusatz von 130 μM ALA berücksichtigt wurde, konnte durch die quantitativen Fettsäureanalysen dennoch belegt werden, dass sowohl bei den OMYsd1x, als auch bei den AOXlar7 Zellen der Gehalt der PUFAs durch den Zusatz an ALA stark zunimmt. Für eine abschließende Beurteilung des konzentrationsabhängigen aber offensichtlich nichtlinearen Anstiegs der Lipidperoxidation müsste daher die quantitative Fettsäureanalyse unter normalen Kultivierungsbedingungen um die Zusätze 32,5 μM ALA und 65 μM ALA ergänzt werden.

Die chemisch reaktiven Zwischenprodukte und die stabileren Lipidperoxide verändern sowohl die chemischen Eigenschaften, als auch die physiologische Organisation biologischer Membranen. Zudem kommt es durch die zum Teil radikalisch induzierten Reaktionen mit Proteinen, Lipiden, Kohlehydraten oder der DNA zu chemischen Modifikationen, welche möglicherweise deren physiologische Funktion beeinflussen können. Lipidperoxide sind daher Ausgangspunkte für zytotoxische und mutagene bzw. kanzerogene Veränderungen der Zelle [Niki 2009]. Um sich vor diesen chemischen Modifikationen zu schützen, besitzen Fische eine Vielzahl enzymatischer und nichtenzymatischer Mechanismen, welche antioxidativ wirksam sind [Martinez-Alvarez *et al.* 2005, Grim *et al.* 2011]. Diese antioxidativen Mechanismen sind vermutlich ein Grund dafür, warum durch die Reduktion der Kultivierungstemperatur die relative Lipidperoxidation in den Zellen gesenkt wurde. Die dabei unter anderem beteiligten Enzyme zeigen ein Aktivitätsoptimum, welches in dem Temperaturbereich liegt, in dem sich die Spezies natürlicherweise aufhält [Abele *et al.* 2002]. Da die Kultivierungstemperatur von Fischzellkulturen üblicherweise weit oberhalb dieser Temperatur liegt [Wolf und Ahne 1982, Bols *et al.* 1992], erscheint es durchaus plausibel, dass die Reduktion der Kultivierungstemperatur um 10 °C zu einer Erhöhung der Aktivität antioxidativ wirkender Enzyme führen könnte, wodurch im Umkehrschluss die Lipidperoxidation reduziert wird. Ebenfalls könnte durch die Verringerung der Temperatur auch ein direkter Einfluss auf die Reaktionskinetik der radikalischen Kettenreaktion bestehen, wodurch wiederum eine geringere relative Lipidperoxidation resultieren würde.

Bei den AOXlar7 Zellen wurde diesbezüglich eine interessante Beobachtung gemacht. Werden diese Zellen unter normalen Kultivierungsbedingungen mit einem Zusatz von 32,5 μM ALA kultiviert, kommt es, bezogen auf die unbehandelten Kontroll-

zellen, zu einer Reduktion der membranären Lipidperoxidation. Dieses auffällige Verhalten der AOXlar7 Zellen deutet möglicherweise darauf hin, dass eine wiederholte Zugabe von ALA zu einer Modulation der zellulären und antioxidativ wirkenden Mechanismen führt. Ein ganz ähnliches Verhalten konnte an *in vitro* kultivierten Enterozyten des Karpfens (*Cyprinus carpio*) beobachtet werden. Durch die kupferinduzierte Erhöhung des oxidativen Stresses wurde neben einer Zunahme der Lipidperoxide auch eine kompensatorische Anpassung der antioxidativ wirkenden Enzyme registriert [Jiang *et al.* 2011]. Darüber hinaus lassen die Ergebnisse verschiedener tierexperimenteller Untersuchungen vermuten, dass in Fischen ein scheinbar kausaler Zusammenhang zwischen dem Anteil oxidierbarer Fettsäuren und dem Gehalt an antioxidativ wirkenden Enzymen besteht [Grim *et al.* 2011]. Diese vermutlich synergistisch zueinander stehenden Effekte könnten eine mögliche Begründung dafür sein, warum bei den AOXlar7 Zellen eine Absenkung der Kultivierungstemperatur nicht nur zu einer deutlichen Reduktion der relativen Lipidperoxidation führte, sondern viel mehr noch zu Oxidationswerten, welche nahe bei bzw. unterhalb der, der Kontrollzellkultur lagen. Betrachtet man dabei die qualitative Fettsäureanalyse der AOXlar7 Zellen, so stellt man fest, dass der Anteil an EPA und DHA von 0,17 g je 100 g auf bis zu 1,35 g je 100 g angestiegen war. Da diese Zellen offensichtlich physiologisch bedingt in der Lage zu sein scheinen, große Mengen an fünffach bzw. sechsfach ungesättigten Fettsäuren metabolisch zu synthetisieren, so erscheint es physiologisch nachvollziehbar, dass diese Zellen in gleicherweise bedeutende antioxidativ wirkende Mechanismen vorhalten müssen, um diese äußerst oxidationsanfälligen Fettsäuren vor den mitunter zytotoxischen oxidativen Veränderungen zu bewahren. Möglicherweise besteht auch bei den AOXlar7 Zellen ein Zusammenhang zwischen dem Anteil an LC-PUFAs und der Aktivität oder dem Gehalt an antioxidativ wirkenden Enzymen.

4.2 Wachstumsverhalten

Für eine zukünftige Verwertung von *in vitro* kultivierten Fischzellen als Fischmehlersatz oder Futtermittelzusatz würden große Mengen an Zellen benötigt werden. Sollen diese aus langfristig kultivierten Zellen entstehen, so müssten sich diese Zellen über eine Vielzahl von Generationen kultivieren lassen. Die in dieser Arbeit untersuchten Langzeit-Fischzellkulturen konnten bereits über mehrere Jahre kultiviert, eingefroren,

wieder aufgetaut und weiterkultiviert werden. Während dieses Zeitraumes wurde bei den OMYsd1x Zellen eine Passagenzahl von 108 erreicht, bei den AOXlar7 Zellen liegt die höchste Passagenzahl bei 69. Bevor das vorliegende Forschungsvorhaben begonnen wurde, existierten weder für die OMYsd1x Zellen, noch für die AOXlar7 Zellen detaillierte Proliferationsanalysen, weswegen im Rahmen dieser Arbeit das Zellwachstum bei zunehmenden Passagenzahlen nähergehend untersucht wurde. Die in dieser Arbeit bestimmten Wachstumsparameter sind in der Tab. 8 zusammengefasst und übersichtlich dargestellt.

Tab. 8 | Wachstumsparameter von AOXlar7 und OMYsd1x Zellen am 3. bzw. 4. Tag nach der Einsaat der Zellen.

	AOXlar7 an Tag 3			OMYsd1x an Tag 4		
	P20	P40	P60	P20	P40	P60
Zellzahl [Zellen/cm ²]	8852	13487	14043	8806	9849	15758
mitotische Zellen [%]	~9	13	14	~17	~20	21
Faktor*	AOXlar7 Zellen 1,81			OMYsd1x Zellen 1,96		

**Faktor: Quotient aus den geometrischen Mittelwerten der Region M2 und M1 entsprechend der FACS Analyse und der softwareseitigen Auswertung*

Durch die Auftragung der gemessenen Zellzahlen als Wachstumskurven konnte eindeutig gezeigt werden, dass die kontinuierliche bzw. semikontinuierliche Kultivierung sowohl von OMYsd1x, als auch von AOXlar7 Zellen einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten hat. Dabei konnte zum einen festgestellt werden, dass die Zellen in Passage 60 die höchsten Zellzahlen aufweisen und zum anderen, dass sich die Verdopplungszeiten mit zunehmender Passagenzahl verkürzen. Vergleichbare Untersuchungen an Säugetierzellkulturen wurden bereits vor rund 20 Jahren durchgeführt. Ein ganz ähnliches Verhalten konnte beispielsweise an humanen Dickdarmkarzinomzellen [Lu *et al.* 1996] und an Lungenzellen des Hamsters [Peiser *et al.* 1993] beobachtet werden. Bei diesen Untersuchungen wurden Zellkulturen beschrieben, welche sich ausgehend von einem Zellmonolayer hin zu einem Zellmultilayer entwickelten, wodurch die Gesamtzellzahl je cm² erhöht war.

Diese frühen Zellstudien entsprechen dem Verhalten, wie es bei den OMYsd1x Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 24). Rakers beschrieb erstmals das Verhalten konfluenter OMYsd1x Zellen und zeigte anhand von Zeitrafferaufnahmen, dass sich aus den Bereichen der Zellmultilayer dreidimensionale organoide Strukturen bilden [Rakers 2012a]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Wachstumskurven ergaben die FACS-Analysen, dass die Zunahme der Zellzahl von einer gleichzeitig erhöhten Anzahl mitotischer Zellen begleitet wurde. Bei den OMYsd1x Zellen in Passage 60 waren rund 30 % mehr Zellen in der G₂-Phase bzw. in der Mitose als bei den Zellen in Passage 20. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die Beobachtungen von Foudah *et al.* (2009) erklären. Sie konnten an murinen mesenchymalen Stammzellen zeigen, dass eine genomische Instabilität sowohl zu neoplastischen Transformationen, als auch zur spontanen Immortalisierung führt, wodurch sich das Wachstum dieser Zellen erhöht. Auch an humanen hämatopoetischen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass die andauernde Zellteilung zu einer erhöhten Anfälligkeit für mutagene Veränderungen führt [Reya *et al.* 2001]. Diesbezüglich konnte bei den OMYsd1x Zellen in Passage 60 eine dritte Region im Dichtehistogramm gefunden werden, welche sich rechts oberhalb von der Region M2 befindet (Abb. 25). Typischerweise entstehen solche zusätzlichen Regionen durch Zellaggregate, welche fälschlicherweise als Einzelzellen registriert wurden. Abgesehen davon werden in dieser Region ebenfalls mitotischen Zellen registriert, deren Zellkerne durch eine mögliche mutagene Veränderung des Chromosomensatzes mehr Chromosomen aufweisen als sie physiologisch vorkommen. Es könnte also sein, dass das Vorhandensein dieser Region eine mögliche Bestätigung einer neoplastischen Transformation bzw. mutagenen Veränderung des Chromosomensatzes der OMYsd1x Zellen darstellt.

Obwohl die Untersuchungen der AOXlar7 Zellen sowohl hinsichtlich der Wachstumskurven, als auch bei der Bestimmung der relativen Anzahl mitotischer Zellen tendenziell vergleichbare Ergebnisse lieferten, konnten hierbei nur wenige Zellen in Zellmultilayern beobachtet werden. Bei zunehmender Passagenzahl kam es anders als bei den OMYsd1x Zellen vielmehr zu einer deutlichen Zunahme der Dichte des Zellrausens. Aus der Kultivierungserfahrung mit den AOXlar7 Zellen lässt sich daher ableiten, dass diese Zellen im konfluenten Stadium das Zellwachstum einstellen – sie sind kontaktinhibiert. Die allerdings deutlich voneinander abweichenden Zellzahlen lassen sich möglicherweise durch die Vermutung von Hughes *et al.* erklären. Sie vermuten,

dass es aufgrund der häufigen Subkultivierung zu einer *positiven Selektion* schneller wachsender Zellen kommt, die in kürzerer Zeit die zur Verfügung stehende Oberfläche besiedeln [Hughes *et al.* 2007], wodurch bei höheren Passagen in viel kürzerer Kultivierungszeit dichtere Zellmonolayer entstünden. Zusätzlich dazu konnte auch ein Unterschied bei den FACS-Histogrammen festgestellt werden. Das Histogramm der AOXlar7 Zellen lässt sich, anders als das der OMYsd1x Zellen, nicht eindeutig den entsprechenden Phasen des Zellzyklus zuordnen. In der Abb. 47 ist beispielsweise der DNA-Gehalt mitotischer Zellen schematisch dargestellt. Da der Chromosomensatz des Atlantischen Störs einerseits rund 110 Chromosomen zählt [Li *et al.* 1985], der zudem durch einen besonders hohen Anteil an Mikrosomen gekennzeichnet ist [Fontana *et al.* 2008] und sich andererseits unter den AOXlar7 Zellen zum Teil mehrkernige Zellen befinden (Abb. 20 e), kann die Zuordnung des DNA-Gehalts anhand des Zellzyklus erschwert worden sein. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind dies auch mögliche Umstände, die eine exakte Bestimmung des Faktors beeinträchtigt haben.

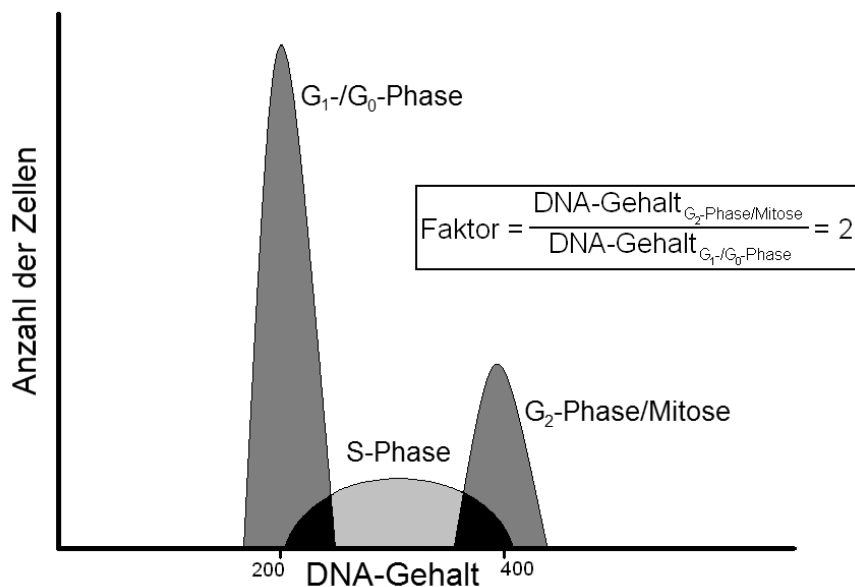


Abb. 47 | Bestimmung der Anzahl mitotischer Zellen anhand des DNA-Gehalts. Dargestellt ist das schematische Histogramm des DNA-Gehalts von humanen Schilddrüsenkrebszellen, angepasst nach Zeybek *et al.* 2011. Entsprechend des Zellzyklus enthalten die Zellen in der G_1 / G_0 -Phase einen einfachen Chromatid-Chromosomensatz, der während der S-Phase homolog repliziert wird und in der G_2 -Phase / Mitose als verdoppelter Chromatid-Chromosomensatz in der Zelle vorliegt. Im Idealfall nimmt dann der Faktor, errechnet aus dem Quotienten beider Maxima, einen Wert von 2 an. Durch die Bestimmung der Anzahl der Zellen in der G_2 -Phase / Mitose kann daher die relative Anzahl der mitotischen Zellen bestimmt werden.

Im Hinblick auf das Ziel dieses Forschungsvorhabens kann daher geschlussfolgert werden, dass die Veränderung des Wachstumsverhaltens hin zu höheren Wachstumsgeschwindigkeiten und höheren Zelldichten zunächst einen prinzipiellen Vorteil darstellen, sofern große Mengen *in vitro* kultivierter Fischzellen produziert werden sollen. Zu beachten ist allerdings, dass hoch proliferative Zellen, deren Metabolismus zunehmend in Richtung Zellteilung und Biomassezuwachs ausgerichtet ist, vermutlich weniger Energie und Zeitaufwand in Stoffwechselwege investiert, die nicht für die Proliferation dienlich sind. Es bleibt daher zu überprüfen, ob die metabolische Produktion der extrazellulären Matrixproteine bzw. der LC-PUFAs durch eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit nachteilig beeinflusst wird.

4.3 Zellkultur *scale-up* und Biomasseproduktion von AOXlar7 Zellen

In dem vorangestellten biologischen Teil dieser Arbeit konnte anhand der Aminosäure- bzw. Fettsäurezusammensetzungen gezeigt werden, dass das Lyophilisat *in vitro* kultivierter Fischzellen vergleichbare ernährungsphysiologische Eigenschaften aufweist, wie ein handelsübliches Fischmehl. Auf diese Weise konnte prinzipiell belegt werden, dass es biologisch möglich ist, einen Fischmehlersatz bzw. Futtermittelzusatz *in vitro* zu kultivieren. Wegen diesem grundlegenden Zwischenfazit wurde im folgenden Abschnitt untersucht, ob es darüber hinaus gelingt, die Fischzellkulturen in einen technisch kontrollierten Kultivierungsprozess zu überführen. Durch diesen Transfer können arbeitsintensive Abläufe umfangreicher Zellkulturen automatisiert und standardisiert werden, wodurch das Fundament für eine industrielle Produktion gelegt werden würde. Im Hinblick auf ein mögliches industrielles Produkt ist die Verfügbarkeit der LC-PUFAs EPA und DHA von besonderer Bedeutung [Olsen 2011], weshalb sich der technologische Teil dieser Arbeit auf die Kultivierung der AOXlar7 Zellen in Bioreaktorsystemen beschränkt. Die wenigen wissenschaftlichen Untersuchungen, welche sich mit der Kultivierung von Fischzellen in Bioreaktoren beschäftigten, behandeln ausschließlich die Produktion von Viren, wobei kleinskalige Bioreaktoren mit einem Kultivierungsvolumen von 0,1 l bis 5 l eingesetzt werden [Nicholson 1980, Buck und Loh 1985, Lydersen *et al.* 1985, Chen *et al.* 1992, Chen *et al.* 2005]. Dabei ist zu beobachten, dass in den älteren Arbeiten überwiegend suspendierte Kulturen auf *micro*-

carrier verwendet wurden, wohingegen in jüngeren Arbeiten viel öfter statische Festbettreaktoren zum Einsatz kamen [Nicholson 1980, Chen *et al.* 2005]. Die *microcarrier*-Kulturen sind wegen ihrer vergleichsweise einfachen Skalierbarkeit vielen anderen Reaktorprinzipien überlegen [Warnock und Al-Rubeai 2006], weshalb die AOXlar7 Zellen zu allererst auf gelatinebeschichtete GEMTM inokuliert und im BioLevigatorTM kultiviert wurden.

