



***Segregierte mathematische Modelle
zum Wachstum adhärenter tierischer Zellen (MDCK) und
zur Influenza Virus Replikation***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktoringenieur
(Dr.-Ing.)

von Dipl.-Ing. Lars Möhler
geb. am 10.03.1968 in Braunschweig

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl
Prof. Dr. rer. nat. Dr. rer. nat. habil. Dietrich Flockerzi

Promotionskolloquium am 03.07.2006

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 15

Lars Möhler

**Segregierte mathematische Modelle
zum Wachstum adhärenter tierischer Zellen (MDCK)
und zur Influenza Virus Replikation**

Shaker Verlag
Aachen 2006

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2006

Copyright Shaker Verlag 2006

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN-10: 3-8322-5458-7

ISBN-13: 978-3-8322-5458-2

ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Inhaber des Lehrstuhls Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl für die Überlassung des Themas und für die gewährten Freiräume bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. rer. nat. habil. Dietrich Flockerzi danke ich für die Übernahme des Coreferats und vertiefende Diskussionen zum mathematischen Hintergrund der Modellierungsarbeit.

Daneben gilt mein Dank dem Vorsitzenden des Prüfungsausschusses Herrn Jun. Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Tallarek.

Frau Dr. rer. nat. Yvonne Genzel danke ich für ihre freundliche und hilfsbereite, aber dennoch kritische Haltung in der Diskussion biologischer Belange.

Meiner mir wichtigsten Kollegin Frau Dipl.-Ing. Dipl.-Biol. Julia Schmidt danke ich für ihre Unterstützung bei diversen Kriseninterventionen sowie für zahlreiche angeregte Diskussionen oder entspannte Zeiten bei Kaffee und Muffins, zusammen mit meinem Kollegen Herrn Dipl.-Ing. Andreas Bock, der mit vielen fachlichen Anregungen ebenfalls einen wesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dipl.-Ing. Ilona Behrendt, Frau Susanne König und Frau Claudia Best für die hervorragende Durchführung der Experimente und die manchmal notwendigen Erläuterungen für einen doch eher theoretisch begabten Wissenschaftler.

Großer Dank gebührt ebenfalls meinen Kollegen am Lehrstuhl und der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik des Max-Planck-Instituts für die Mithilfe sowie die fachlichen Anregungen und zahlreichen Ermunterungen. Ohne Eure Daten, Diskussionen, die fruchtbaren Anregungen und kritischen Anmerkungen würde diese Arbeit nicht entstanden sein!

Herrn Prof. Dr.-Ing. Achim Kienle und Herrn Dipl.-Ing. Martin Haefele danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung der Simulationen in DIVA, sowie Herrn Dr. Heiner Sann für die Auswertung der Experimente mittels Laser Scanning Mikroskopie.

Ganz besonders danke ich meinem Mann Herrn Dr. rer. nat. Axel Möhler für seine liebevolle Unterstützung, Motivation und seine Geduld gerade in schwierigen Zeiten.

Abstract

The topic of this thesis was the development of a mathematical model to describe the basic mechanisms of the growth of adherent mammalian cells and the virus dynamics of Influenza A virus in MDCK cells. The segregated cell growth model comprises cells in suspension, cells on microcarriers which are able to proliferate and dead cells. In addition it considers the main substrates, glucose and glutamine, and the inhibitors, lactate and ammonia. The virus replication model takes into account the intracellular delay between the time of infection and the first visibly infected cells. To describe the time course of the upcoming HA titer, the cells are segregated into uninfected and infected cells.

The identification of the parameters for modelling was based on standard cultivations or specific investigations if needed. Parameters which could not be determined experimentally have been taken from literature. Based on these estimations parameters have been optimized to fit the experimental data. An investigation of the sensitivity of the parameters led to the specific maximal growth rate μ_{max} , the maximal possible cell number on microcarriers X_{max} , the attachment rate k_{at} , describing the attachment of the seeded cells to the microcarriers, and the specific death rate k_d as parameters with most influence on maximum cell yield. Concerning the virus replication model the following parameters showed most influence on virus yield: the specific virus replication rate μ_{vir} , the specific death rate of infected cells k_{cdv} , and the concentration of uninfected cells at the time of infection $U_{C,0}$.

