

Optimierung der Proteinexpression in Insektenzellen und Scale-up in den Wave-Bioreaktor

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieurin
genehmigte Dissertation

von
Mareike Katharina Rausch
aus Berlin

2011

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.: Hamburg-Harburg, Techn. Univ., Diss., 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Pörtner
2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Müller
3. Gutachter: Dr. Jörg Knäblein

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2011

Copyright Shaker Verlag 2011

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

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0370-3

ISSN 1434-4556

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

Optimierung der Proteinexpression in Insektenzellen und Scale-up in den Wave-Bioreaktor

Mareike Katharina Rausch

Heterologe Proteine sind in der pharmazeutischen Forschung von großer Bedeutung, sie werden z. B. für Kristallisation und High-Throughput-Screening benötigt. Ihre Expression in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems bietet viele Vorteile, so werden posttranslational modifizierte Proteine hergestellt und innerhalb kurzer Zeit können viele verschiedene Proteinkonstrukte entwickelt werden. Auch können hohe Ausbeuten erzielt werden, sodass oft eine Produktion im 10 L Maßstab die benötigte Menge an Protein liefert. Ziel der Arbeit war es, die Proteinausbeute für die beiden Insektenzelllinien High Five und Sf9 zu optimieren und die Produktion auf den Wave-Bioreaktor, einen neuartigen Einweg-Bioreaktor, zu übertragen. Es fand zuerst eine Optimierung des Produktionsprozesses in Schüttelkolben und dann ein Scale-up auf den Bioreaktor statt.

Die Untersuchung der Betriebsbedingungen in Schüttelkolben ergab, dass Füllvolumen und Kolbengröße einen großen Einfluss auf Wachstum und Proteinexpression haben. Sf9-Zellen reagierten empfindlich auf ein zu niedriges Füllvolumen und zeigten bei höheren Füllvolumina ein besseres Wachstum und eine höhere Expression. High Five-Zellen wuchsen dagegen bei kleinen Füllvolumina besser; hohe Füllvolumina bei der Proteinexpression führten zu viel geringeren Ausbeuten und zur Bildung von Laktat. Ein anschließender Vergleich von Wachstum und Infektion in Wave-Bioreaktor und Schüttelkolben ergab, dass eine gute Übertragbarkeit gegeben ist.

Bei Sf9-Zellen ließ sich die maximale Zelldichte durch die Zugabe von Glucose verdoppeln. Es zeigte sich, dass es unerheblich ist, ob die Glucose am Anfang vorgelegt oder in mehreren Fed-Schritten zugegeben wird. Außerdem wurden die Bildung von Ammonium und der Anstieg des pH-Werts verringert. Der Anstieg der maximalen Zelldichte durch die Fütterung mit Glucose ließ sich erfolgreich auf den Wave-Bioreaktor übertragen. Bei der Expression in Sf9-Zellen sinkt die spezifische Proteinausbeute pro Zelle bei einer steigenden Infektionszelldichte sehr stark. Durch eine Glucosefütterung wurde die spezifische Ausbeute besonders bei höheren Zelldichten deutlich gesteigert und eine höhere Gesamtausbeute erzielt. Durch die Übertragung der Zufütterung von Glucose und Yeastolate Ultrafiltrate auf den Wave-Bioreaktor ließ sich die EGFP-Ausbeute in Sf9-Zellen um 45 % erhöhen. Der zeitliche Verlauf der Proteinausbeute konnte durch die Weibull-Verteilung sehr gut beschrieben werden, so konnte zudem auch der ideale Erntezeitpunkt bestimmt werden.

Bei High Five-Zellen bewirkte eine Zugabe von Glucose keine Steigerung der maximalen Zelldichte. Auch die Zufütterung der Aminosäuren, die im Laufe des Wachstums komplett verbraucht werden, erhöhte die maximale Zelldichte nicht. Eine Hemmung des Wachstums durch sich akkumulierende Stoffwechselprodukte war ebenfalls nicht zu beobachten. Ein Austausch des Mediums gegen Ende der Wachstumsphase brachte jedoch eine Erhöhung der Zelldichte auf $10,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Auch bei High Five-Zellen führten höhere Infektionszelldichten zu geringeren spezifischen Proteinausbeuten. Die maximale volumetrische Ausbeute wurde bei einer Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht. Die Ausbeute konnte durch die Zugabe von Glucose und Aminosäuren nicht gesteigert werden. Eine Zufütterung von Yeastolate brachte nur eine minimale Steigerung der Ausbeute. Stoffwechselprodukte wirkten sich zwar negativ auf die Ausbeute aus, die geringe spezifische Ausbeute bei hohen Zelldichten ist jedoch nicht allein durch ihre Akkumulation zu erklären. Durch einen Wechsel des Mediums vor der Infektion konnte die spezifische Ausbeute bei höheren Zelldichten deutlich gesteigert werden, die absolute Proteinausbeute wurde so nahezu verdoppelt. Mit einem speziellen Perfusionsbag war es möglich, ohne externen Filter einen einmaligen partiellen Medienwechsel im Wave-Bioreaktor durchzuführen. Die Ausbeutesteigerung durch den Wechsel des Mediums konnte somit von den Schüttelkolben auf diesen Reaktor übertragen werden. Für High Five-Zellen konnte die Ausbeute im Wave-Bioreaktor so um 107 % erhöht werden.