Für die Kultivierung von AOXlar7 Zellen auf suspendierten GEMTM konnte gezeigt werden, dass trotz hinreichend hoher Startzellzahl keine bzw. keine ausreichende Zellexpansion erreicht werden konnte. Direkt im Anschluss an die Inokulation der Zellen reduzierte sich die Gesamtzellzahl und erreichte daraufhin ein Plateau, welches über mehrere Kultivierungstage konstant blieb. Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben des Zellwachstums könnte die alternierende Rotationsbewegung des LeviTubes sein. Dabei sorgen die im Inneren des LeviTubes angebrachten Strömungsbrecher für eine Durchmischung des Mediums, wodurch einerseits die GEMTM in Suspension gehalten werden und andererseits eine flüssigmechanische Kraft, bezeichnet als Scherstress, auf die Zellen wirkt [Wu 1999]. Im Allgemeinen gilt, dass tierische Zellen besonders sensitiv auf den Scherstress reagieren [Mano *et al.* 1990]. Wu (1999) konnte zeigen, dass dieser einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten verschiedener Zellkulturen hat. Neben der Beeinflussung des Wachstums konnte für humane embryonale Stammzellen und induziert-pluripotente Zellen gezeigt werden, dass Scherstress die Differenzierung dieser Zellen fördert, ohne dabei die Überlebensfähigkeit zu beeinflussen [Leung *et al.* 2011]. Zumindest letzteres konnte auch bei den AOXlar7 Zellen beobachtet werden, denn über einen Zeitraum von bis zu acht Tagen blieb die Zellzahl nahezu unverändert. Für die Biomasseproduktion der AOXlar7 Zellen auf suspendierten *microcarrier* kann daher Folgendes festgehalten werden: Die Inokulation der gelatinebeschichteten GEMTM war erfolgreich und konnte mehrfach reproduziert werden. Für die anschließende Kultivierung im BioLevigatorTM müssten allerdings weitere Experimente vorgenommen werden, um den Grund des ausbleibenden Wachstums zu erfassen.

Neben der Optimierung der Inokulationsmethode hin zu einer gleichmäßigeren Inokulation (Abb. 30) könnte eine technische Veränderung der Strömungsbrecher innerhalb des LeviTubes zu einer schonenderen Suspendierung der GEMTM beitragen. Eine mögliche Verbesserung des Zellwachstums könnte zudem durch die Verwendung von

macroporous microcarrier erreicht werden, in denen die Zellen im Inneren des *microcarrier* relativ gut von äußeren Einflüssen abgeschirmt sind [Yang und Basu 2012]. Allerdings zeigen frühe Untersuchungen, dass durch die Verwendung von *macroporous microcarrier* neue Problemstellungen auftreten, wie z.B. die mangelnde Nährstoffversorgung durch begrenzte Diffusionskapazitäten [van der Velden – de Groot 1995]. Neuere Beobachtungen belegen zudem, dass neben der Porosität der Wachstumsoberfläche auch die Porengröße sowohl das Proliferations-, als auch das Differenzierungsverhalten von Zellen beeinflusst [Loh und Choong 2013].

Schersensitive Zellkulturen, die sich nicht auf suspendierten *microcarrier* kultivieren lassen, können z.B. in Festbettreaktoren kultiviert werden, da hierbei die Scherkräfte deutlich niedriger sind [Warnock und Al-Rubeai 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusammen mit der Firma Zellwerk ein horizontaler Drehbettreaktor betrieben, welcher mit unterschiedlichen Sponceram® Oberflächen bestückt und mit AOXlar7 Zellen inokuliert worden war. Wie in den Vorversuchen schon beobachtet werden konnte, war der Besiedelungserfolg dieser Materialien in erster Linie von der Oberflächenbeschaffenheit abhängig. Während der statischen Kultivierung der Sponceram® Oberflächen (Discs) konnte gezeigt werden, dass die Materialien mit ausgeprägter Gerüststruktur und hohem Anteil an Hohlräumen die jeweils geringsten Zellzahlen aufwiesen, wohingegen die Zellzahl bei der geschlossenporigen Sponceram® 160AL-20-00 viel höher war. Die durchgeführten Kultivierungsversuche im Z®RP *breeder*, führten allerdings nicht zu einer erfolgreichen Inokulation der Sponceram®, wodurch eine Expansion der AOXlar7 Zellen auf Sponceram® Oberflächen ausgeschlossen war.

Im Gegensatz dazu konnte das zweidimensionale und horizontale Drehbett zwar mit einer ausreichenden Anzahl an Zellen inokuliert werden, nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 14 Tagen wurden allerdings nur unwesentlich mehr Zellen geerntet, als eingesät wurden. Obwohl die mikroskopische Beobachtung der adhärent wachsenden Zellkulturen in Bioreaktoren während des Kultivierungsprozesses praktisch unmöglich ist, lassen sich aus theoretischen Überlegungen und makroskopischen Beobachtungen dennoch durchaus plausible Erklärungsansätze für ein vermindertes Wachstum finden. Da die Inokulation der Wachstumsoberflächen im Z®RP *breeder* mittels suspendierter Zellen erfolgt und diese Zellsuspension den gesamten Reaktorraum einnimmt, wird neben den vorgesehenen Wachstumsoberflächen (Drehbett)

auch das Reaktorinnengefäß mit Zellen besiedelt. Die exakte Bestimmung der tatsächlich inokulierten Zellen ist daher nahezu unmöglich. Ist die Inokulationszellzahl bzw. die Einsaatdichte der Zellen auf dem Drehbett allerdings zu gering, so ist das Wachstum der AOXlar7 Zellen deutlich verlangsamt. Während der Kultivierung im Z®RP *breeder* konnten an den offenen Enden des horizontalen Drehbetts größere und kleinere Luftblasen beobachtet werden, welche apparativ bedingt auftraten und auf Grund der Rotationsbewegung entlang der Polycarbonatplatten auf die gegenüberliegende Seite wanderten. Hierdurch wird ein lokaler, aber vermutlich nicht unbedeutender fluid-dynamischer Scherstress an den Zellen ausgeübt, wodurch das Zellwachstum beeinträchtigt werden könnte.

Obwohl der Energieeintrag in das Nährmedium bei dem Z®RP *breeder* deutlich geringer ist als bei dem BioLevigator™, konnte die Scherkrafteinwirkung auf die Zellen vermutlich nicht ausreichend minimiert werden. Die Kultivierungsversuche auf dem horizontalen Drehbett zeigten, dass es durchaus möglich ist, die Zellzahl der AOXlar7 Zellen in einem technisch kontrollierten Kultivierungsprozess zu expandieren. Wie bei dem BioLevigator™ könnten auch bei dem Z®RP *breeder* sowohl die Inokulation der Sponceram®, besonders die der Sponceram® 160AL-20-00 im Z®RP *breeder* verbessert, als auch die Bildung der Luftblasen beim horizontalen Drehbett minimiert werden, wodurch sich möglicherweise das Wachstum der Zellen verbessern ließe. Zusätzlich dazu könnten weitere, alternative Materialien oder Oberflächen entwickelt werden, welche speziell auf die Bedürfnisse der AOXlar7 Zellen angepasst sind, wodurch das Wachstum im Z®RP *breeder* optimiert werden könnte.

Schon während der frühen Kultivierungsversuche in den kommerziell erhältlichen Bioreaktorsystemen wurden die jeweiligen apparativen Grenzen bzw. Hindernisse für eine Massenkultivierung adhärent wachsender Zellen offensichtlich:

- Das Nährmedium lässt sich als Substrat in den meisten Bioreaktoren kontinuierlich zuführen, so dass den Zellen immer ausreichend frische Nährstoffe zur Verfügung stehen. Die für adhärent wachsende Zellkulturen mindestens ebenso wichtige Wachstumsoberfläche wird in allen Reaktorsystemen vor dem eigentlichen Kultivierungsprozess dimensioniert und als fixes Substrat eingesetzt.

- Aufgrund der Oberflächenabhängigkeit werden unter Umständen relativ große Volumina an Nährmedium verwendet, um den Reaktorenraum auszufüllen. Dies wird besonders dann kritisch, wenn das Nährmedium durch Spüllösungen oder proteolytische Enzymlösungen getauscht werden soll. Darüber hinaus ließen sich optionale Medienzusätze wie z.B. hormonelle Stimulanzien lediglich als konzentrationsabhängiger Gradient zu- bzw. absetzen.

In Bezug auf die jeweilige Verfahrenstechnik sowie auf den Bioprozess an sich, ist bei den gängigen, fertig konfektionierten Reaktorsystemen die Einflussnahme oftmals unzureichend oder nur begrenzt möglich. Wegen des schlechten Wachstums der AOXlar7 Zellen in den getesteten Bioreaktoren und wegen ihrer mittelbar abzusehenden apparativen Grenzen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein alternatives und neuartiges Kultivierungskonzept entwickelt und dessen technische Realisierbarkeit untersucht werden. Der Anspruch an dieses Konzept war, Lösungsstrategien für die oben stehenden apparativen Grenzen zu finden.

Für die Konzeption des neuartigen Kultivierungsprozesses musste vorerst eine Referenzzellkultur gefunden werden. Für die AOXlar7 Zellen konnte zwar ein stabiles aber passagenabhängiges Wachstumsverhalten gezeigt werden, für die Etablierung eines neuartigen Reaktorsystems war die Verdopplungszeit dieser Zellen jedoch zu lang. Aus diesem Grund wurde für den technologischen Teil dieser Arbeit die robuste und schnellwachsende Zellkultur Z29 verwendet. Sie ist relativ unempfindlich gegenüber schwankenden Zellkulturbedingungen und hat eine Verdopplungszeit von etwa 16 Stunden [Voigt 2010]. Neben der Referenzzellkultur mussten zusätzlich eine Wachstumsoberfläche und ein technisches Kultivierungssystem gefunden werden.

Als Wachstumsoberfläche wurden grobmaschige Netzgewebe ausgewählt, die im Idealfall vollständig von den proliferativen Zellen erschlossen werden können. In der Literatur sind Netzgewebe kaum eingesetzte Wachstumsoberflächen. Yoo *et al.* (2011) demonstrierten an feinmaschigen Netzgeweben, dass sie als dreidimensionales Grundgerüst für *in vitro* kultivierte neuronale Zellen verwendet werden können. Zudem konstatierten sie, dass Netzgewebe vergleichsweise simpel aufgebaut, modifizierbar und kostengünstig sind. Die hier verwendeten Netzgewebe zeichnen sich

durch folgende Eigenschaften aus: Sie sind flexibel aber dennoch reißfest, lassen sich sowohl schneiden als auch stanzen und können mit den üblicherweise in Zellkulturenlaboren vorhandenen Methoden dekontaminiert werden. Der Quadratmeterpreis der als technische Sieb- und Filtergewebe deklarierten Netzgewebe liegt zwischen 13 € (Polyethylen) und 18 € (Polyamid). Diese Netzgewebe haben im Gegensatz zu einer zweidimensionalen Oberfläche eine rund 90 % größere reale Wachstumsfläche. Darüber hinaus wird im Idealfall der Mascheninnenraum ebenfalls von den Zellen als zusätzliche Wachstumsfläche erschlossen, so dass deutlich höhere Zellzahlen erreicht werden können als auf herkömmlichen Wachstumsflächen. Da die Zellen besonders in den Ecken der Netzmaschen eine besondere Wachstumsumgebung finden, könnte es sein, dass die Zellen trotz Kontaktinhibition Zellmultilayer bilden.

Die Inokulation dieser Netzgewebe konnte nicht mittels einer Zellsuspension erfolgen, da der überwiegende Teil der suspendierten Zellen durch die 200 µm großen Netzmaschen sedimentierte, wodurch fast ausschließlich die Wachstumsfläche unterhalb des Netzgewebes besiedelt wurde. Daher musste für die Inokulation der Netzgewebe ein Inokulationsvehikel gefunden werden, auf dem sich die Zellen zuvor fixieren lassen. Hierfür eigneten sich hervorragend die von Voigt (2010) beschriebenen Glasperlen. Sie konnte zeigen, dass sich gelatinebeschichtete Glasperlen mit Z29 Zellen besiedeln lassen und sich somit als Wachstumsfläche eignen [Voigt 2010]. Das von Voigt (2010) etablierte Protokoll für die Dekontamination der Glasperlen wurde gemeinsam mit Schulze-Jena angepasst, und konnte in dieser Arbeit weiter optimiert werden. Die verwendeten Glasperlen, deren Kilogrammpreis bei rund 20 € liegt, wurden vor der Inokulation mit einer Gelatinelösung beschichtet. Diese, von Voigt (2010) empfohlene Inokulationsmethode für die Besiedelung der Glasperlen, wurde in den parallel zu dieser Arbeit betreuten Abschlussarbeiten adaptiert [Hoffmann 2010, Schulze-Jena 2012] und konnte hier weitergehend optimiert und standardisiert werden. Dabei erfolgte die Inokulation der Glasperlen mit deutlich höheren Zellzahlen als für die Kultivierung von Z29 üblicherweise eingesetzt werden. Hiermit war es möglich, innerhalb von vier Stunden die gelatinebeschichteten Glasperlen vollständig mit Z29 Zellen zu inokulieren.

Die optimale Anzahl besiedelter Glasperlen je Netzgewebe wurde zusammen mit Hoffman erarbeitet und mit Schulze-Jena in einen reproduzierbaren technischen Prozess überführt [Hoffmann 2010, Schulze-Jena 2012]. In der vorliegenden Arbeit war

es gelungen, mehr als die Hälfte der ursprünglich auf die Glasperlen inokulierten Zellen durch Pipettieren auf die Netzgewebe zu übertragen. Schulze-Jena (2012) erreichte mit rund 65 % der Zellen auf den Glasperlen allerdings deutlich höhere Transferraten. Insgesamt zeigte sich, dass die vorherige Beschichtung der Glasperlen mit Gelatine dazu beitrug, dass die inokulierten Zellen robuster gegenüber den mechanischen Beanspruchungen beim Pipettieren werden. Die Besiedelung der Netzgewebe mittels zuvor inokulierter Glasperlen konnte mehrfach gezeigt und in einer Zeitrafferaufnahme untersucht werden [Hoffmann 2010, Schulze-Jena 2012]. Hoffmann vermutete, dass die Inokulationsdauer der Netzgewebe reduziert werden könnte [Hoffmann 2010]. Diese Vermutung konnte in dieser Arbeit bestätigt und mittels entsprechender Inokulationsversuche beziffert werden. Eine Inokulationsdauer von 24 Stunden reicht aus, um die Netzgewebe in der anschließenden Kultivierung vollständig zu besiedeln. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die nach 24 Stunden abgenommenen Glasperlen direkt weiterverwendet werden können, um neue Netzgewebe mit Zellen zu inokulieren, ohne dass die Zellen mit proteolytischen Enzymen behandelt werden mussten. Insgesamt zeigte sich, dass die ausgewählten Netzgewebe von den Z29 Zellen als Wachstumsoberfläche akzeptiert und anschließend vollständig, auch innerhalb der Netzmaschen von den Zellen besiedelt wurden.

Die Inokulation der Glasperlen mit einer Zellsuspension erwies sich als zielführend, war jedoch ineffektiv. Durch die gleichzeitige Besiedelung des Wellbodens unterhalb der Glasperlen wurden bis zu 50 % der Zellen nicht auf die Glasperlen inokuliert. Durch die Anpassung der Zellzahl der Zellsuspension und die Verwendung von hydrophobisierten Wachstumsoberflächen ließe sich die Inokulation möglicherweise optimieren und die Zellverluste reduzieren. Eine modifizierte Inokulationsmethode wurde von Schulze-Jena (2012) vorgestellt. Bei dieser als direkte Inokulation bezeichneten Besiedelung der Netzgewebe konnten auch ohne Glasperlen 100 % der Zellen in der Zellsuspension auf die Netzgewebe inokuliert werden. Allerdings gelang die direkte Inokulation nicht reproduzierbar. Unabhängig davon, wurden in dieser Arbeit alternative Inokulationsmethoden untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich sowohl Glasperlen, als auch Netzgewebe durch bereits besiedelte Netzgewebe inokulieren lassen.

Ausgehend von diesem Erkenntnisstand wurden die statischen Kultivierungsversuche beendet und die Kultivierung in einen automatisierten Kultivierungsprozess überführt.

Als technisches Kultivierungssystem wurde dafür der Multifors® 2 der Firma Infors-HT ausgewählt. Seine beiden Rührkesselreaktoren sind gut zugänglich und bieten den nötigen Raum für technische Modifikationen. Der Multifors® 2 ist somit ein relativ flexibles System, welches über eine integrierte Mess- und Steuerungseinheit verfügt und optional mit Sensoren, Sonden und Ports konfektioniert werden kann. Für die submerse Kultivierung von Netzhäuten im Multifors® 2 wurde gemeinsam mit Hoffmann bereits eine Netzhalterung entworfen [Abb. 13 a, Hoffmann (2010)], welche in Zusammenarbeit mit Schulze-Jena maßgeblich überarbeitet und in einer Vielzahl von Reaktorkultivierungen eingesetzt werden konnte [Abb. 13 b bzw. c, Schulze-Jena 2012]. Um das Kultivierungsvolumen perspektivischer Reaktoranlagen möglichst gering zu halten, sollte zudem überprüft werden, ob die Kultivierung der Zellen in einem Sprühnebel erfolgen kann. Dafür wurde mit der MRS 0.5 Sprühdüse innerhalb des Reaktorinnenraums ein Sprühnebel aus Nährmedium erzeugt. Die videogestützte Sprühbildanalyse zeigte, dass dabei der gesamte Reaktorinnenraum von dem Sprühnebel erfasst wird (Abb. 42). Im Gegensatz zu den anderen getesteten Sprühdüsen zeigte die MRS 0.5 Sprühdüse einen sehr feinen Sprühnebel bei relativ großem Sprühwinkel und einer Kernzone mit sehr feinen Sprühtropfen (Abb. 41). Darüber hinaus ist diese Sprühdüse mit 12 € verhältnismäßig günstig. Der nötige Arbeitsdruck wurde von einer peristaltisch arbeitenden Hochdruckpumpe erzeugt, deren Hochdruckschlauch problemlos in das System integriert und samt Bioreaktor dekontaminiert werden konnte. Der Vorteil dieses Hochdruckschlauchs war, dass dadurch ein kontaktfreier Transport des Nährmediums gewährleistet werden konnte, wodurch interne bzw. externe Kontaminationen minimiert werden konnten.