1	Einleitung.....	1
1.1	Biotechnologische Prozesse	1
1.2	Motivation.....	2
1.3	Aufgabenstellung und Gliederung.....	3
1.4	Historische Entwicklung der Zellkultur.....	6
1.5	Grundlagen des Influenza Virus	11
1.6	Grundlagen der Influenza Impfstoffproduktion	14
2	Modellierung von Bioprozessen	19
2.1	Grundlagen der mathematischen Modellbildung	19
2.2	Vom Reaktor zum Modell: Bilanzgleichungen beschreiben das System... ..	22
3	Stand der Forschung	27
3.1	Grundlagen zur Modellierung des Metabolismus	27
3.2	Modelle zur Beschreibung der Virusdynamik	36
4	Material und Methoden	41
4.1	Zellkultur und Virusreplikation	41
4.2	Verfahren zur Messwerterfassung und statistische Sicherheit.....	41
4.2.1	Bestimmung der Zellzahl.....	42
4.2.2	Bestimmung der Metabolite.....	43
4.2.3	Bestimmung der Viruspartikel	43
4.2.4	Bestimmung der infizierten Zellen auf Carriern	45
4.3	Software	46
5	Wachstum und Stoffwechsel von MDCK Zellen auf Microcarriern.....	47
5.1	Ergebnisse	47
5.1.1	Mathematisches Modell.....	47
5.1.1.1	Shift-Modell (a)	51
5.1.1.2	Logistisches Modell (b).....	52

5.1.1.3	Attachment-Modell (c)	53
5.1.1.4	Parameterbestimmung für alle Modellvarianten	55
5.1.2	Simulationsergebnisse	61
5.1.2.1	Shift Modell (a)	61
5.1.2.2	Logistisches Modell (b).....	63
5.1.2.3	Attachment Modell (c).....	65
5.1.2.4	Parametersensitivitäten	74
5.1.2.5	Untersuchung der Abweichung des Systems in den Parametern.....	76
5.2	Diskussion.....	79
5.2.1	Mathematische Modellbildung des Wachstums und Stoffwechsels von adhärennten MDCK Zellen	79
5.2.2	Qualität der Parameter und der experimentellen Daten	86
6	Replikation von Influenza A Virus in tierischen Zellen	93
6.1	Ergebnisse	93
6.1.1	Mathematisches Modell.....	93
6.1.1.1	Modellgleichungen.....	96
6.1.1.2	Parameterschätzung	98
6.1.2	Simulationsergebnisse	99
6.1.3	Parametersensitivitäten.....	103
6.1.4	Abhängigkeit der Virusaussbeute von Startzellzahl, MOI und Delay	108
6.2	Diskussion.....	112
7	Zusammenfassung.....	117
8	Ausblick	119
	Literaturverzeichnis	121
	Anhang	129

Verzeichnis der Abkürzungen

Amn	Ammonium
Asp	Aspartat
α -KG	α -Ketoglutarat
BEI	Binäres Ethylenimin
BHK	Baby Hamster Kidney
°C	Grad Celsius
CHO	Chinese Hamster Ovary
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EIV	Pferde Influenza Virus (equine influenza virus)
FCS	Fötales Kälber Serum
FS-4	Human Foreskin
FQS	Fehlerquadratsumme
GDH	Glutamin-Dehydrogenase-Weg
Gln	Glutamin
Glc	Glucose
GMEM	Glasgow Minimal Essential Medium
GMP	Good Manufacturing Practice
h	Stunde (hour)
HA	Haemagglutinin
HIV	Human immunodeficiency virus
i	Zulauf, Zuluft
L	Liter
Lac	Lactat
LSM	Laser Scanning Mikroskop
m	Meter
MC	Microcarrier
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MRC-5	Normal Human Fetal Lung Fibroblast
mL	Milliliter
mM	mmol·L ⁻¹
MOI	Multiplicity of infection

mRNA	Messenger RNA
NA	Neuraminidase
o	Ablauf, Abluft
O ₂	Sauerstoff
ODE	Ordinary differential equation
OTR	Sauerstoffeintragsrate (Oxygen transfer rate)
OUR	Sauerstoffaufnahme rate (Oxygen uptake rate)
PBS	Phosphate Buffered Saline
pfu	Plaque forming units
RF	Rollerflasche
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)
TA	Transaminaseweg
TCA	Zitronensäurezyklus
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose 50 %
T-Flasche	Zellkulturflasche (Tissue-Flask)
TOI	Time of Infection
V	Volumen
VERO	African Green Monkey Kidney
WHO	World Health Organisation
X	Zellzahl
YSI	Yellow Spring Instruments