In der Praxis zeigte sich jedoch, dass das modifizierte Multifors® 2 Reaktorsystem verschiedene teilweise erhebliche Schwachstellen aufweist, allen voran der Hochdruckschlauch. Während der Sprühkultivierung konnte beobachtet werden, dass Partikel aus dem Schlauchmaterial ausgetragen werden, die kreislaufbedingt im System kumulieren und einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Z29 Zellen haben [Schulze-Jena 2012]. Zudem führte die dauerhafte mechanische Beanspruchung zu Undichtigkeiten bzw. zu einem Durchbruch des Schlauchmaterials, wodurch in diesem Fall die Sprühkultivierung und damit der gesamte Reaktorlauf abgebrochen werden musste. Zwar konnten diese vorhersehbaren Probleme relativ gut kontrolliert werden, zukünftige Untersuchungen bzw. Langzeit-Kultivierungen sollten jedoch mit einem alternativen Pumpsystem, wie z.B. einer Kreisel- oder Membranpumpe durchgeführt

werden. Neben dem Hochdruckschlauch ist die ausgewählte MRS 0.5 Sprühdüse eine weitere Schwachstelle im System. Es konnte beobachtet werden, dass die Sprühdüse nach etwa fünf Reaktorkultivierungen begann, teilweise zu verstopfen. Dadurch änderten sich nicht nur die Sprüheigenschaften der Düse, was durch ein verändertes Sprühbild sichtbar wurde, es kommt vermutlich auch zu einem Anstieg des Drucks im Hochdruckschlauch, wodurch sich aller Wahrscheinlichkeit nach das Risiko für Undichtigkeiten erhöht. Bei der Konstruktion eines Reaktorprototyps sollte daher überlegt werden, höherwertigere Sprühdüsen einzusetzen, welche möglicherweise leichter zu reinigen sind. Sollten dennoch Verstopfungen auftreten, so könnten diese unter Umständen mit Filtersystemen reduziert oder durch Rückspülsysteme verhindert werden.

Trotz der technischen Schwierigkeiten während einer Sprühkultivierung konnte mit dem hier vorgestellten Reaktorsystem demonstriert werden, dass es prinzipiell möglich ist, adhärent wachsende Säugetier- und Fischzellen in einem Sprühnebel aus Nährmedium zu kultivieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass während der Kultivierung von Z29 Zellen im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor deutlich höhere Zelldichten erreicht wurden, als bei den Kontrollkulturen in Petrischalen. Dieses verbesserte Zellwachstum könnte durch eine optimierte Nährstoffversorgung begründet werden. Üblicherweise ist die Versorgung adhärenter Zellkulturen durch Diffusionsprozesse gekennzeichnet. Da die Zellen auf der Zellkulturoberfläche direkt, oder im Fall einer Netzkultur geringfügig oberhalb dieser Oberfläche kultiviert werden, entstehen zwischen den benötigten Nährstoffen und den abgegebenen Stoffwechselprodukten zwei gegenläufig konzentrierte Gradienten. Durch die Kultivierung im Sprühnebel werden die Zellen stetig von Zellkulturmedium umflossen, wodurch diese Gradienten aller Wahrscheinlichkeit nach reduziert und die Versorgung der Zellen verbessert werden. Weiterführende Reaktorversuche sollten durchgeführt werden, um das Langzeitwachstum der Zellen im Sprühnebel zu untersuchen. Währenddessen könnten auch die Nährstoffe im Nährmedium kontrolliert und mit dem Wachstum verglichen werden. Zusätzlich sollte die Netzhalterung weiterentwickelt werden, so dass die Netzgewebe dichter nebeneinander bzw. übereinander liegen. Dadurch ließe sich deutlich besser abschätzen, ob die Kultivierung im Sprühnebel zu einer ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen führt und sich der Kultivierungsprozess skalieren lässt.

Durch die Reduktion des Sauerstoffanteils in der Atmosphäre war es zudem möglich, die AOXlar7 Zellen in dem modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor zu kultivieren, womit zum einen gezeigt werden konnte, dass sich AOXlar7 Zellen in einem technisch kontrollierten Reaktorsystem kultivieren lassen und zum anderen, dass AOXlar7 Zellen sensitiv auf eine veränderte Sauerstoffkonzentration in der Zellkulturumgebung reagieren. Die Kontrollzellen, die bei 5 % O₂ kultiviert wurden, erreichten eine um rund 16 % höhere Zellzahl je cm² als die Kontrollzellen bei 21 % O₂. Wie an Hepatozyten der Regenbogenforelle gezeigt werden konnte, steht die Sauerstoffkonzentration der Inkubatoratmosphäre im Zusammenhang mit dem oxidativen Stress der Zellen [Finne *et al.* 2008]. An einer Vielzahl von humanen Stammzellkulturen konnte gezeigt werden, dass hypoxische Kultivierungsbedingungen zu einer verbesserten Proliferation führen [Gordan *et al.* 2007, Grayson *et al.* 2007] und zu einer Aufrechterhaltung des undifferenzierten und multipotenten Status beitragen [Basciano *et al.* 2011]. Möglicherweise entsprechen die niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen in der Inkubatoratmosphäre viel eher den physiologischen Bedingungen im Gewebe, besonders bei aquatischen Organismen. Dieses Verhalten eröffnet daher ein weiteres Kapitel im Gesamtverständnis der AOXlar7 Zellen und sollte in zukünftigen Kultivierungen berücksichtigt werden.

Im Vergleich zu den Wachstumsversuchen mit Z29 Zellen zeigte sich, dass die AOXlar7 Zellen weder in den Kontrollen, noch im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor den Mascheninnenraum der Netzgewebe besiedeln. Diese Beobachtung begründet sich möglicherweise dadurch, dass die Z29 Zellen im Gegensatz zu den AOXlar7 Zellen nicht kontaktinhibiert sind und ab dem Konfluenzstadium des Zellrasens Zellmultilayer bilden. Möglicherweise könnten Netzgewebe mit einer geringeren Maschenweite als 200 µm dazu beitragen, dass auch der Innenraum der Maschen durch kontaktinhibierte AOXlar7 Zellen besiedelt werden kann.

Aus den Erkenntnissen des vorliegenden technischen Teils dieser Arbeit ist ein dreistufiges Kultivierungskonzept vorstellbar. In der ersten Stufe erfolgt die Besiedelung eines mobilen Inokulators (z.B. Glasperlen). Dieser mobile Inokulator dient dem Transfer der Zellen auf die eigentliche Wachstumsoberfläche (z.B. Netzgewebe). Als Alternative zu den schwierig zu instrumentierenden Glasperlen könnte hierbei ein Stempelsystem eingesetzt werden, welches idealerweise mit einer halbkugelförmigen Oberflächentopographie versehen ist. Auf diese Weise sollte es möglich sein, die

Wachstumsoberfläche abschnittsweise mit Zellen zu besiedeln. In der zweiten Stufe dieses Konzepts erfolgen die Kultivierung der Zellen und die Expansion der Wachstumsoberfläche. Unter der Voraussetzung, dass die Netzgewebe in Form eines Förderbands transportiert werden, ließe sich diese Wachstumsoberfläche mit dem mobilen Inokulator wiederholt mit Zellen besiedeln. Nach der Inokulation und während der Kultivierung könnte das Netzgewebe mit einem gegenläufig transportierten Netzgewebe in direkten Kontakt gebracht werden, wodurch dieses wiederum mit Zellen besiedelt werden würde. In der dritten Stufe würden die Zellen von den vollständig besiedelten Netzgeweben geerntet werden. Hierdurch entstünde ein Kultivierungsprozess, in dem die Wachstumsoberfläche während der Kultivierung vergrößert und unter Berücksichtigung der Wachstumsgeschwindigkeit der ausgewählten Zellen erneuert werden kann – ein kontinuierlicher Bioreaktor für die Massenproduktion von adhärent wachsenden Zellen. Das für die Nährstoffversorgung der Zellen benötigte Nährmedium könnte während des gesamten dreistufigen Kultivierungskonzepts als Sprühnebel den gesamten Kultivierungsraum erfassen, wodurch das Volumen des Nährmediums geringer dimensioniert werden kann, als das Gesamtvolumen des Reaktorinnenraums.

Auch wenn in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass AOXlar7 Zellen in einem technisch kontrollierten Prozess kultiviert werden können, ist es unbestritten, dass sich ein Fischmehlersatz bzw. Fischmehlzusatz aus einer *in vitro* kultivierten Fischzellkultur derzeit nicht unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten produzieren lässt. In einem ganz ähnlichen Forschungsvorhaben konnten Wissenschaftler der Universität Maastricht zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, Zellen aus Schlachtabfällen zu extrahieren und daraus ein *in vitro* kultiviertes Fleisch zu produzieren. Das etwa 150 g schwere Hamburgerfleisch kostete laut ihren Schätzungen rund 250.000 € [Kelland 2011]. Nach eigenen theoretischen Berechnungen läge der Preis für 150 g Fischzell-Lyophilisat, angereichert mit EPA und DHA in einer vergleichbaren Größenordnung. Sowohl den Wissenschaftlern der Universität Maastricht, als auch uns ist allerdings bewusst, dass die Produktionskosten drastisch gesenkt werden könnten, sofern adäquate Reaktorsysteme für eine Massenproduktion zur Verfügung stehen würden.

Mit Hilfe von geeigneten Reaktorsystemen ließen sich die Kosten für die bisher eingesetzten Einweg-Zellkulturoberflächen vermeiden indem Mehrweg-Materialien eingesetzt werden würden. Zudem ließe sich der Kultivierungsprozess automatisieren und

dadurch die Kosten für die aufgewendeten Personalkosten während der Kultivierung drastisch senken. Darüber hinaus erlaubt der technisch-kontrollierte und geregelte Kultivierungsprozess eine effizientere Nutzung der möglicherweise bedarfsorientiert zusammengesetzten Nährmedien.

Eine weitere viel pragmatischere Lösung wäre die Überführung der adhärent wachsenden Fischzellen in suspendiert-wachsende Zellkulturen. Hightower und Renfro (1988) erwähnten erstmals eine Fischzellkultur, welche in Suspension wächst. In einem anknüpfenden Forschungsvorhaben könnte untersucht werden, ob sich potentielle Fischzellen (z.B. AOXlar7 Zellen) in suspendierte Zellkulturen überführen lassen. Andernfalls könnten Analysen aufzeigen, ob die von Hightower und Renfro (1988) erwähnte Suspensionskultur vergleichbare ernährungsphysiologische Eigenschaften zeigt. Hiermit ließen sich in erster Linie die Kosten für die Zellkulturoberflächen einer adhärent wachsenden Zellkultur einsparen. Darüber hinaus existieren bereits unterschiedliche Bioreaktorsysteme, die weit über 100.000 l Kultivierungsvolumen anbieten [Eibl *et al.* 2009].

Aufgrund dieser, bisher ungelösten Kultivierungsschwierigkeiten, ist es notwendig, die Verwertbarkeit von *in vitro* kultivierten Fischzellkulturen zu untersuchen und die Marktpotentiale zu überprüfen. Für eine Verwendung als Fischmehlersatz bzw. Futtermittelzusatz existieren bereits Alternativen aus einzelligen Organismen wie z.B. Mikroalgen und Bakterien, welche als neuartige und nachwachsende Rohstoffe angesehen werden und in Fütterungsstudien bereits erfolgreich eingesetzt werden konnten [Miller *et al.* 2008, Bendiksen *et al.* 2011, Adarme-Vega *et al.* 2012]. Die unmittelbare Markteinführung dieser, bisher ansatzweise untersuchten Fischmehlalternativen scheitert derzeit an einer unvorhersehbaren Produktverfügbarkeit und an den sehr hohen Produktionskosten [Miller *et al.* 2008, Turchini *et al.* 2009, Olsen und Hasan 2012]. Auch wenn die Marktpreise für natürliches Fischmehl und Fischöl mit rund 2.100 US\$ je Tonne höher sind als je zuvor, ist davon auszugehen, dass eine *in vitro* kultivierte Fischzellalternative deutlich teurer sein würde. Lediglich die mittelfristige Aussicht auf weitere Preissteigerungen könnte zu einem konkurrenzfähigen Fischzellprodukt führen.

Möglicherweise ergeben sich aus der Verwertbarkeitsanalyse weitere, ganz andere Marktpotentiale für *in vitro* kultivierte Fischzellen. Ein mögliches Anwendungsgebiet wäre die Produktion von fischspezifischen Impfstoffen für die Aquakultur [Sommerset

et al. 2005]. Ebenfalls wären die bisher im Fischfleisch identifizierten bioaktiven Peptide, welche vermutlich im Rahmen der Verdauung entstehen und einen gesundheitlichen Mehrwert haben [Ryan *et al.* 2011], in Fischzellen produzierbar und demnach potentielle neue Pharmaka. Im Allgemeinen gilt, dass eukaryotische Zellen ein exklusives und spezifisches Muster an posttranslationalen Modifikationen zeigen [Bols 1991], welche beispielsweise Phosphorylierungen und Glykosilierungen betreffen und in Bakterien üblicherweise nicht vorkommen. Eines dieser Strukturen ist das Peptidhormon Calcitonin, welches als hochpotentes Lachs-Calcitonin in der nasalen postmenopausalen Osteoporose-Therapie eingesetzt wurde [Houssami *et al.* 1995] und mittlerweile wegen eines erhöhten Tumorrisikos vom Markt genommen werden soll [arznei-telegramm 2012]. Diese und möglicherweise derzeit noch unbekannte Strukturen würden durch eine biotechnologische Nutzung von Fischzellen produziert werden können, wodurch die natürlichen Ressourcen geschont werden könnten. Die in Fischen vorkommenden *antifreeze* Proteine stellen eine weitere Gruppe möglicher Zielstrukturen dar. *Antifreeze* Proteine könnten beispielsweise in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden, um die Lagerbedingungen temperatursensitiver Lebensmittel zu optimieren, wodurch möglicherweise die Haltbarkeit verlängert werden könnte.

Die Biomasseproduktion von adhärent wachsenden Zellen lässt sich allerdings nicht ausschließlich auf die Kultivierung von Fischzellen beschränken, denn besonders in der regenerativen Medizin werden beispielsweise große Zellmengen benötigt. Dieser Bereich der Biotechnologie könnte ein weiteres Marktpotential für einen Bioreaktor darstellen, in dem es möglich wäre adhärent wachsende Zellkulturen kontinuierlich zu kultivieren.

4.4 Fazit und Ausblick des Projektvorhabens

Als Fazit dieses Forschungsvorhabens lässt sich festhalten, dass *in vitro* kultivierte Fischzellen vergleichbare ernährungsphysiologische Eigenschaften aufweisen, wie ein traditionell verarbeitetes Fischmehl. Dabei unterscheiden sich die ernährungsphysiologisch bedeutsamen Bestandteile sowohl in Abhängigkeit von der Fischart, als auch von dem spezifischen Gewebe, aus dem die verwendete Zellkultur gewonnen wurde. Ein Lyophilisat der OMYsd1x Zellen ist demnach geeignet den Proteinanteil des Fischmehls vollständig zu ersetzen, das Lyophilisat der AOXlar7 Zellen hingegen

kann den Anteil an den LC-PUFAs EPA und DHA ergänzen. Bezugnehmend auf diese beiden Fettsäuren, welche den Themenschwerpunkt dieser Arbeit bestimmten, ergaben sich jedoch zwei gravierende zellbiologisch bedingte Limitierungen. Zum einen befindet sich, abgesehen von Adipozyten, der Großteil aller zellulären Fettsäuren in den biologischen Membranen, die physiologischer Weise aus einer Vielzahl unterschiedlicher Fettsäureklassen zusammengesetzt sind und nur einen begrenzten Anteil der Zellbiomasse ausmachen. Zum anderen sind Fischzellen wie auch alle anderen Zellen der Vertebraten nicht in der Lage, die EPA und DHA *de novo* zu synthetisieren. Dennoch konnte bei den AOXlar7 Zellen eindrucksvoll gezeigt werden, dass sich sowohl die Fettsäuremetabolisierung hin zu EPA und DHA, als auch der Gesamtfettgehalt der Zellen durch die Veränderung der Kultivierungsbedingungen und durch die Zugabe von ALA deutlich erhöhen lässt. Nichtsdestotrotz ist der Produktionsaufwand in Relation zu der erhaltenen Ausbeute an Fettsäuren gegenwärtig nicht vergleichbar mit anderen Futteralternativen wie z.B. Mikroalgen. Möglicherweise lässt sich durch weitergehende oder zusätzliche Veränderungen der Kultivierungsbedingungen eine weitere Steigerung des Fettgehalts erreichen. Ebenfalls könnten weitere Fischgewebe anderer Fischarten nähergehend untersucht werden, um eine optimale Produktionszelllinie zu finden.

Um *in vitro* kultivierte Fischzellen bzw. eine Produktionszelllinie in industriellem Maßstab und unter ökonomischen Gesichtspunkten kultivieren zu können, bedarf es geeigneter Bioreaktorsysteme. Durch diese Bioreaktoren wäre es möglich, die Materialkosten zu senken und den Arbeitsaufwand während der Kultivierung zu minimieren. Unter dieser Zielvorgabe wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche kommerziell verfügbare Reaktorsysteme getestet, in denen allerdings keine ausreichende Expansion der AOXlar7 Zellen erreicht werden konnte. Das daraufhin entwickelte, völlig neuartige Kultivierungskonzept konnte in ein bereits bestehendes Reaktorsystem testweise überführt und getestet werden. Während dieser Testläufe ist es gelungen, die AOXlar7 Zellen erfolgreich zu kultivieren und dabei zu vermehren. Grundlegende Idee dieses Konzepts war es, ein Bioreaktorsystem zu konzipieren, in dem eine kontinuierliche Kultivierung von unterschiedlichen adhärent wachsenden Zellen möglich werden würde. Dahingehend konnte bereits eine Säugetierzellkultur und eine Fischzellkultur erfolgreich unter den Testbedingungen kultiviert werden – zum Teil mit deutlich höheren Zellzahlen als die konventionell kultivierten Kontrollkulturen.

Für die Konstruktion eines Reaktorsystems sind allerdings weitere intensive Forschungsbemühungen erforderlich, deren vorrangiges Ziel es sein wird, die technische Realisierbarkeit zu untersuchen. Eine der größten Herausforderungen wird sein, eine geeignete mobilisierbare Wachstumsoberfläche zu finden, die sich initial mit Zellen besiedeln lässt und möglichst lange für die Besiedelung der Wachstumsoberflächen eingesetzt werden kann. Parallel hierzu wurde zusammen mit dem Institut für Mikrosystemtechnik an der Technischen Universität Hamburg-Harburg eine mögliche Oberfläche entworfen und erfolgreich mit Zellen besiedelt. Ob sich diese allerdings an Stelle der Glasperlen einsetzen lässt, gilt es als nächstes festzustellen.

Abgesehen von der Fettsäuremetabolisierung *in vitro* kultivierter Fischzellen, ist die Tatsache, dass Zellen nicht zwingend submers kultiviert werden müssen, vermutlich die wichtigste Erkenntnis dieser Arbeit. Durch die Möglichkeit der Kultivierung im Sprühnebel lassen sich ganz neue und andersartige Reaktorkonstruktionen durchdenken, die möglicherweise zu neuen Kultivierungskonzepten führen. Die Besonderheit daran ist, dass sich das Volumen des Nährmediums nicht mehr an dem Volumen des Reaktorinnenraums orientiert. Möglicherweise lassen sich dadurch auch den Skalierungsproblemen heutiger Bioreaktoren für adhärent wachsende Zellen begegnen. Für eine Kultivierung im Sprühnebel sollte zukünftig eine alternative Vernebelungseinrichtung gefunden werden, die weniger wartungsaufwändig und ausfallsicherer ist als das in dieser Arbeit vorgestellte System. Sollten weiterhin Pumpsysteme eingesetzt werden, empfiehlt es sich Kreisel- oder Membranpumpen in die Auswahl miteinzubeziehen. Diese Pumpen sind geeignet für den Transport von Medien mit relativ hohem Druck und lassen sich am Einsatzort direkt reinigen und sterilisieren.

Die industrielle Verwertung eines Fischzellproduktes wurde am Beispiel der ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Fischmehl betrachtet. Zwar sind tatsächlich die Marktpreise für Fischmehl und Fischöl in den letzten Jahren drastisch angestiegen, vergleichbare *in vitro* Produkte sind bisher jedoch deutlich teurer als die traditionellen Protein- bzw. Lipidquellen und deren pflanzliche Alternativen. Abgesehen von den antinutritiven Bestandteilen dieser Zusätze muss dabei bedacht werden, dass die dafür benötigten Ackerflächen in direkter Konkurrenz zu dem Anbau von Nutzpflanzen für die direkte menschliche Ernährung oder die Energiegewinnung stehen. Wegen dieser generellen Problemstellung ist es auch Anspruch dieser Arbeit gewesen, eine neuartige Alternative bzw. Strategie zu durchdenken und Lösungsansätze zu entwi-

ckeln, bei denen die möglichen Problemstellungen von Morgen schon heute in den Vordergrund gestellt werden.

Der Biotechnologiesektor orientiert sich tatsächlich in die Richtung mariner Ressourcen. In den Meeren unserer Erde werden eine Vielzahl neuer Strukturen und potentieller neuer Substanzen und chemischer Verbindungen vermutet, so dass es auf lange Sicht betrachtet interessant werden könnte, Fischzellkulturen als biotechnologische Werkzeuge vorzuhalten. Schon heute werden rund 50 % aller biotechnologischen *in vivo* Diagnostika und therapeutischen Produkte in oder mit Hilfe von tierischen Zellen produziert, deren posttranslationale Modifikationen einzigartige Muster darstellen. Die schon heute herausragende Bedeutung tierischer Zellkulturen ist auch für Fischzellen gegeben, sobald das metabolische und molekularbiologische Potential dieser Organismen im Ansatz erfasst worden ist. Abgesehen davon, dass Fische die mit Abstand artenreichste Klasse der Wirbeltiere sind, zeigen sie eine hervorragende Anpassung an ihre natürlichen Lebensumstände. Darunter finden sich Arten, deren Metabolismus an arktische Temperaturen oder extreme Druckverhältnisse angepasst ist. Besonders die Tiefseearten leben und überleben in völliger Dunkelheit und unter extremen Bedingungen. Die Eigenschaften dieser und weiterer aquatischer Organismen bestimmen den biotechnologischen Wert dieses Ökosystems.

Die beiden marinen LC-PUFAs EPA und DHA sind wegen ihrer Exklusivität der ernährungsphysiologisch wertvolle Bestandteil von Meeresfrüchten. Diese, für den menschlichen Organismus semiessentiellen und biologisch aktiven Omega-3 Fettsäuren, sind besonders dann wichtige Bestandteile eine ausgewogenen Ernährung, wenn das Nahrungsspektrum reich an Omega-6 Fettsäuren ist. Um die nach wie vor anwachsende Erdbevölkerung weiterhin mit Nahrungsfischen bzw. Lebensmittel reich an EPA und DHA zu versorgen, ist es unerlässlich, die Fischproduktion in der Aquakultur weiter auszubauen. Dafür und darüber hinaus bedarf es allerdings einer nachhaltigeren Nutzung natürlicher Ressourcen, welche eine der wichtigsten Aufgabe dieser und zukünftiger Generationen sein wird.

5. Literaturverzeichnis

- Abele et al. 2002** Abele, D., Heise, K., Pörtner, H. O., and Puntarulo, S. (2002). *Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam Mya arenaria*. J Exp Biol, 205(Pt 13):1831–1841.
- Adarme-Vega et al. 2012** Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K. Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., and Schenk, P. M. (2012). *Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production*. Microb Cell Fact, 11:96.
- Aktories et al. 2009** Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., and Starke, K. (2009). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH.
- Araseki et al. 2005** Araseki, M., Kobayashi, H., Hosokawa, M., and Miyashita, K. (2005). *Lipid peroxidation of a human hepatoma cell line (hepg2) after incorporation of linoleic acid, arachidonic acid, and docosahexaenoic acid*. Biosci Biotechnol Biochem, 69(3):483–490.
- arznei-telegramm 2012** arznei-telegramm (2012). *Bewertung: Calcitonine*. <http://www.arznei-telegramm.de/db/wkstxt.php3?&knr=029411/407817&art=Gruppe&nummer=Calcitonine&ord=uaw>
- Ayadi et al. 2012** Ayadi, F. Y., Rosentrater, K. A., and Muthukumarappan, K. (2012). *Alternative protein sources for aquaculture feeds*. Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition, 4:1–26.
- Bang et al. 1971** Bang, H. O., Dyerberg, J., and Nielsen, A. B. (1971). *Plasma lipid and lipoprotein pattern in greenlandic west-coast eskimos*. Lancet, 1(7710):1143–1145.
- Bang et al. 1980** Bang, H. O., Dyerberg, J., and Sinclair, H. M. (1980). *The composition of the eskimo food in north western greenland*. Am J Clin Nutr, 33(12):2657–2661.
- Bannenberg und Serhan 2010** Bannenberg, G. and Serhan, C. N. (2010). *Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update*. Biochim Biophys Acta, 1801(12):1260–1273.
- Basciano et al. 2011** Basciano, L., Nemos, C., Foliguet, B., de Isla, N., de Carvalho, M., Tran, N., and Dalloul, A. (2011). *Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status*. BMC Cell Biol, 12:12.

5. Literaturverzeichnis

- Bendiksen et al. 2011** Bendiksen, E., Johnsen, C. A., Olsen, H. J., and Jobling, M. (2011). *Sustainable aquafeeds: Progress towards reduced reliance upon marine ingredients in diets for farmed atlantic salmon (Salmo salar L.)*. *Aquaculture*, 314:132–139.
- Bols 1991** Bols, N. C. (1991). *Biotechnology and aquaculture: the role of cell cultures*. *Biotechnol Adv*, 9(1):31–49.
- Bols et al. 1992** Bols, N. C., Mosser, D. D., and Steels, G. B. (1992). *Temperature studies and recent advances with fish cells*. *Camp. Biochem. Physiol.*, 103A:1–14.
- Bols et al. 2005** Bols, N., Dayeh, V., Lee, L., and Schirmer, K. (2005). *Chapter 2 - Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology* in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier.
- Brennan et al. 2012** Brennan, L. M., Widder, M. W., Lee, L. E. J., and van der Schalie, W. H. (2012). *Long-term storage and impedance-based water toxicity testing capabilities of fluidic biochips seeded with RTgill-w1 cells*. *Toxicol In Vitro*, 26(5):736–745.
- Bronzi et al. 2011** Bronzi, P., Rosenthal, H., and Gessner, J. (2011). *Global sturgeon aquaculture production: an overview*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27:169–175.
- Buck und Loh 1985** Buck, C. D. and Loh, P. C. (1985). *Growth of brown bullhead (BB) and other fish cell lines on microcarriers and the production of channel catfish virus (CCV)*. *J Virol Methods*, 10(2):171–184.
- Burdge 2006** Burdge, G. C. (2006). *Metabolism of alpha-linolenic acid in humans*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 75(3):161–168.
- Burkitt 1973** Burkitt, D. P. (1973). *Some diseases characteristic of modern western civilization*. *Br Med J*, 1(5848):274–278.
- Buzzi et al. 1996** Buzzi, M., Henderson, R. J., and Sargent, J. R. (1996). *The desaturation and elongation of linolenic acid and eicosapentaenoic acid by hepatocytes and liver microsomes from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed diets containing fish oil or olive oil*. *Biochim Biophys Acta*, 1299(2):235–244.
- Buzzi et al. 1997** Buzzi, M., Henderson, R. J., and Sargent, J. R. (1997). *Biosynthesis of docosahexaenoic acid in trout hepatocytes proceeds via 24-carbon intermediates*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 116(2):263–267.
- Cabo et al. 2012** Cabo, J., Alonso, R., and Mata, P. (2012). *Omega-3 fatty acids and blood pressure*. *Br J Nutr*, 107 Suppl 2:195–200.
- Cabré et al. 2012** Cabré, E., Mañosa, M., and Gassull, M. A. (2012). *Omega-3 fatty acids and inflammatory bowel diseases - a systematic review*. *Br J Nutr*, 107 Suppl 2:S240–S252.

5. Literaturverzeichnis

- Calder 2006** Calder, P. C. (2006). *N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 83(6 Suppl):1505–1519.
- Calder 2008** Calder, P. C. (2008). *PUFA, inflammatory processes and rheumatoid arthritis*. Proc Nutr Soc, 67(4):409–418.
- Calder 2012** Calder, P. C. (2012). *Mechanisms of action of (n-3) fatty acids*. J Nutr, 142(3):592S–599S.
- Caldwell und Vernberg 1970** Caldwell, R. S. and Vernberg, F. (1970). *The influence of acclimation temperature on the lipid composition of fish gill mitochondria*. Comparative Biochemistry and Physiology, 1:179–191.
- Campbell und Bello 2012** Campbell, S. C. and Bello, N. T. (2012). *Omega-3 fatty acids and obesity*. J Food Nutr Disor, 2:1–2.
- Carlson et al. 2013** Carlson, S. J., Fallon, E. M., Kalish, B. T., Gura, K. M., and Puder, M. (2013). *The role of the n-3 fatty acid DHA in the human life cycle*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 37(1):15–22.
- Cawood et al. 2010** Cawood, A. L., Ding, R., Napper, F. L., Young, R. H., Williams, J. A., Ward, M. J. A., Gudmundsen, O., Vige, R., Payne, S. P. K., Ye, S., Shearman, C. P., Gallagher, P. J., Grimble, R. F., and Calder, P. C. (2010). *Eicosapentaenoic acid (EPA) from highly concentrated n-3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increased stability*. Atherosclerosis, 212(1):252–259.
- Chen et al. 1992** Chen, Z., Chen, Y., Shi, Y., Yie, X., and Yang, G. (1992). *Microcarrier culture of fish cells and viruses in cell culture bioreactor*. Can J Microbiol, 38(3):222–225.
- Chen et al. 2005** Chen, J., Sun, X., Zhang, L., Yi, X., and Zhang, Y. (2005). *Mass cultivation of marine fish chinook salmon embryo cells in bioreactor with low-serum medium*. Aquaculture, 249:35–45.
- Cho und Kim 2010** Cho, J. H. and Kim, I. H. (2010). *Fish meal – nutritive value*. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 95:685–692.
- Crawford et al. 1997** Crawford, M. A., Costeloe, K., Ghebremeskel, K., Phylactos, A., Skirvin, L., and Stacey, F. (1997). *Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies?* Am J Clin Nutr, 66(4 Suppl):1032S–1041S.

5. Literaturverzeichnis

- Delgado-Lista et al. 2012** Delgado-Lista, J., Perez-Martinez, P., Lopez-Miranda, J., and Perez-Jimenez, F. (2012). *Long-chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review*. Br J Nutr, 107 Suppl 2:S201–S213.
- DGE** DGE (2008). D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Neuer Umschau Buchverlag
- Dobbing und Sands 1973** Dobbing, J. and Sands, J. (1973). *Quantitative growth and development of human brain*. Arch Dis Child, 48(10):757–767.
- Eibl et al. 2009** Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R., Catapano, G., and Czermak, P. (2009). Cell and Tissue Reaction Engineering. Springer.
- Erkkila et al. 2004** Erkkila, A. T., Lichtenstein, A. H., Mozaffarian, D., and Herrington, D. M. (2004). *Fish intake is associated with a reduced progression of coronary artery atherosclerosis in postmenopausal women with coronary artery disease*. American Society for Clinical Nutrition, 80:626–632.
- Eslick et al. 2009** Eslick, G. D., Howe, P. R. C., Smith, C., Priest, R., and Bensoussan, A. (2009). *Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis*. Int J Cardiol, 136(1):4–16.
- FAO** <http://www.fao.org/economic/est/prices>
- FAO 2012** FAO (2012). The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO.
- FAOstat** FAOstat (2009). <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>.
- Fent 2001** Fent, K. (2001). *Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome p4501a induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples*. Toxicol In Vitro, 15(4-5):477–488.
- Finne et al. 2008** Finne, E. F., Olsvik, P. A., Berntssen, M. H. G., Hylland, K., and Tollefsen, K. E. (2008). *The partial pressure of oxygen affects biomarkers of oxidative stress in cultured rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes*. Toxicol In Vitro, 22(6):1657–1661.
- FIZ** FIZ (2013). Fischwirtschaft - Daten und Fakten 2013. <http://www.fischinfo.de/>
- Flatt 1995** Flatt, J. P. (1995). *Use and storage of carbohydrate and fat*. Am J Clin Nutr, 61(4 Suppl):952–959.
- Fontana et al. 2008** Fontana, F., Lanfredi, M., Kirschbaum, F., Garrido-Ramos, M. A., Robles, F., Forlani, A., and Congiu, L. (2008). *Comparison of karyotypes of Acipenser oxyrinchus and A. sturio by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization*. Genetica, 132(3):281–286.

5. Literaturverzeichnis

- Foudah et al. 2009** Foudah, D., Redaelli, S., Donzelli, E., Bentivegna, A., Miloso, M., Dalprà, L., and Tredici, G. (2009). *Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells*. Chromosome Res, 17(8):1025–1039.
- Fryer und Lannan 1994** Fryer, J. L. and Lannan, C. N. (1994). *Three decades of fish cell culture: A current listening of cell lines derived from fishes*. Journal of Tissue Culture Methods, 16:87–94.
- Gardner 1989** Gardner, H. W. (1989). *Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids*. Free Radic Biol Med, 7(1):65–86.
- Gatlin et al. 2007** Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E. J., Stone, D., Wilson, R., and Wurtele, E. (2007). *Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review*. Aquaculture Research, 38:551–579.
- Gaylord et al. 2006** Gaylord, T. G., Teague, A. M., and Barrows, F. T. (2006). *Taurine supplementation of all-plant protein diets for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Journal of the World Aquaculture Society, 37:509–517.
- Ghioni et al. 1997a** Ghioni, C., Bell, J. G., Bell, M. V., and Sargent, J. R. (1997a). *Fatty acid composition, eicosanoid production and permeability in skin tissues of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed a control or an essential fatty acid deficient diet*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 56(6):479–489.
- Ghioni et al. 1997b** Ghioni, C., Tocher, D. R., and Sargent, J. R. (1997b). *The effect of culture on morphology, lipid and fatty acid composition, and polyunsaturated fatty acid metabolism of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) skin cells*. Fish Physiology and Biochemistry, 16:499–513.
- GISSI P 1999** GISSI Prevenzione-Investigators (1999). *Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-prevenzione trial. gruppo italiano per lo studio della sopravvivenza nell'infarto miocardico*. Lancet, 354(9177):447–455.
- Giudetti und Cagnazzo 2012** Giudetti, A. M. and Cagnazzo, R. (2012). *Beneficial effects of n-3 PUFA on chronic airway inflammatory diseases*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 99(3-4):57–67.
- Giusto et al. 2000** Giusto, N. M., Pasquaré, S. J., Salvador, G. A., Castagnet, P. I., Roque, M. E., and Ilincheta de Boschero, M. G. (2000). *Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments*. Prog Lipid Res, 39(4):315–391.

5. Literaturverzeichnis

- Glaser et al. 2010** Glaser, C., Heinrich, J., and Koletzko, B. (2010). *Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism*. *Metabolism*, 59(7):993–999.
- Goldberg und Katz 2007** Goldberg, R. J. and Katz, J. (2007). *A meta-analysis of the analgesic effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for inflammatory joint pain*. *Pain*, 129(1-2):210–223.
- Gordan et al. 2007** Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C.-J., Diehl, J. A., and Simon, M. C. (2007). *HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity*. *Cancer Cell*, 11(4):335–347.
- Gottwald 2012** Gottwald, J. (2012). *Charakterisierung neuer Fischzellkulturen mittels molekularer Methoden mit Schwerpunkt auf der Untersuchung der Delta-6 Desaturase Expression*. Bachelor thesis, Fraunhofer EMB & University of Applied Sciences Jülich.
- Grayson et al. 2007** Grayson, W. L., Zhao, F., Bunnell, B., and Ma, T. (2007). *Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 358(3):948–953.
- Gregory et al. 2011** Gregory, M. K., King, H. W., Bain, P. A., Gibson, R. A., Tocher, D. R., and Schuller, K. A. (2011). *Development of a fish cell culture model to investigate the impact of fish oil replacement on lipid peroxidation*. *Lipids*, 46(8):753–764.
- Grim et al. 2011** Grim, J. M., Hyndman, K. A., Kriska, T., Girotti, A. W., and Crockett, E. L. (2011). *Relationship between oxidizable fatty acid content and level of antioxidant glutathione peroxidases in marine fish*. *J Exp Biol*, 214(Pt 22):3751–3759.
- Grunow et al. 2011a** Grunow, B., Noglick, S., Kruse, C., and Gebert, M. (2011a). *Isolation of cells from atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* and optimization of culture conditions*. *Aquat Biol*, 14:67–75.
- Grunow et al. 2011b** Grunow, B., Wenzel, J., Terlau, H., Langner, S., Gebert, M., and Kruse, C. (2011b). *In vitro developed spontaneously contracting cardiomyocytes from rainbow trout as a model system for human heart research*. *Cell Physiol Biochem*, 27(1):1–12.
- Guderley 2004** Guderley, H. (2004). *Metabolic responses to low temperature in fish muscle*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79(2):409–427.
- Gueck et al. 2004** Gueck, T., Seidel, A., Baumann, D., Meister, A., and Fuhrmann, H. (2004). *Alterations of mast cell mediator production and release by gamma-linolenic and docosahexaenoic acid*. *Vet Dermatol*, 15(5):309–314.