Verzeichnis der Symbole

a	Sterberate infizierter Zellen des immunologischen Modells	$[h^{-1}]$
Amn	Ammoniumkonzentration	$[mmol/L]$
c_1	glucosespezifischer Sterbekoeffizient	$[mmol/L]$
c_2	glutaminspezifischer Sterbekoeffizient	$[mmol/L]$
c_{RBC}	Konzentration der roten Blutkörperchen	$[mL^{-1}]$
d	Sterberate uninfizierter Zellen des immunologischen Modells	$[h^{-1}]$
F	Volumenstrom von Zufütterung und Ernte	$[L/h]$
F	bestimmte Verdünnungsstufe des Virus im HA Test	$[\log \text{ HA}/100 \mu\text{L}]$
Glc	Glucosekonzentration	$[mmol/L]$
Gln	Glutaminkonzentration	$[mmol/L]$
I_C	Anzahl infizierter Zellen	$[1/mL]$
k	Produktionsrate freier Viruspartikel des immunologischen Modells	$[h^{-1}]$
k_{at}	Attachmentrate der Zellen	$[h^{-1}]$
k_{cdf}	Zellsterberate aufgrund Fermentationsbedingungen	$[h^{-1}]$
k_{cdv}	Zellsterberate aufgrund Virusinfektion	$[h^{-1}]$
k_d	spez. Sterberate	$[h^{-1}]$
k_{dQ}	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für den Zerfall von Glutamin	$[h^{-1}]$
k_{det}	Detachmentrate der Zellen	$[h^{-1}]$
k_{lys}	Lyserate der Zellen	$[h^{-1}]$
k_{dead}	Sterberate der Zellen	$[h^{-1}]$
$k_{i,Amn}$	ammoniumspezifischer Sterbekoeffizient	$[L/mmol]$
$k_{i,Lac}$	lactatspezifischer Sterbekoeffizient	$[L/mmol]$
k_{va}	Attachmentrate der Viruspartikel	$[h^{-1}]$
k_{vd}	Sterberate der Viruspartikel	$[h^{-1}]$
k_{vi}	Infektionsrate	$[h^{-1}]$
K_{Amn}	Inhibierungskonstante für Ammonium	$[mmol/L]$
K_{Glc}	Monod-Konstante für Glucose	$[mmol/L]$
K_{Gln}	Monod-Konstante für Glutamin	$[mmol/L]$
K_{Lac}	Inhibierungskonstante für Lactat	$[mmol/L]$
Lac	Lactatkonzentration	$[mmol/L]$

Verzeichnis der Symbole

m_{Glc}	glucosespezifischer Zellerhaltungskoeffizient	[mmol/h]
m_{Gln}	glutaminspezifischer Zellerhaltungskoeffizient	[mmol/h]
n_{Virus}	Anzahl der Viruspartikel	[mL ⁻¹]
n	Anzahl experimenteller Daten	[-]
p	Anzahl adaptierbarer Parameter	[-]
ρ	Vektor der zeitkonstanten Parameter	[...]
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck in Lösungen	[%Luftsättigung]
r_{gen}	Bildungsrate	[L ⁻¹ ·h ⁻¹]
r_{cons}	Verbrauchsrate	[L ⁻¹ ·h ⁻¹]
R_0	Wurfgröße (Basic Reproductive Ratio)	[-]
S	Substratkonzentration	[mmol/L]
s_r	Reststandardabweichung der Simulation bezüglich experimentellen Daten, normiert	[-]
t	Zeit	[h]
T	Temperatur	[°C]
u	Sterberate freier Viruspartikel des immunologischen Modells	[h ⁻¹]
u	Vektor der zeitveränderlichen Eingangsgrößen	[...]
U_C	Anzahl uninfizierter Zellen	[1/mL]
V	Reaktionsvolumen	[L]
V	Anzahl Viruspartikel	[1/mL]
w	lokale Sensitivität	[-]
w	Gewichtungsmatrix	[...]
x, X	Vektor der differentiellen Zustandsgrößen	[...]
X_d	Anzahl toter Zellen	[1/mL]
X_{max}	Maximale Zellzahl auf einem Microcarrier	[1/mL]
X_{MC}	Anzahl lebender Zellen auf Microcarriern	[1/mL]
X_{Sus}	Anzahl lebender Zellen in Suspension	[1/mL]
X_V	Anzahl lebender Zellen	[1/mL]
y	Vektor der algebraischen Zustandsgrößen	[...]
$Y_{X,\text{Glc}}$	glucosespezifischer Ausbeutekoeffizient	[1/mmol]
$Y_{X,\text{Gln}}$	glutaminspezifischer Ausbeutekoeffizient	[1/mmol]
Z	Anzahl von Erythrozyten	[mL ⁻¹]

Verzeichnis griechischer Formelzeichen

α_{Amn}	zellwachstumsabhängiger Bildungskoeffizient für Ammonium	[mmol]
α_{Lac}	zellwachstumsabhängiger Bildungskoeffizient für Lactat	[mmol]
β	Infektionsrate des immunologischen Modells	[h ⁻¹]
δ	partielle Ableitung	[-]
Δ	Differenz	[...]
λ	Produktionsrate uninfizierter Zellen Zellen des immunologischen Modells	[h ⁻¹]
μ	spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ_{vir}	Virusreplikationsrate	[h ⁻¹]
$\sigma(S)$	substratabhängige Sättigungsfunktion	[-]
τ	Shift, Zeitverzögerung	[h]