5. Literaturverzeichnis

- Guschina und Harwood 2006a** Guschina, I. A. and Harwood, J. L. (2006a). *Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae*. Prog Lipid Res, 45(2):160–186.
- Guschina und Harwood 2006b** Guschina, I. A. and Harwood, J. L. (2006b). *Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms*. FEBS Lett, 580(23):5477–5483.
- Haagsma et al. 1982** Haagsma, N., van Gent, C. M., Luten, J. B., de Jong, R. W., and van Doorn, E. (1982). *Preparation of an omega-3 fatty acid concentrate from cod liver oil*. Journal of the American Oil Chemists Society, 59:117–118.
- Hakim 2012** Hakim, A. R. (2012). *The potential of heterotrophic microalgae (Schizochytrium sp.) as a source of DHA*. Squalen, 7(1):29–38.
- Hardy 2010** Hardy, R. W. (2010). *Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal*. Aquaculture Research, 41:770–776.
- Hazel 1995** Hazel, J. R. (1995). *Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation?* Annu Rev Physiol, 57:19–42.
- Heldmaier und Neuweiler 2012** Heldmaier, G. and Neuweiler, G. (2012). *Vergleichende Tierphysiologie*. Springer-Verlag.
- Henderson und Tocher 1987** Henderson, R. J. and Tocher, D. R. (1987). *The lipid composition and biochemistry of freshwater fish*. Prog Lipid Res, 26(4):281–347.
- Hibbeln et al. 2007** Hibbeln, J. R., Davis, J. M., Steer, C., Emmett, P., Rogers, I., Williams, C., and Golding, J. (2007). *Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study*. Lancet, 369(9561):578–585.
- Hightower und Renfro 1988** Hightower, L. E. and Renfro, J. L. (1988). *Recent applications of fish cell culture to biomedical research*. J Exp Zool, 248(3):290–302.
- Hoffmann 2010** Hoffmann, D. (2010). *Biomasseproduktion adhären wachsender Zellen im Bioreaktor: Etablierung einer 3D-Dachstumsfläche*. Bachelor thesis, Fraunhofer EMB & University of Applied Sciences Darmstadt.
- Hong et al. 2011** Hong, N., Li, Z., and Hong, Y. (2011). *Fish stem cell cultures*. Int J Biol Sci, 7(4):392–402.
- Houssami et al. 1995** Houssami, S., Findlay, D. M., Brady, C. L., Martin, T. J., Epand, R. M., Moore, E. E., Murayama, E., Tamura, T., Orlowski, R. C., and Sexton, P. M. (1995). *Divergent structural requirements exist for calcitonin receptor binding specificity and adenylate cyclase activation*. Mol Pharmacol, 47(4):798–809.

5. Literaturverzeichnis

- Howren et al. 2009** Howren, M. B., Lamkin, D. M., and Suls, J. (2009). Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*, 71(2):171–186.
- Hughes et al. 2007** Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H., and Gelber, C. (2007). *The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?* *Biotechniques*, 43(5):575, 577–8, 581–2 passim.
- IFFO** <http://www.iffonet.net/iffoupdate>
- Imhoff-Kunsch et al. 2012** Imhoff-Kunsch, B., Briggs, V., Goldenberg, T., and Ramakrishnan, U. (2012). *Effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake during pregnancy on maternal, infant, and child health outcomes: a systematic review*. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 26 Suppl 1:91–107.
- Indexmundi** <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=fish-meal&months=360>
- Ingemansson et al. 1993** Ingemansson, T., Olsson, N., and Kaufmann, P. (1993). *Lipid composition of light and dark muscle of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after thermal acclimation: a multivariate approach*. *Aquaculture*, 113:153–165.
- Ingerslev et al. 2010** Ingerslev, H.-C., Ossum, C. G., Lindenstrøm, T., and Nielsen, M. E. (2010). *Fibroblasts express immune relevant genes and are important sentinel cells during tissue damage in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *PLoS One*, 5(2):e9304.
- Jackson 2009a** Jackson, A. (2009a). *The continuing demand for sustainable fishmeal and fish oil in aquaculture diets*. *International Aquafeed*, 12:32–36.
- Jackson 2009b** Jackson, A. (2009b). *Fish in - fish out (FIFO) ratios explained*. Technical report, IFFO.
- Jackson 2012** Jackson, A. (2012). *Fishmeal and Fish oil and its role in sustainable aqua*. *International Aquafeed*.
- Jafari et al. 2013** Jafari, T., Fallah, A. A., and Azadbakht, L. (2013). *Role of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: A review of epidemiological and clinical studies*. *Maturnitas*, 74(4):303-308
- Jensen et al. 2010** Jensen, C. L., Voigt, R. G., Llorente, A. M., Peters, S. U., Prager, T. C., Zou, Y. L., Rozelle, J. C., Turcich, M. R., Fraley, J. K., Anderson, R. E., and Heird, W. C. (2010). *Effects of early maternal docosahexaenoic acid intake on neuropsychological status and visual acuity at five years of age of breast-fed term infants*. *J Pediatr*, 157(6):900–905.
- Jiang et al. 2011** Jiang, W.-D., Wu, P., Kuang, S.-Y., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Li, S.-H., Tang, L., Feng, L., and Zhou, X.-Q. (2011). *Myo-inositol prevents copper-induced oxidative damage*

5. Literaturverzeichnis

and changes in antioxidant capacity in various organs and the enterocytes of juvenile Jian carp (Cyprinus carpio var. jian). Aquat Toxicol, 105(3-4):543–551.

Katan et al. 1997 Katan, M. B., Deslypere, J. P., van Birgelen, A. P., Penders, M., and Zegwaard, M. (1997). *Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesterol esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study.* J Lipid Res, 38(10):2012–2022.

Kawakami 2010 Kawakami, A. (2010). *Stem cell system in tissue regeneration in fish.* Dev Growth Differ, 52(1):77–87.

Kaya et al. 2008 Kaya, Y., Turan, H., and Erdem, M. E. (2008). *Fatty acid and amino acid composition of raw and hot smoked sturgeon (Huso huso, l. 1758).* Int J Food Sci Nutr, 59(7-8):635–642.

Kelland 2011 Kelland, K. (2011). Petri dish to dinner plate, in-vitro meat coming soon.

Kleinman et al. 2003 Kleinman, H. K., Philp, D., and Hoffman, M. P. (2003). *Role of the extracellular matrix in morphogenesis.* Curr Opin Biotechnol, 14(5):526–532.

Kruse et al. 2006 Kruse, C., Kajahn, J., Petschnik, A. E., Maass, A., Klink, E., Rapoport, D. H., and Wedel, T. (2006). *Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures.* Ann Anat, 188(6):503–517.

Lakra et al. 2011 Lakra, W. S., Swaminathan, T. R., and Joy, K. P. (2011). *Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review.* Fish Physiol Biochem, 37(1):1–20.

Le Pillouer-Prost 2003 Le Pillouer-Prost, A. (2003). *Fibroblasts: what's new in cellular biology?* J Cosmet Laser Ther, 5(3-4):232–238.

Ledford 2013 Ledford, H. (2013). *Transgenic salmon nears approval.* Nature, 497:17–18.

Lee et al. 2009 Lee, L. E. J., Dayeh, V. R., Schirmer, K., and Bols, N. C. (2009). *Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-w1.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 45(3-4):127–134.

Leung et al. 2011 Leung, H. W., Chen, A., Choo, A. B. H., Reuveny, S., and Oh, S. K. W. (2011). *Agitation can induce differentiation of human pluripotent stem cells in microcarrier cultures.* Tissue Eng Part C Methods, 17(2):165–172.

Li et al. 1985 Li, M. F., Marrayatt, V., Annand, C., and Odense, P. (1985). *Fish cell culture: two newly developed cell lines from atlantic sturgeon (Acipenser oxyrinchus) and guppy (Poecilia reticulata).* Canadian Journal of Zoology, 63:2867–2874.

5. Literaturverzeichnis

- Loh und Choong 2013** Loh, Q. L. and Choong, C. (2013). *Three-dimensional scaffolds for tissue engineering: Role of porosity and pore size*. Tissue Eng Part B Rev., 19(6):485-502.
- Lu et al. 1996** Lu, S., Gough, A. W., Bobrowski, W. F., and Stewart, B. H. (1996). *Transport properties are not altered across caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes*. J Pharm Sci, 85(3):270–273.
- Lydersen et al. 1985** Lydersen, B. K., Pugh, G. G., Paris, M. S., Sharma, B. P., and Noll, L. A. (1985). *Ceramic matrix for large scale animal cell culture*. Nature Biotechnology, 3:63–67.
- Makrides et al. 2010** Makrides, M., Smithers, L. G., and Gibson, R. A. (2010). *Role of long-chain polyunsaturated fatty acids in neurodevelopment and growth*. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program, 65:123–33; discussion 133–6.
- Mambrini und Kaushik 1995** Mambrini, M. and Kaushik, S. J. (1995). *Indispensable amino acid requirements of fish: correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins*. Journal of Applied Ichthyology, 11:240–247.
- Mano et al. 1990** Mano, T., Kimura, T., Iijima, S., Takahashi, K., Takeuchi, H., and Kobayashi, T. (1990). *Comparison of oxygen supply methods for cultures of shear-stress sensitive organisms including animal cell culture*. J Chem Technol Biotechnol, 47(3):259–271.
- Marsen et al. 1992** Marsen, T. A., Pollok, M., Oette, K., and Baldamus, C. A. (1992). *Pharmacokinetics of omega-3-fatty acids during ingestion of fish oil preparations*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 46(3):191–196.
- Martinez-Alvarez et al. 2005** Martinez-Alvarez, R. M., Morales, A. E., and Sanz, A. (2005). *Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 15:75–88.
- Matthews 1999** Matthews, B. F. (1999). *Chapter 6 - Lysine, Threonine and Methionine Biosynthesis* in Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology. CRC Press.
- Miller et al. 2008** Miller, M. R., Nichols, P. D., and Carter, C. G. (2008). *n-3 oil sources for use in aquaculture—alternatives to the unsustainable harvest of wild fish*. Nutr Res Rev, 21(2):85–96.
- Milte et al. 2012** Milte, C. M., Parletta, N., Buckley, J. D., Coates, A. M., Young, R. M., and Howe, P. R. C. (2012). *Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, cognition, and behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a randomized controlled trial*. Nutrition, 28(6):670–677.

5. Literaturverzeichnis

- Miyashita et al. 1993** Miyashita, K., Nara, E., and Ota, T. (1993). *Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids in an aqueous solution*. Biosciences Biotechnology and Biochemistry, 57:1638–1640.
- Mommsen 2001** Mommsen, T. P. (2001). *Paradigms of growth in fish*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 129(2-3):207–219.
- Monroig et al. 2011** Monroig, O., Navarro, J. C., and Tocher, D. R. (2011). *Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Fish - Recent Advances on Desaturases and Elongases Involved in Their Biosynthesis in Avances en Nutrición Acuicola XI*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- Myers und Worm 2003** Myers, R. A. and Worm, B. (2003). *Rapid worldwide depletion of predatory fish communities*. Nature, 423(6937):280–283.
- Nakatani et al. 2007** Nakatani, Y., Kawakami, A., and Kudo, A. (2007). *Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins*. Dev Growth Differ, 49(2):145–154.
- Naylor und Burke 2005** Naylor, R. and Burke, M. (2005). *Aquaculture and ocean resources: Raising tiger of the sea*. Annu Rev Environ Resour, 30:185–218.
- Naylor et al. 1998** Naylor, R. L., Goldburg, R. J., Mooney, H., Beveridge, M., Clay, J., Folke, C., Kautsky, N., Lubchenco, J., Primavera, J., and Williams, M. (1998). *Nature's subsidies to shrimp and salmon farming*. Science, 282:883–884.
- Naylor et al. 2000** Naylor, R. L., Goldburg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., and Troell, M. (2000). *Effect of aquaculture on world fish supplies*. Nature, 405(6790):1017–1024.
- Naylor et al. 2009** Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrelle, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldburgh, R. J., Huac, K., and Nichols, P. D. (2009). *Feeding aquaculture in an era of finite resources*. PNAS, 106:15103–15110.
- Ng und Hung 1994** Ng, W. K. and Hung, S. S. (1994). *Amino acid composition of whole body, egg and selected tissues of white sturgeon (Acipenser transmontanus)*. Aquaculture, 126:329–339.
- Nichols et al. 2010** Nichols, P. D., Petrie, J., and Singh, S. (2010). *Long-chain omega-3 oils - an update on sustainable sources*. Nutrients, 2(6):572–585.
- Nicholson 1980** Nicholson, B. L. (1980). *Growth of fish cell lines on microcarriers*. Appl Environ Microbiol, 39(2):394–397.

5. Literaturverzeichnis

- Nicholson et al. 2013** Nicholson, T., Khademi, H., and Moghadasian, M. H. (2013). *The role of marine n-3 fatty acids in improving cardiovascular health: a review*. Food Funct, 4(3):357–365.
- Niki 2009** Niki, E. (2009). *Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects*. Free Radic Biol Med, 47(5):469–484.
- OilWorld** <http://www.oilworld.biz>
- Olsen und Hasan 2012** Olsen, R. L. and Hasan, M. R. (2012). *A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production*. Trends in Food Science & Technology, 27:120–128.
- Olsen 2011** Olsen, Y. (2011). *Resources for fish feed in future mariculture*. Aquacult Environ Interact, 1:187–200.
- Oomen et al. 2000** Oomen, C. M., Feskens, E. J., Räsänen, L., Fidanza, F., Nissinen, A. M., Menotti, A., Kok, F. J., and Kromhout, D. (2000). *Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy, and the Netherlands*. Am J Epidemiol, 151(10):999–1006.
- Park et al. 2009** Park, W. J., Kothapalli, K. S. D., Lawrence, P., Tyburczy, C., and Brenna, J. T. (2009). *An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product delta 8 desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3*. J Lipid Res, 50(6):1195–1202.
- Patterson et al. 2012** Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., and Stanton, C. (2012). *Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids*. J Nutr Metab, 2012:539426.
- Pauly et al. 1998** Pauly, Christensen, Dalsgaard, Froese, and Torres (1998). *Fishing down marine food webs*. Science, 279(5352):860–863.
- Pauly et al. 2003** Pauly, D., Alder, J., Bennett, E., Christensen, V., Tyedmers, P., and Watson, R. (2003). *The future for fisheries*. Science, 302(5649):1359–1361.
- Pauly et al. 2005** Pauly, D., Watson, R., and Alder, J. (2005). *Global trends in world fisheries: impacts on marine ecosystems and food security*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 360(1453):5–12.
- Peiser et al. 1993** Peiser, C., Riebe-Imre, M., Emura, M., and Mohr, U. (1993). *Influence of culture passages on growth kinetics, xenobiotic metabolism, chromosomal stability and transformation in a clonal fetal hamster lung epithelial cell line*. Mutat Res, 289(2):281–290.
- Pratoomyot et al. 2010** Pratoomyot, J., Bendiksen, E., Bell, J., and D.R.Tocher (2010). *Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth*

5. Literaturverzeichnis

performance and body lipid composition of atlantic salmon (Salmo salar L.). Aquaculture, 305:124–132.

Pörtner und Giese 2006 Pörtner, R. and Giese, C. (2006). *Chapter 2 - An Overview on Bioreactor Design, Prototyping and Process Control for Reproducible Three-Dimensional Tissue Culture in Drug Testing in vitro: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Rakers et al. 2011 Rakers, S., Klinger, M., Kruse, C., and Gebert, M. (2011). *Pros and cons of fish skin cells in culture: Long-term full skin and short-term scale cell culture from rainbow trout, Oncorhynchus mykiss.* Eur J Cell Biol, 90(12):1041–1051.

Rakers 2012a Rakers, S. (2012a). *Anwendungspotential multipotenter Zellen aus der Regenbogenforellenhaut - Zellkulturen, Zytotoxizität und dreidimensionale Zellkultur.pdf.* PhD thesis, Fraunhofer EMB.

Rakers 2012b Rakers, S. (2012b). *Anwendungspotentiale multipotenter Zellen aus Regenbogenforellenhaut: Zellkulturen, Zytotoxizität und dreidimensionale Zellkultur.* Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften.

Rapoport et al. 2009 Rapoport, D. H., Schick Tanz, S., Gürleyik, E., Zühlke, C., and Kruse, C. (2009). *Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells.* Ann Anat, 191(5):446–458.

Reya et al. 2001 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). *Stem cells, cancer, and cancer stem cells.* Nature, 414(6859):105–111.

Richard 2006 Richard, N. (2006). *Effet du taux et de la nature des lipides alimentaires sur les mécanismes intervenant dans la constitution des dépôts lipidiques (transport, captage, synthèse) chez la truite arc-en-ciel et le bar.* Ecole doctorale des sciences du vivant, géosciences, sciences de l'environnement. PhD thesis, Université de Bordeaux I.

Richardson 2004 Richardson, A. J. (2004). *Clinical trials of fatty acid treatment in ADHD, dyslexia, dyspraxia and the autistic spectrum.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 70(4):383–390.

RoteListe RoteListe® online (2013)

Ruyter et al. 2003 Ruyter, B., Røsjø, C., Grisdale-Helland, B., Rosenlund, G., Obach, A., and Thomassen, M. S. (2003). *Influence of temperature and high dietary linoleic acid content on esterification, elongation, and desaturation of PUFA in atlantic salmon hepatocytes.* Lipids, 38(8):833–840.

5. Literaturverzeichnis

- Ryan et al. 2011** Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2011). *Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish*. *Nutrients*, 3(9):765–791.
- Ryan et al. 2008** Ryan, L. A., Seymour, C. B., O'Neill-Mehlenbacher, A., and Mothersill, C. E. (2008). *Radiation-induced adaptive response in fish cell lines*. *J Environ Radioact*, 99(4):739–747.
- Sargent et al. 2002** Sargent, J. R., Tocher, D. R., and Bell, J. G. (2002). *Chapter 4 - The Lipids in Fish Nutrition*. Academic Press.
- Schirmer 2006** Schirmer, K. (2006). *Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish*. *Toxicology*, 224(3):163–183.
- Schmitz und Ecker 2008** Schmitz, G. and Ecker, J. (2008). *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids*. *Prog Lipid Res*, 47(2):147–155.
- Schulze-Jena 2012** Schulze-Jena, A. (2012). *Sprühvernebelung von medium zur Massenkultivierung adhärent wachsender Zellen im Bioreaktor*. Bachelors thesis, Fraunhofer EMB & University of Applied Sciences Hamburg.
- Simopoulos 2011** Simopoulos, A. P. (2011). *Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain*. *Mol Neurobiol*, 44(2):203–215.
- Simopoulos und DeMeester 2009** Simopoulos, A. P. and DeMeester, F. (2009). *A Balanced Omega-6/ Omega-3 Fatty Acid Ratio, Cholesterol and Coronary Heart Disease (World Review of Nutrition and Dietetics)*. Karger.
- Sinclair 1956** Sinclair, H. M. (1956). *Deficiency of essential fatty acids and atherosclerosis, etcetera*. *Lancet*, 270(6919):381–383.
- Smith 1985** Smith, T. I. (1985). *The fishery, biology, and management of atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, in north america*. *Environmental Biology of Fishes*, 14:61–72.
- Snyder et al. 2012** Snyder, R. J., Schregel, W. D., and Wei, Y. (2012). *Effects of thermal acclimation on tissue fatty acid composition of freshwater alewives (*Alosa pseudoharengus*)*. *Fish Physiol Biochem*, 38(2):363–373.
- Sommerset et al. 2005** Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., and Frost, P. (2005). *Vaccines for fish in aquaculture*. *Expert Rev Vaccines*, 4(1):89–101.
- Sorgi et al. 2007** Sorgi, P. J., Hallowell, E. M., Hutchins, H. L., and Sears, B. (2007). *Effects of an open-label pilot study with high-dose EPA/DHA concentrates on plasma phospholipids and behavior in children with attention deficit hyperactivity disorder*. *Nutr J*, 6:16.

5. Literaturverzeichnis

- Sublette et al. 2011** Sublette, M. E., Ellis, S. P., Geant, A. L., and Mann, J. J. (2011). *Meta-analysis of the effects of eicosapentaenoic acid (EPA) in clinical trials in depression*. J Clin Psychiatry, 72(12):1577–1584.
- Swathi et al. 2012** Swathi, V., Pratap, P. R., Monila, N., RajaSekhar, J., and Ramesh, A. (2012). *The oceans - unlocking the treasured drugs*. International Journal Of Pharmaceutical and Chemical Sciences, 1:1098–1105.
- Tacon und Metian 2009** Tacon, A. G. J. and Metian, M. (2009). *Fishing for feed or fishing for food: increasing global competition for small pelagic forage fish*. Ambio, 38(6):294–302.
- Takahashi et al. 2001** Takahashi, M., Shibata, M., and Niki, E. (2001). *Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine*. Free Radic Biol Med, 31(2):164–174.
- Takeuchi 2001** Takeuchi, T. (2001). *A review of feed development for early life stages of marine finfish in japan*. Aquaculture, 200:203–222.
- Tinoco 1982** Tinoco, J. (1982). *Dietary requirements and functions of ALA in animals*. Progress in Lipid Research, 21:1–45.
- Tocher 2003** Tocher, D. R. (2003). *Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish*. Reviews in Fisheries Science, 2:107–184.
- Tocher 2010** Tocher, D. R. (2010). *Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish*. Aquaculture Research, 41:717–732.
- Tocher und Dick 1990** Tocher, D. R. and Dick, J. R. (1990). *Polyunsaturated fatty acid metabolism in cultured fish cells: Incorporation and metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by atlantic salmon (Salmo salar) cells*. Fish Physiol Biochem, 8(4):331–319.
- Tocher und Sargent 1990** Tocher, D. R. and Sargent, J. R. (1990). *Effect of temperature on the incorporation into phospholipid classes and metabolism via desaturation and elongation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish cells in culture*. Lipids, 25:435–442.
- Tocher et al. 1988** Tocher, D. R., Sargent, J. R., and Frerichs, G. N. (1988). *The fatty acid compositions of established fish cell lines after long-term culture in mammalian sera*. Fish Physiol Biochem, 5(4):219–227.
- Tocher et al. 1989** Tocher, D. R., Carr, J., and Sargent, J. R. (1989). *Polyunsaturated fatty acid metabolism in fish cells: differential metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by cultured cells originating from a freshwater teleost fish and from a marine teleost fish*. Comp Biochem Physiol B, 94(2):367–374.

5. Literaturverzeichnis

- Tocher et al. 2003** Tocher, D. R., Agaba, M., Hastings, N., and Teale, A. J. (2003). *Biochemical and molecular studies of the polyunsaturated fatty acid desaturation pathway in fish*. In Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference, volume 46, pages 211–227.
- Tocher et al. 2004** Tocher, D. R., Fonseca-Madrigal, J., Dick, J. R., Ng, W.-K., Bell, J. G., and Campbell, P. J. (2004). *Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 137(1):49–63.
- Turchini et al. 2009** Turchini, G. M., Torstensen, B. E., and Ng, W.-K. (2009). *Fish oil replacement in finfish nutrition*. *Reviews in Aquaculture*, 1:10–57.
- Uhe et al. 1992** Uhe, A. M., Collier, G. R., and O'Dea, K. (1992). *A comparison of the effects of beef, chicken and fish protein on satiety and amino acid profiles in lean male subjects*. *J Nutr*, 122(3):467–472.
- Upaganlawar und Badole 2013** Upaganlawar, A. B. and Badole, S. L. (2013). *Chapter 7 - Omega 3 Fatty Acids in Psoriasis in Bioactive Dietary Factors and Plant Extracts in Dermatology*. Springer-Verlag.
- Vagner und Santigosa 2011** Vagner, M. and Santigosa, E. (2011). *Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review*. *Aquaculture*, 315:131–143.
- van der Velden – de Groot 1995** van der Velden-de Groot, C. A. (1995). *Microcarrier technology, present status and perspective*. *Cytotechnology*, 18(1-2):51–56.
- van Wezel 1967** van Wezel, A. L. (1967). *Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture*. *Nature*, 216(5110):64–65.
- Vaughan et al. 2013** Vaughan, V. C., Hassing, M.-R., and Lewandowski, P. A. (2013). *Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy*. *Br J Cancer*, 108(3):486–492.
- Viegas et al. 2012** Viegas, M. N., Dias, J., Cancela, M. L., and Laize, V. (2012). *Polyunsaturated fatty acids regulate cell proliferation, extracellular matrix mineralization and gene expression in a gilthead seabream skeletal cell line*. *Journal of Applied Ichthyology*, 28:427–432.
- Villena 2003** Villena, A. J. (2003). *Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13:111–140.
- Voigt 2010** Voigt, M. (2010). *Untersuchung des dreidimensionalen Wachstums von adulten Stammzellen auf Carriern zur Erhöhung der Zellausbeute*. Diploma thesis, Fraunhofer EMB & University of Applied Sciences Lübeck.

5. Literaturverzeichnis

- Wagner et al. 1994** Wagner, B. A., Buettner, G. R., and Burns, C. P. (1994). *Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content*. Biochemistry, 33(15):4449–4453.
- Warnock und Al-Rubeai 2006** Warnock, J. N. and Al-Rubeai, M. (2006). *Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells*. Biotechnol Appl Biochem, 45(Pt 1):1–12.
- Watson und Pauly 2001** Watson, R. and Pauly, D. (2001). *Systematic distortions in world fisheries catch trends*. Nature, 414(6863):534–536.
- Weatherley und Gill 1983** Weatherley, A. H. and Gill, H. S. (1983). *Protein, lipid, water and caloric contents of immature rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*, growing at different rates*. J. Fish Biol., 23:653–673.
- Weil et al. 2013** Weil, C., Lefèvre, F., and Bugeon, J. (2013). *Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 23:157–173.
- WHO** WHO (2008). http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/index.html.
- Wilson und Halver 1986** Wilson, R. P. and Halver, J. E. (1986). *Protein and amino acid requirements of fishes*. Annu Rev Nutr, 6:225–244.
- Wolf und Ahne 1982** Wolf, K. and Ahne, W. (1982). *Fish cell culture* in Advances in Cell Culture: Volume 2. Academic Press.
- Wolf und Mann 1980** Wolf, K. and Mann, J. A. (1980). *Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes*. In Vitro, 16(2):168–179.
- Wolf und Quimby 1962** Wolf, K. and Quimby, M. C. (1962). *Established eurythermic line of fish cells in vitro*. Science, 135(3508):1065–1066.
- Wolf et al. 1960** Wolf, K., Quimby, M. C., Pyle, E. A., and Dexter, R. P. (1960). *Preparation of monolayer cell cultures from tissues of some lower vertebrates*. Science, 132(3443):1890–1891.
- Worm et al. 2006** Worm, B., Barbier, E. B., Beaumont, N., Duffy, J. E., Folke, C., Halpern, B. S., Jackson, J. B. C., Lotze, H. K., Micheli, F., Palumbi, S. R., Sala, E., Selkoe, K. A., Stachowicz, J. J., and Watson, R. (2006). *Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services*. Science, 314(5800):787–790.
- Wu 1999** Wu, S.-C. (1999). *Influence of hydrodynamic shear stress on microcarrier-attached cell growth: Cell line dependency and surfactant protection*. Bioprocess Engineering, 21:201–206.

- Yang und Basu 2012** Yang, S.-T. and Basu, S. (2012). *Chapter 9 - Animal Cell Culture in Materials in Biology and Medicine*. CRC Press 2012.
- Yeagle 1989** Yeagle, P. L. (1989). *Lipid regulation of cell membrane structure and function*. FASEB J, 3(7):1833–1842.
- Yin et al. 2011** Yin, H., Xu, L., and Porter, N. A. (2011). *Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis*. Chem Rev, 111(10):5944–5972.
- Yoo et al. 2011** Yoo, S. J., Kim, J., Lee, C.-S., and Nam, Y. (2011). *Simple and novel three dimensional neuronal cell culture using a micro mesh scaffold*. Exp Neurobiol, 20(2):110–115.
- Zaitseva et al. 2006** Zaitseva, M., Vollenhoven, B. J., and Rogers, P. A. W. (2006). *In vitro culture significantly alters gene expression profiles and reduces differences between myometrial and fibroid smooth muscle cells*. Mol Hum Reprod, 12(3):187–207.
- Zelenin et al. 1984** Zelenin, A. V., Poletaev, A. I., Stepanova, N. G., Barsky, V. E., Kolesnikov, V. A., Nikitin, S. M., Zhuze, A. L., and Gnutchchev, N. V. (1984). *7-amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry*. Cytometry, 5(4):348–354.
- Zeybek et al. 2011** Zeybek, N. D., Gulcelik, N. E., Kaymaz, F. F., Sarisozen, C., Vural, I., Bodur, E., Canpinar, H., Usman, A., and Asan, E. (2011). *Rosuvastatin induces apoptosis in cultured human papillary thyroid cancer cells*. J Endocrinol, 210(1):105–115.
- Zheng et al. 2009** Zheng, X., Ding, Z., Xu, Y., Monroig, O., Morais, S., and Tocher, D. R. (2009). *Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cdnas of fatty acyl delta-6 desaturase and ELOVO5 elongase of cobia (Rachycentron canadum)*. Aquaculture, 290:122–131.
- Zweigerdt 2009** Zweigerdt, R. (2009). *Large scale production of stem cells and their derivatives*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 114:201–235.

6. Anhang

6.1 Ergänzende Tabellen und Abbildungen aus dem Ergebnisteil

Tab. 9 | Aminosäurezusammensetzung der OMYsd1x Zellen in Passage 28 und 31 als Anteil vom Gesamtprotein [%] und als Massenanteil [g/100g Lyophilisat].

Aminosäure		DMEM 20% FKS		OMYsd1x	
		[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]
Arg	E	4,96	0,021	6,68	4,18
His	E	9,22	0,039	2,49	1,56
Ile	E	4,26	0,018	4,92	3,08
Leu	E	11,82	0,050	8,26	5,17
Lys	E	8,98	0,038	8,17	5,11
Met	E	0,95	0,004	2,80	1,75
Phe	E	5,20	0,022	4,70	2,94
Thr	E	0,47	0,002	5,11	3,20
Val	E	8,98	0,038	6,09	3,81
Ala	NE	10,40	0,044	5,58	3,49
Asp	NE	16,31	0,069	10,29	6,44
β-Ala	NE	n.d.	<0,001	0,11	0,07
Cys	NE	4,26	0,018	0,43	0,27
GABA	NE	n.d.	<0,0002	0,11	0,07
Glu	NE	4,73	0,020	14,37	8,99
Gly	NE	4,02	0,017	5,61	3,51
Pro	NE	4,73	0,020	4,46	2,79
Ser	NE	n.d.	<0,0002	5,05	3,16
Taurin	NE	n.d.	<0,0002	0,75	0,47
Tyr	NE	0,71	0,003	4,01	2,51
Summe			0,42		62,57

GABA: γ -Aminobuttersäure, E: essentielle Aminosäure, NE: nicht essentielle Aminosäure, n.d. nicht detektierbar.

Tab. 10 | Aminosäurezusammensetzung der AOXlar7 Zellen in Passage 36 als Anteil vom Gesamtprotein [%] und als Massenanteil [g/100g Lyophilisat].

Aminosäure		DMEM 10% FKS		AOXlar7	
		[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]
Arg	E	4,49	0,011	6,03	1,73
His	E	10,21	0,025	4,29	1,23
Ile	E	4,90	0,012	4,39	1,26
Leu	E	12,25	0,030	10,78	3,09
Lys	E	8,58	0,021	7,95	2,28
Met	E	0,82	0,002	1,78	0,51
Phe	E	5,31	0,013	4,01	1,15
Thr	E	0,33	0,0008	0,31	0,09
Val	E	10,21	0,025	6,17	1,77
Ala	NE	9,40	0,023	15,70	4,50
Asp	NE	15,11	0,037	17,58	5,04
β-Ala	NE	n.d.	<0,0002	n.d.	<0,05
Cys	NE	4,90	0,012	1,43	0,41
GABA	NE	n.d.	<0,0002	n.d.	<0,05
Glu	NE	4,90	0,012	3,38	0,97
Gly	NE	4,08	0,010	8,44	2,42
Pro	NE	4,08	0,010	4,95	1,42
Ser	NE	0,16	0,0004	n.d.	<0,05
Taurin	NE	n.d.	<0,0002	1,64	0,47
Tyr	NE	0,25	0,0006	1,15	0,33
Summe			0,24		28,67

GABA : γ -Aminobuttersäure, E : essentielle Aminosäure, NE : nicht essentielle Aminosäure, n.d. nicht detektierbar.

Tab. 11 | Fettsäurezusammensetzung von dem Zellkulturzusatz FKS als Anteil vom Gesamtfett [%] und als Massenanteil [g/100g Serum].

Fettsäure	[%]	[g/100g]
C16:0	16,1 ± 0,51	0,030 ± 0,0016
C18:0	12,0 ± 0,08	0,022 ± 0,0002
Σ SFA	32,7 ± 0,16	0,063 ± 0,0003
C18:1n-9	13,9 ± 1,70	0,025 ± 0,0043
Σ MUFA	19,2 ± 0,50	0,034 ± 0,0011
C18:2n-6	4,6 ± 0,39	0,008 ± 0,0003
C20:4n-6	2,2 ± 0,02	0,004 ± 0,0001
Σ n-6 PUFA	10,5 ± 0,47	0,019 ± 0,0003
C18:3n-3	10,3 ± 0,82	0,019 ± 0,0015
C20:5n-3	6,5 ± 1,38	0,012 ± 0,0016
C22:6n-3	n.d.	-
Σ n-3 PUFA	33,3 ± 0,99	0,062 ± 0,0018
Σ PUFA	47,5 ± 0,68	0,088 ± 0,0010
Summe		0,386 ± 0,179
n-3 / n-6	3,16	

ALA: α -Linolensäure, MUFA: einfach ungesättigte Fettsäure, n-3: Omega-3 Fettsäure, n-6: Omega-6 Fettsäure, n-9: Omega-9 Fettsäure, n.d. nicht detektierbar, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäure, SFA: gesättigte Fettsäure, Werte sind dargestellt als arithmetische Mittel ± Standardabweichung ($n = 3$).

Tab. 12 | Fettsäurezusammensetzung der OMYsd1x Zellen zwischen Passage 27 und Passage 31 als Anteil vom Gesamtfett [%] und als Massenanteil [g/100g Lyophilisat] bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

Fettsäure	OMYsd1x bei 20 °C		OMYsd1x bei 10 °C		OMYsd1x bei 20 °C + 130 µM ALA		OMYsd1x bei 10 °C + 130 µM ALA		OMYsd1x bei 10 °C + 65 µM ALA		OMYsd1x bei 10 °C + 32,5 µM ALA	
	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]
C16:0	14,9 ± 3,42	0,97 ± 0,02	17,0 ± 0,22	1,02 ± 0,01	14,9 ± 0,09	0,95 ± 0,02	16,5 ± 0,53	0,97 ± 0,02	16,7 ± 0,39	1,01 ± 0,04	17,0 ± 0,34	1,02 ± 0,02
C18:0	6,4 ± 3,09	0,42 ± 0,13	4,5 ± 0,71	0,27 ± 0,04	12,2 ± 0,71	0,77 ± 0,06	16,9 ± 8,36	0,98 ± 0,46	5,7 ± 0,12	0,34 ± 0,01	5,7 ± 0,38	1,02 ± 0,02
Σ SFA	26,9 ± 2,28	1,75 ± 0,05	24,1 ± 0,48	1,52 ± 0,02	28,8 ± 0,27	1,85 ± 0,03	34,2 ± 2,97	2,00 ± 0,16	24,5 ± 0,17	1,50 ± 0,02	24,5 ± 0,39	1,49 ± 0,02
C18:1n-9	51,1 ± 5,10	3,33 ± 0,35	47,3 ± 0,62	2,84 ± 0,04	29,1 ± 1,23	1,85 ± 0,04	22,9 ± 10,05	1,38 ± 0,64	43,9 ± 0,73	2,65 ± 0,10	45,5 ± 1,11	2,74 ± 0,07
Σ MUFA	53,1 ± 2,33	3,46 ± 0,20	47,3 ± 0,62	2,84 ± 0,04	29,1 ± 1,23	1,85 ± 0,04	22,9 ± 10,05	1,38 ± 0,64	43,9 ± 0,73	2,65 ± 0,10	45,5 ± 1,11	2,74 ± 0,07
C18:2n-6	9,1 ± 2,90	0,59 ± 0,07	9,8 ± 0,29	0,59 ± 0,01	8,9 ± 0,34	0,56 ± 0,01	7,9 ± 0,16	0,47 ± 0,03	8,8 ± 0,05	0,53 ± 0,01	8,8 ± 0,24	0,53 ± 0,03
C20:4n-6	3,6 ± 1,28	0,24 ± 0,04	5,8 ± 0,05	0,35 ± 0,01	4,6 ± 0,13	0,29 ± <0,01	0,1 ± 0,12	0,01 ± <0,01	4,6 ± 0,12	0,28 ± <0,01	1,5 ± 2,66	0,28 ± <0,01
Σ n-6 PUFA	14,5 ± 1,62	0,94 ± 0,05	18,6 ± 0,36	1,12 ± 0,02	14,9 ± 0,17	0,94 ± <0,01	12,5 ± 0,15	0,75 ± 0,02	15,1 ± 0,06	0,91 ± 0,01	14,2 ± 1,53	1,04 ± 0,06
C18:3n-3	n.d.	-	n.d.	-	15,6 ± 2,02	0,99 ± 0,15	8,6 ± 0,28	0,51 ± 0,02	2,2 ± 0,19	0,13 ± 0,01	1,6 ± 0,26	0,10 ± 0,01
C20:5n-3	n.d.	-	0,9 ± 0,29	0,05 ± 0,02	1,9 ± 0,12	0,12 ± 0,01	3,8 ± 0,36	0,22 ± 0,01	2,3 ± 0,17	0,14 ± 0,01	2,3 ± 0,44	0,14 ± 0,02
C22:6n-3	2,7 ± 0,67	0,18 ± 0,02	4,0 ± 0,11	0,24 ± 0,01	2,7 ± 0,21	0,17 ± 0,01	2,8 ± 0,05	0,17 ± 0,01	3,1 ± 0,08	0,19 ± 0,01	3,3 ± 0,11	0,20 ± 0,01
Σ n-3 PUFA	3,9 ± 0,80	0,26 ± 0,03	7,0 ± 0,15	0,42 ± 0,01	26,4 ± 0,51	1,69 ± 0,03	27,1 ± 0,31	1,60 ± 0,02	13,9 ± 0,18	0,85 ± 0,01	13,0 ± 0,25	0,79 ± 0,01
Σ PUFA	19,9 ± 0,91	1,30 ± 0,03	28,5 ± 0,24	1,72 ± 0,01	42,1 ± 0,36	2,69 ± 0,02	42,9 ± 0,34	2,55 ± 0,02	31,7 ± 0,12	1,92 ± 0,01	30,0 ± 0,53	2,00 ± 0,02
Summe		6,51 ± 0,38		6,01 ± 1,31		6,35 ± 0,14		5,93 ± 0,24		6,03 ± 0,14		6,02 ± 0,16
n-3/n-6	0,27		0,38		1,77		2,17		0,92		0,91	

ALA: α-Linolensäure, MUFA: einfach ungesättigte Fettsäure, n-3: Omega-3 Fettsäure, n-6: Omega-6 Fettsäure, n-9: Omega-9 Fettsäure, n.d. nicht detektierbar, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäure, SFA: gesättigte Fettsäure, Werte sind dargestellt als arithmetische Mittel ± Standardabweichung (n = 3).

Tab. 13 | Fettsäurezusammensetzung der AOXlar7 Zellen der Passagen 27 bis 29 als Anteil vom Gesamtfett [%] und als Massenanteil [g/100g Lyophilisat] bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

Fettsäure	AOXlar7 bei 25 °C		AOXlar7 bei 15 °C		AOXlar7 bei 25 °C + 130 µM ALA		AOXlar7 bei 15 °C + 130 µM ALA		AOXlar7 bei 15 °C + 65 µM ALA		AOXlar7 bei 15 °C + 32,5 µM ALA	
	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]	[%]	[g/100g]
C16:0	22,3 ± 0,58	1,40 ± 0,12	15,2 ± 0,48	1,16 ± 0,17	21,1 ± 0,26	1,29 ± 0,10	14,9 ± 1,10	1,16 ± 0,13	15,8 ± 0,42	1,37 ± 0,02	14,8 ± 0,81	1,10 ± 0,19
C18:0	18,1 ± 2,06	1,13 ± 0,10	12,6 ± 1,52	0,95 ± 0,05	22,4 ± 0,61	1,37 ± 0,07	16,3 ± 0,30	1,27 ± 0,03	14,6 ± 0,95	1,27 ± 0,12	15,3 ± 2,28	1,12 ± 0,03
Σ SFA	43,4 ± 0,31	2,71 ± 0,02	29,9 ± 0,31	2,27 ± 0,03	46,5 ± 0,12	2,85 ± 0,02	33,5 ± 0,21	2,62 ± 0,02	32,5 ± 0,17	2,82 ± 0,02	32,4 ± 0,42	2,39 ± 0,03
C18:1n-9	27,9 ± 2,71	1,75 ± 0,25	27,9 ± 2,63	2,15 ± 0,45	14,2 ± 0,84	0,86 ± 0,02	12,6 ± 1,35	0,99 ± 0,13	18,9 ± 1,35	1,63 ± 0,07	19,6 ± 2,62	1,47 ± 0,38
Σ MUFA	39,8 ± 0,42	2,50 ± 0,04	41,0 ± 0,64	3,16 ± 0,09	19,1 ± 0,22	1,19 ± 0,01	18,3 ± 0,25	1,44 ± 0,03	28,1 ± 0,27	2,44 ± 0,02	28,8 ± 0,49	2,17 ± 0,06
C18:2n-6	5,3 ± 0,84	0,33 ± 0,05	7,1 ± 2,13	0,53 ± 0,11	4,5 ± 0,27	0,27 ± 0,02	5,1 ± 1,13	0,40 ± 0,07	2,7 ± 0,10	0,23 ± 0,02	4,2 ± 0,76	0,31 ± 0,04
C20:4n-6	3,4 ± 0,33	0,21 ± 0,01	5,7 ± 0,49	0,43 ± 0,02	2,2 ± 0,11	0,14 ± 0,01	3,1 ± 0,55	0,24 ± 0,03	5,3 ± 0,44	0,46 ± 0,05	6,2 ± 0,58	0,46 ± 0,06
Σ n-6 PUFA	10,9 ± 0,48	0,68 ± 0,02	16,0 ± 0,97	1,21 ± 0,05	8,2 ± 0,20	0,50 ± 0,01	9,7 ± 0,59	0,76 ± 0,04	11,1 ± 0,29	0,96 ± 0,03	14,2 ± 0,76	1,05 ± 0,05
C18:3n-3	0,1 ± 0,02	<0,01 ± <0,01	0,3 ± 0,12	0,02 ± 0,01	10,0 ± 1,90	0,62 ± 0,16	15,1 ± 3,26	1,18 ± 0,23	1,7 ± 0,21	0,15 ± 0,02	1,8 ± 0,56	0,13 ± 0,04
C20:5n-3	0,6 ± 0,20	0,04 ± 0,01	1,0 ± 0,08	0,07 ± 0,01	4,3 ± 0,39	0,26 ± 0,03	5,3 ± 1,70	0,42 ± 0,15	10,4 ± 0,22	0,90 ± 0,04	7,5 ± 0,94	0,56 ± 0,10
C22:6n-3	2,1 ± 0,54	0,13 ± 0,04	6,4 ± 0,15	0,49 ± 0,05	2,0 ± 0,74	0,12 ± 0,04	3,5 ± 0,08	0,27 ± 0,01	5,2 ± 0,49	0,45 ± 0,05	5,6 ± 0,28	0,42 ± 0,04
Σ n-3 PUFA	4,0 ± 0,25	0,26 ± 0,02	10,3 ± 0,11	0,79 ± 0,01	25,2 ± 0,66	1,55 ± 0,05	36,6 ± 1,03	2,86 ± 0,08	26,0 ± 0,21	2,26 ± 0,03	21,7 ± 0,40	1,61 ± 0,04
Σ PUFA	16,7 ± 0,28	1,05 ± 0,02	29,1 ± 0,27	2,20 ± 0,02	34,3 ± 0,36	2,11 ± 0,03	48,1 ± 0,63	3,76 ± 0,05	39,5 ± 0,18	3,42 ± 0,02	38,8 ± 0,36	2,86 ± 0,03
Summe		6,27 ± 0,41		7,63 ± 0,90		6,13 ± 0,46		7,81 ± 0,30		8,67 ± 0,27		7,42 ± 0,94
n-3/n-6	0,37		0,64		3,06		3,76		2,36		1,53	

ALA: α -Linolensäure, MUFA: einfach ungesättigte Fettsäure, n-3: Omega-3 Fettsäure, n-6: Omega-6 Fettsäure, n-9: Omega-9 Fettsäure, n.d. nicht detektierbar, PUFA: mehrfach ungesättigte Fettsäure, SFA: gesättigte Fettsäure, Werte sind dargestellt als arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichung (n = 3).

6.2 Sprühbildanalysen unterschiedlicher Sprühdüsen

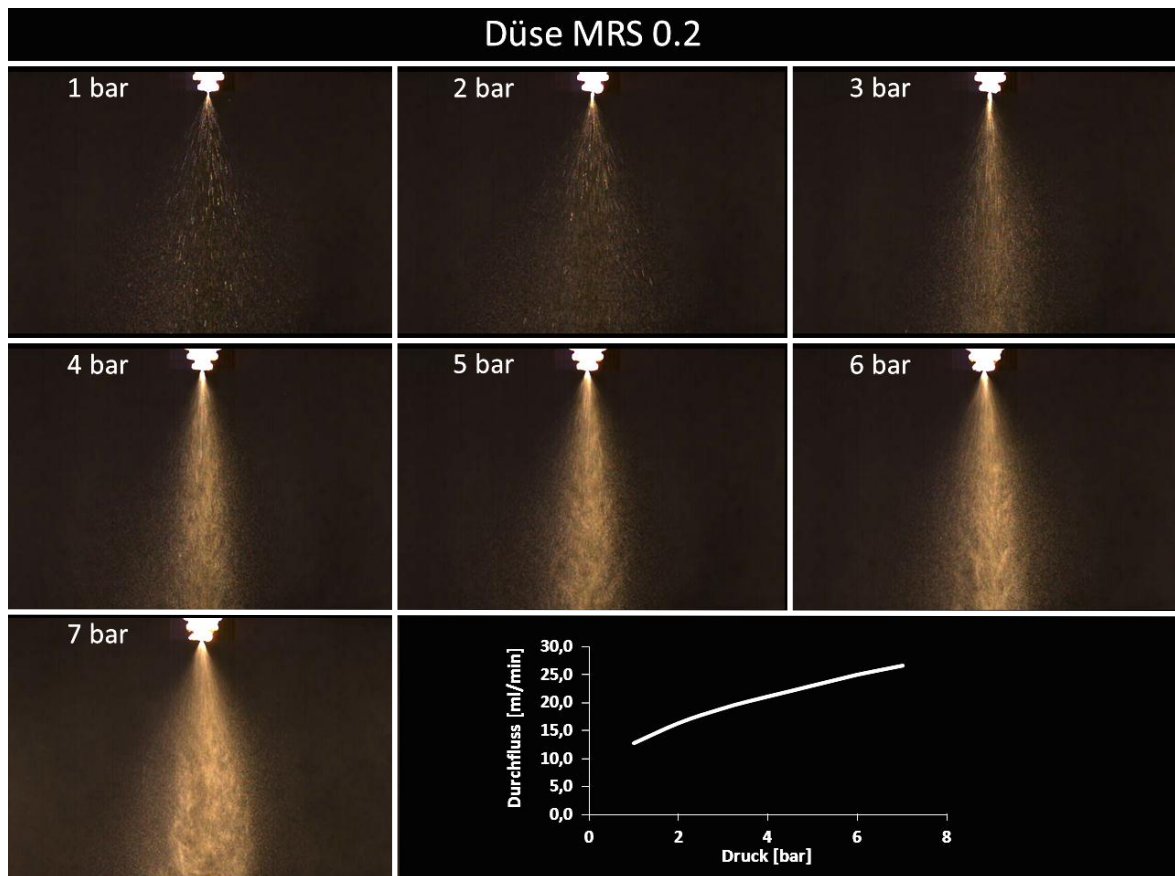


Abb. 48 | Sprühbildanalyse und Durchflussmessung der MRS 0.2 Sprühdüse. Abgebildet sind die Einzelausschnitte der Hochgeschwindigkeitsfilmsequenzen und das Durchflussdiagramm bei einem Arbeitsdruck zwischen 1 bar und 7 bar. Die Videodateien befinden sich auf der beigefügten DVD.

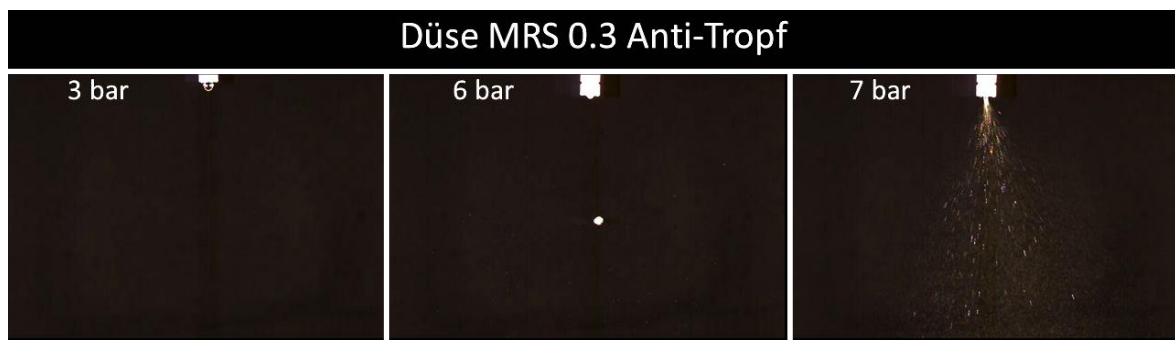


Abb. 49 | Sprühbildanalyse der MRS 0.3 Anti-Tropf-Sprühdüse. Abgebildet sind die Einzelausschnitte der Hochgeschwindigkeitsfilmsequenzen und das Durchflussdiagramm bei einem Arbeitsdruck von 3 bar, 6 bar und 7 bar. Die Videodateien befinden sich auf der beigefügten DVD.

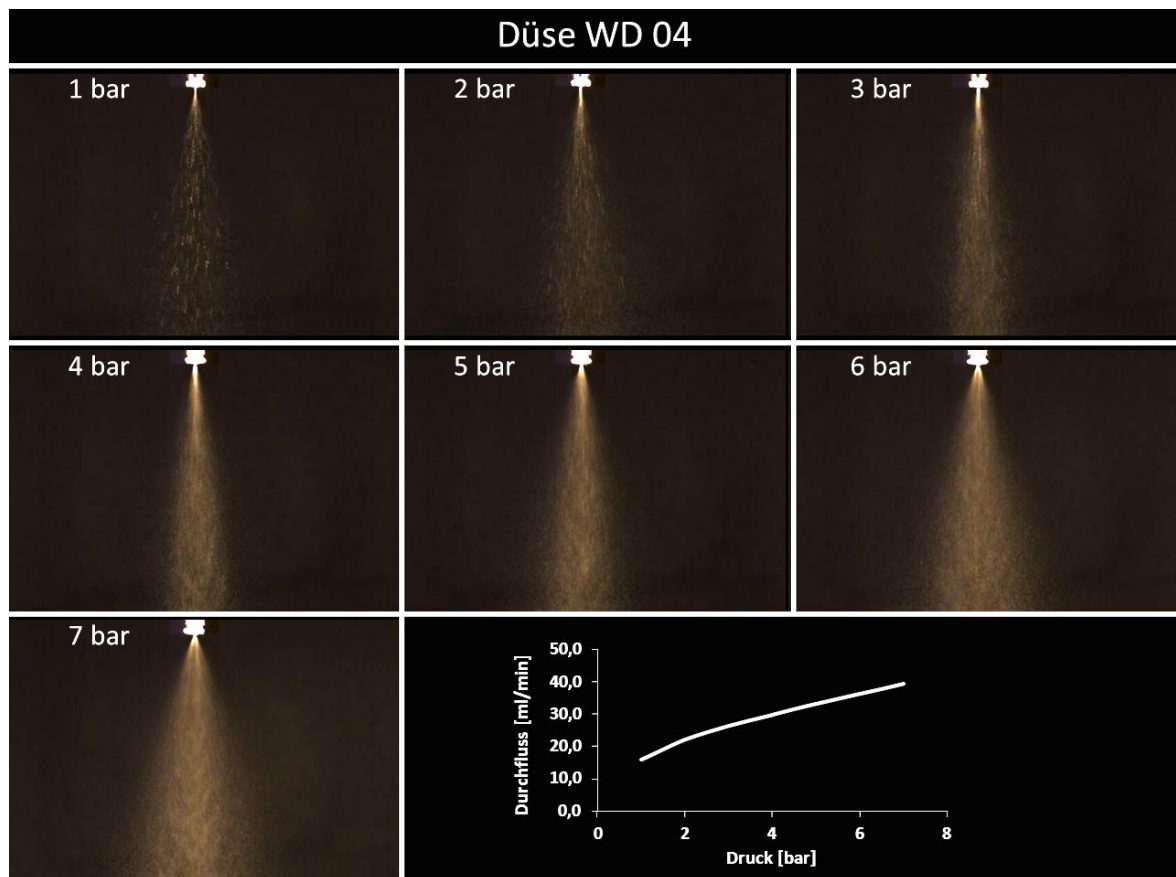


Abb. 50 | Sprühbildanalyse und Durchflussmessung der WD 04 Sprühdüse. Abgebildet sind die Einzelausschnitte der Hochgeschwindigkeitsfilmsequenzen und das Durchflussdiagramm bei einem Arbeitsdruck zwischen 1 bar und 7 bar. Die Videodateien befinden sich auf der beigefügten DVD.

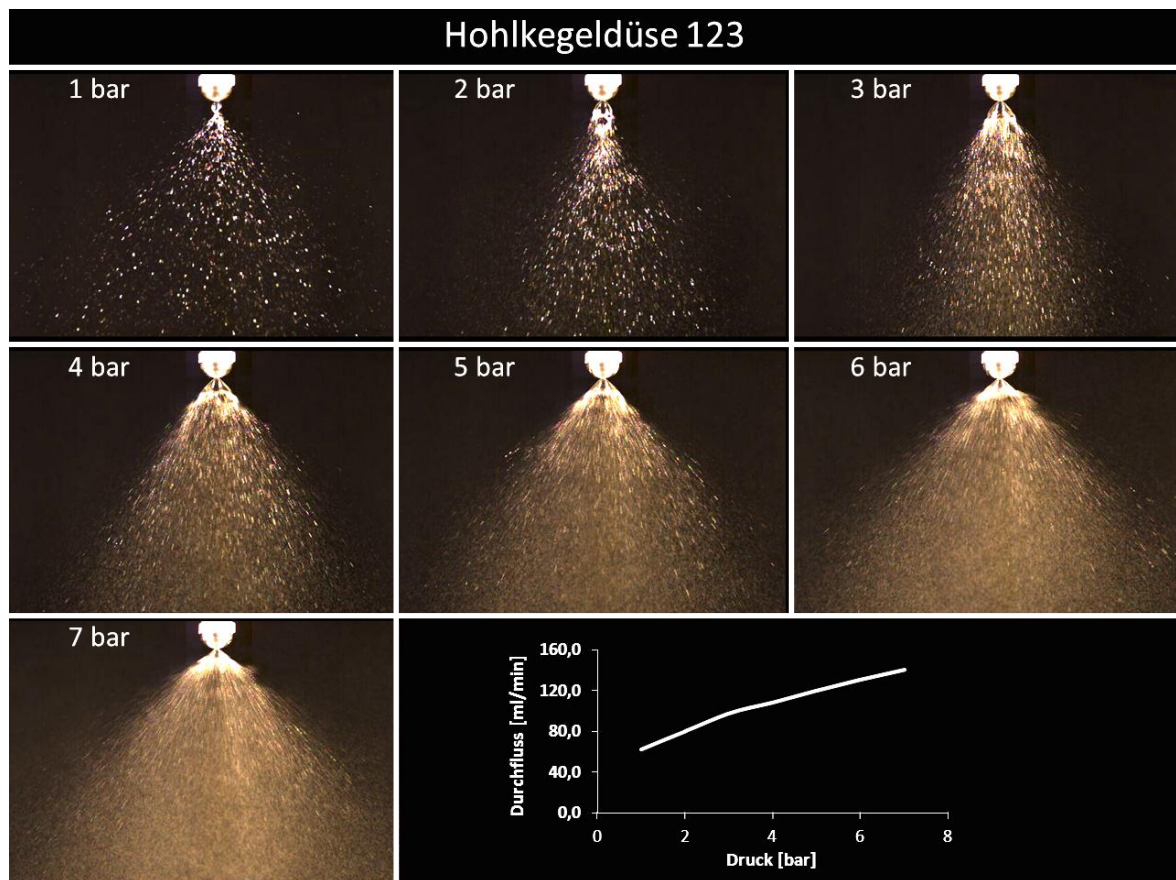


Abb. 51 | Sprühbildanalyse und Durchflussmessung der Hohlkegeldüse 123. Abgebildet sind die Einzelbildausschnitte der Hochgeschwindigkeitsfilmsequenzen und das Durchflussdiagramm bei einem Arbeitsdruck zwischen 1 bar und 7 bar. Die Videodateien befinden sich auf der beigegeführten DVD.

6.3 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AA	<i>arachidonic acid</i> ; Arachidonsäure C20:4n-6
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit- / Hyperaktivitätssyndrom
Ala	Alanin
ALA	<i>α-linolenic acid</i> ; α-Linolensäure C18:3n-3
ANOVA	<i>analysis of variance</i> Varianzanalyse
AOXlar7	Larvenzellen des Atlantischen Störs Nr. 7
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
BHK	<i>baby hamster kidney cells</i>
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
cLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> ; konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> ; chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.

DHA	<i>docosahexaenoic acid</i> ; Docosahexaensäure C22:6n-3
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DPPP	Diphenyl-1-pyrenylphosphin
DPPP-O	Diphenyl-1-pyrenylphosphinoxid
E	essentielle Aminosäure
ECM	<i>extracellular matrix</i> ; extrazelluläre Matrix
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure
ELOVL	<i>elongation of very long chain fatty acids protein</i> ; Fettsäure-Elongase
EPA	<i>eicosapentaenoic acid</i> ; Eicosapentaensäure C20:5n-3
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FAD	<i>fatty acid desaturase</i> ; Fettsäure-Desaturase
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ; Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FIZ	Fisch-Informationszentrum
FKS	fötales Kälberserum
FM	<i>fish meal</i> ; Fischmehl
GABA	<i>4-aminobutanoic acid</i> ; γ-Aminobuttersäure
GEM™	<i>Global Eukaryotic Microcarrier</i>
Glu	Glutaminsäure

Gly	Glycin
GMP	<i>good manufacturing practice;</i> gute Herstellungspraxis
HCl	Salzsäure
HE	Hämalaun = Hämatoxylin
His	Histidin
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography;</i> Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HVA	<i>homeoviscous adaptation</i>
IFFO	<i>International fishmeal and fish oil organization</i> <i>Internationale Fischmehl- und Fischölorganisation</i>
Ile	Isoleucin
KHK	koronare Herzkrankheit
KOH	Kaliumhydroxid
LA	<i>linoleic acid;</i> Linolsäure C18:2n-6
LC-PUFAs	<i>long-chain polyunsaturated fatty acids;</i> langkettige und mehrfach ungesättigte Fettsäuren
Leu	Leucin
LOX	Lipoxigenase
Lys	Lysin
Met	Methionin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
MUFAs	<i>monounsaturated fatty acids;</i> einfach ungesättigte Fettsäuren
n.d.	nicht detektierbar

n-3	Omega-3 Fettsäure
n-6	Omega-6 Fettsäure
n-9	Omega-9 Fettsäure
NE	nicht essentielle Aminosäure
OA	<i>oleic acid</i> ; Ölsäure C18:1n-9
OD	optische Dichte
OMYsd1x	Vollhautexplantzellen der Regenbogenforelle Nr. 1
PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> Phosphat-Puffer
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
Phe	Phenylalanin
POZ	Peroxidzahl
Pro	Prolin
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUFAs	<i>polyunsaturated fatty acids</i> ; mehrfach ungesättigte Fettsäuren
<i>q</i>	Zellzahl eines Quadranten der Neubauer <i>improved</i> -Zählkammer
RI-Fließschema	Regelungs- und Instrumentierungsfließschema
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
SBM	<i>soy bean meal</i> ; Sojabohnenmehl
Ser	Serin

SFA	<i>saturated fatty acids</i> ; gesättigte Fettsäuren
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i> ; einfache Nukleotidpolymorphismen
SPMs	<i>specialized pro-resolving lipid mediators</i> ; spezialisierte resolutionsfördernde Mediatoren
Thr	Threonin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolettes Licht
Val	Valin
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Weltgesundheitsorganisation
Z29	pankreatische Stammzellen der Ratte
β-Ala	β-Alanin

6.4 Verzeichnis der beiliegenden DVD

- .pdf-Datei dieser Arbeit

- Sprühbildanalysen Photron FastCam/

Sprühdüse MRS 0.2/

1 bar.avi
2 bar.avi
3 bar.avi
4 bar.avi
5 bar.avi
6 bar.avi
7 bar.avi

Sprühdüse MRS 0.3 Anti-Tropf Keramik/

3 bar.avi
6 bar.avi
7 bar.avi

Sprühdüse MRS 0.5/

1 bar.avi
2 bar.avi
3 bar.avi
4 bar.avi
5 bar.avi
6 bar.avi
7 bar.avi

Sprühdüse MRS 0.5 im Reaktor/

4 bar.avi
5 bar.avi
6 bar.avi
7 bar.avi

Sprühdüse Rauch WD 04/

1 bar.avi
2 bar.avi
3 bar.avi
4 bar.avi
5 bar.avi
6 bar.avi
7 bar.avi

Sprühdüse Schlick 123/

1 bar.avi
2 bar.avi
3 bar.avi
4 bar.avi
5 bar.avi
6 bar.avi
7 bar.avi

6.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Chemische Strukturen mehrfach ungesättigter Fettsäuren.	2
Abb. 2 Metabolische Stoffwechselwege ungesättigter Fettsäuren in Vertebraten.	3
Abb. 3 Bevölkerungswachstum im Verhältnis zur gefangenen Menge an Fisch.	11
Abb. 4 Marktdaten von Fischmehl und Fischöl.....	14
Abb. 5 Standard-Zellkulturmaterialien in Auf- bzw. Seitenansicht.	18
Abb. 6 Zellkulturgefäße mit großen Oberflächen.....	19
Abb. 7 Bioreaktoren für Suspensionszellkulturen.....	21
Abb. 8 Bett-Bioreaktoren.....	23
Abb. 9 Hohlfaserreaktoren.	24
Abb. 10 3D-Oberflächenmikroskopische Aufnahme des Polyethylen-Netzgewebes.....	37
Abb. 11 3D-Oberflächenmikroskopische Aufnahme der Sponceram® Discs mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften.	46
Abb. 12 Regelungs- und Instrumentierungs-Fließschema des Multifors® 2 Bioreaktors. ...	49
Abb. 13 Übersichtsaufnahmen über die Prototypen der Netzhalterungen.	50
Abb. 14 Übersichtsaufnahmen der Sprühdüsenapparatur im Multifors® 2.....	52
Abb. 15 Aminosäurezusammensetzung von OMYsd1x Zellen.....	60
Abb. 16 Aminosäurezusammensetzung von AOXlar7 Zellen.....	61
Abb. 17 Übersicht über die Fettsäurezusammensetzung [g / 100 g] von OMYsd1x Zellen der Passagen 27 bis 31 bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.	63
Abb. 18 Übersicht über die Fettsäurezusammensetzung [g / 100 g] von AOXlar7 Zellen der Passagen 27 bis 29 bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.	65
Abb. 19 OilRedO-/HE-Färbung von OMYsd1x Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.....	67

Abb. 20 OilRedO-/HE-Färbung von AOXlar7 Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.....	68
Abb. 21 Relative Lipidperoxidation von OMYsd1x Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.....	69
Abb. 22 Relative Lipidperoxidation von AOXlar7 Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.....	70
Abb. 23 Wachstumsverhalten von OMYsd1x Zellen in Abhängigkeit von der Passagenzahl.	71
Abb. 24 Übersichtsaufnahmen von OMYsd1x Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 am 12. Tag nach der Einsaat.	72
Abb. 25 Relative Anzahl mitotischer OMYsd1x Zellen in den Passagen 20, 40 und 60.	73
Abb. 26 Wachstumsverhalten von AOXlar7 Zellen in Abhängigkeit von der Passagenzahl.	74
Abb. 27 Übersichtsaufnahmen von AOXlar7 Zellen in den Passagen 20, 40 und 60 am 8. Tag nach der Einsaat.	75
Abb. 28 Relative Anzahl mitotischer AOXlar7 Zellen in den Passagen 20, 40 und 60.	76
Abb. 29 Suspensionszellkultur von AOXlar7 im BioLevigator™.....	78
Abb. 30 AOXlar7 Zellen auf GEM™.....	79
Abb. 31 Wachstum von AOXlar7 Zellen auf unterschiedlichen Sponceram® Oberflächen.	81
Abb. 32 Glasperlen besiedelt mit Z29 Zellen.	82
Abb. 33 Besiedelte Glasperlen auf Netzgeweben.	83
Abb. 34 Bestimmung des optimalen Abnahmezeitpunktes der Glasperlen.	85
Abb. 35 Wiederholte Inokulation von Netzgeweben.	86
Abb. 36 Inokulation von Glasperlen mittels besiedelter Netzgewebe.	87
Abb. 37 Glasperlen inokuliert durch ein besiedeltes Netzgewebe.....	88
Abb. 38 Inokulation von Netzgeweben mittels besiedelter Netzgewebe.	89
Abb. 39 Inokulation eines Netzgewebes durch ein besiedeltes Netzgewebe.	90
Abb. 40 Zellwachstum von Z29 Zellen auf Netzgeweben.	91

Abb. 41 Qualitative Sprühbildanalyse der MRS 0.5 Sprühdüse.	93
Abb. 42 Qualitative Sprühbildanalyse der MRS 0.5 Sprühdüse im Reaktorinnenraum.	94
Abb. 43 Kultivierung von Z29 Zellen im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor.	95
Abb. 44 Wachstumsvergleich von AOXlar7 Zellen in Passage 51 auf gelatinebeschichteten bzw. nicht mit Gelatine beschichteten Polyethylen- bzw. Polyamid-Netzgeweben.	97
Abb. 45 Kultivierung von AOXlar7 Zellen in Passage 58 im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor.	98
Abb. 46 AOXlar7 Zellen in Passage 58 kultiviert auf Polyamid-Netzgeweben im modifizierten Multifors® 2 Bioreaktor.	99
Abb. 47 Bestimmung der Anzahl mitotischer Zellen anhand des DNA-Gehalts.	118
Abb. 48 Sprühbildanalyse und Durchflussmessung der MRS 0.2 Sprühdüse.	158
Abb. 49 Sprühbildanalyse der MRS 0.3 Anti-Tropf-Sprühdüse.	158
Abb. 50 Sprühbildanalyse und Durchflussmessung der WD 04 Sprühdüse.	159
Abb. 51 Sprühbildanalyse und Durchflussmessung der Hohlkegeldüse 123.	160

6.6 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Standardvolumina [ml] der eingesetzten Medien und Lösungen in Abhängigkeit vom Kultivierungsgefäß bzw. der Kultivierungsoberfläche [cm ²].	34
Tab. 2 Kultivierungsparameter von AOXlar7 Zellen im BioLevigator™ auf gelatinebeschichteten GEM™.	45
Tab. 3 Kultivierungsparameter von Z29 und AOXlar7 Zellen im Multi-fors® 2 Bioreaktor auf Netzgeweben.	55
Tab. 4 Durchflussmenge [ml / min] und Sprühwinkel [°] unterschiedlicher Sprühdüsen bei einem Arbeitsdruck zwischen 1 bar und 7 bar.	92
Tab. 5 Vergleich der absoluten Konzentrationen [g/100g] essentieller Aminosäuren in gefriergetrockneten AOXlar7 bzw. OMYsd1x Zellen, Fischmehl und Sojabohnenmehl.	103
Tab. 6 Vergleich mehrfach ungesättigter Fettsäuren [%] der Regenbogenforellenhaut <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .	106
Tab. 7 Ernährungsphysiologischer Vergleich zwischen Fischmehl und dem AOXlar7- bzw. OMYsd1x-Lyophilisat.	113
Tab. 8 Wachstumsparameter von AOXlar7 und OMYsd1x Zellen am 3. bzw. 4. Tag nach der Einsaat der Zellen.	116
Tab. 9 Aminosäurezusammensetzung der OMYsd1x Zellen in Passage 28 und 31 als Anteil vom Gesamtprotein [%] und als Massenanteil [g/100g Lyophilisat].	153
Tab. 10 Aminosäurezusammensetzung der AOXlar7 Zellen in Passage 36 als Anteil vom Gesamtprotein [%] und als Massenanteil [g/100g Lyophilisat].	154
Tab. 11 Fettsäurezusammensetzung von dem Zellkulturzusatz FKS als Anteil vom Gesamtfett [%] und als Massenanteil [g/100g Serum].	155
Tab. 12 Fettsäurezusammensetzung der OMYsd1x Zellen zwischen Passage 27 und Passage 31 als Anteil vom Gesamtfett [%] und als Massenanteil [g/100g Lyophilisat] bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.	156
Tab. 13 Fettsäurezusammensetzung der AOXlar7 Zellen der Passagen 27 bis 29 als Anteil vom Gesamtfett [%] und als Massenanteil [g/100g Lyophilisat] bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.	157

6.7 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 07. Dezember 2013

6.8 Danksagung

Formal betrachtet stellt diese Dissertation das Ende meiner naturwissenschaftlichen Ausbildung dar. Demgemäß geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Charli Kruse, der es mir ermöglichte, diesen Ausbildungsabschnitt in der Fraunhofer EMB zu absolvieren. Ich danke ihm für seine konstruktiven Anregungen und Diskussionsbeiträge sowie für die fachliche Unterstützung dieses Forschungsvorhabens. Das von ihm nachhaltig geprägte Arbeitsklima der Fraunhofer EMB eröffnete mir eine Atmosphäre, in der ich mich sowohl wissenschaftlich, als auch persönlich entwickeln konnte.

Insofern ist diese Dissertation zudem Gegenstand meiner persönlichen und intellektuellen Entwicklung, welche in erster Linie durch Frau Dr. Marina Gebert beeinflusst wurde. Ihr danke ich für die Einführung in die spannende, aber auch komplexe Welt der Zellbiologie, die Betreuung meiner Forschung und für den regen Wissenstransfer. Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Sebastian Rakers, der zu jeder Zeit, aber besonders in der Endphase des Dissertationsvorhabens für ein mentales Gleichgewicht sorgte.

Zudem möchte ich mich bei Daniel Hoffmann (M.Sc.), Anton Schulze-Jena (B.Sc.) und Juliane Gottwald (B.Sc.) bedanken. Sie absolvierten bei mir ihre studienbedingten Praxissemester und die daran anschließenden wissenschaftlichen Abschlussarbeiten. Dieses sehr persönliche Verhältnis und den dabei gepflegten interdisziplinären Austausch empfand ich als überaus befruchtend.

Der Zentraleinrichtung Gerätebau, insbesondere Herrn Dipl. Ing. Dennis Wendt und Herrn Uwe Sick möchte ich für die Materialunterstützung und die technische Umsetzung meiner theoretischen Konstruktionsideen, besonders im Zusammenhang mit der Reaktorentwicklung danken. Allen Mitarbeiter der Fraunhofer EMB danke ich für das Arbeitsklima, welches ich als sehr angenehm empfunden habe.

Mein persönlicher Dank geht an Frau StR Lea Maude Sieker, für ihr unermüdliches Verständnis, ihre ganz besondere Unterstützung, die umfangreichen Korrekturleistungen und konzeptionellen Anregungen, meinen Familienangehörigen und Freunden danke ich für ihre Anteilnahme.

Abschließend möchte ich Herrn Stephan Karcher danken, ohne den dieser Ausbildungsabschnitt womöglich gar nicht zustande gekommen wäre.