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

Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen eines Forschungsprojekts in der Abteilung Mikrobiologische Chemie der Bayer Schering Pharma AG und wurde als externe Arbeit im Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik der Technischen Universität Hamburg-Harburg betreut.

Herrn Dr. Knäblein danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung Mikrobiologische Chemie zu schreiben, die vielen fachlichen Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Bei Herrn Prof. Pörtner möchte ich mich für sein Interesse an meiner Arbeit, das Engagement, mit dem er mich als externe Doktorandin betreut hat, und die vielen wertvollen Anregungen bedanken.

Herrn Prof. Müller danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Heinrich möchte ich für die Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses danken. Herrn Prof. Schlüter danke ich dafür, dass er bei meiner mündlichen Prüfung stellvertretend die Leitung des Prüfungsausschusses kurzfristig übernommen hat.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologische Chemie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und ihre Unterstützung bedanken, besonders hervorheben möchte ich Frau Helfrich und Frau Hergert.

Der Bayer Schering Pharma AG danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Firma durchzuführen, sowie für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann und meinen Eltern für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre unermüdliche Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der Arbeit.....	2
2	Grundlagen	3
2.1	Baculovirus	3
2.1.1	Aufbau der Baculoviren	3
2.1.2	Verbreitung von Baculoviren in der Natur.....	4
2.1.3	Das Baculovirus-Expressionssystem	4
2.2	Insektenzellkultur	5
2.3	Proteinproduktion in Insektenzellen	7
2.3.1	Wachstumsphase.....	7
2.3.2	Infektionsphase	8
2.3.3	MOI	9
2.3.4	TOI	11
2.3.5	Erntezeitpunkt.....	11
2.3.6	Strategien zur Optimierung der Proteinausbeute.....	11
2.4	Sauerstoffverbrauch von Insektenzellen und Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration	13
2.5	Bioreaktoren für Insektenzellen.....	14
2.6	Schüttelkolben.....	15
2.7	Wave-Bioreaktor	16
2.8	Prozessführung.....	18
2.8.1	Perfusions-Prozessführung bei Insektenzellen.....	19
2.8.2	Perfusions-Prozessführung im Wave-Bioreaktor	19
2.8.3	Medienwechsel bei Insektenzellen	20
2.9	Modellprotein EGFP	20
2.10	Versuchsplanung	21

2.10.1	Vollständige faktorielle Versuchspläne	22
2.10.2	Fraktionelle faktorielle Versuchspläne	23
2.10.3	Plackett-Burman Designs	23
3	Materialien und Methoden	25
3.1	Zelllinien und Virus.....	25
3.2	Medien	25
3.3	Stammhaltung	26
3.4	Herstellung des Virusstocks und Ermittlung des Virustiters	26
3.5	Schüttelkolben und Schüttler	27
3.6	Wave-Bioreaktor	27
3.7	Messung von Zelldichte und Vitalität	28
3.8	Analyse von Medienbestandteilen	28
3.9	Quantifizierung des Proteins.....	29
3.10	Durchführung und Auswertung der Versuche.....	30
3.10.1	MOI und TOI.....	32
3.10.2	Statistik	32
4	Durchführung, Ergebnisse und Diskussion	33
4.1	Sauerstoffversorgung im Schüttelkolben	33
4.1.1	Einfluss von Kolbengröße und Füllvolumen	35
4.1.2	Sauerstofftransfer im Schüttelkolben.....	36
4.1.3	Scherkräfte im Schüttelkolben.....	41
4.1.4	Experimente zum Wachstum im Schüttelkolben	42
4.1.5	Experimente zur Expression im Schüttelkolben	44
4.2	Scale-up in den Wave-Bioreaktor	47
4.2.1	Sauerstoffversorgung	47
4.2.2	Experimente zur EGFP-Ausbeute bei unterschiedlichen Betriebsbedingungen	52

4.2.3	Vergleich mit Schüttelkolben	53
4.3	Sf9-Zellen.....	59
4.3.1	Wachstum	60
4.3.2	Expression.....	69
4.3.3	Fed-Batch Sf9-Zellen im Wave-Bioreaktor	81
4.3.4	Weibull-Verteilung	86
4.4	High Five-Zellen	90
4.4.1	Wachstum	90
4.4.2	Expression.....	96
4.4.3	Medienwechsel bei High Five-Zellen.....	105
4.4.4	Medienwechsel bei High Five-Zellen im Wave-Bioreaktor.....	109
5	Zusammenfassung	113
6	Ausblick	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Wave Bioreaktor	17
Abb. 2.2: Schema einer Perfusions-Prozessführung	18
Abb. 3.1: Vorgehen beim Ansetzen von Versuchen	30
Abb. 3.2: Zweistufiger Prozess bei der Proteinproduktion	31
Abb. 4.1: Verhältnis Oberfläche zu Füllvolumen bei Erlenmeyer-Kolben	36
Abb. 4.2: Wachstum von High Five-Zellen in 500 ml Schüttelkolben	43
Abb. 4.3: Wachstum von High Five-Zellen in 2000 ml Schüttelkolben	43
Abb. 4.4: Wachstum von Sf9-Zellen in 500 ml Schüttelkolben	43
Abb. 4.5: Wachstum von Sf9-Zellen in 2000 ml Schüttelkolben	43
Abb. 4.6: EGFP-Ausbeute in High Five-Zellen in Abhängigkeit vom Füllvolumen des 500 ml Schüttelkolbens	45
Abb. 4.7: EGFP-Ausbeute in Sf9-Zellen in Abhängigkeit vom Füllvolumen des 500 ml Schüttelkolbens	45
Abb. 4.8: Schema der Sauerstoffversorgung im Wave-Bioreaktor	48
Abb. 4.9: Bestimmung des k_{La} -Werts (Wippfrequenz 16 min^{-1} , Wippwinkel 6°)	51
Abb. 4.10: Wachstum von Sf9-Zellen im Wave-Bioreaktor und im 2000 ml Schüttelkolben	54
Abb. 4.11: Wachstum von High Five-Zellen im Wave-Bioreaktor und im 2000 ml Schüttelkolben	55
Abb. 4.12: EGFP-Produktion in Sf9-Zellen im Wave-Bioreaktor und im Schüttelkolben	56
Abb. 4.13: EGFP-Produktion in High Five-Zellen im Wave-Bioreaktor und im Schüttelkolben	57
Abb. 4.14: Wachstum von Sf9-Zellen bei einem Medienwechsel	61

Abb. 4.15: Wachstum von Sf9-Zellen bei einer Fütterung mit Glucose und Yeastolate Ultrafiltrate.....	62
Abb. 4.16: Wachstum von Sf9-Zellen und Glucosekonzentration im Medium mit und ohne Fütterung.....	64
Abb. 4.17: Aminosäurekonzentration im Medium von Sf9-Zellen während des Wachstums.....	65
Abb. 4.18: Aminosäurekonzentration im Medium von Sf9-Zellen während des Wachstums bei einer Fütterung.....	67
Abb. 4.19: EGFP-Ausbeute in Sf9-Zellen in Abhängigkeit von der Infektionszellichte.....	70
Abb. 4.20: EGFP-Ausbeute in Sf9-Zellen bei einer Fütterung zum Zeitpunkt der Infektion und verschiedenen Infektionszellichten.....	71
Abb. 4.21: EGFP-Produktion in Sf9-Zellen bei einer Fütterung während des Wachstums und verschiedenen Infektionszellichten.....	73
Abb. 4.22: Auswirkung von verschiedenen Supplementen auf die EGFP-Ausbeute in Sf9-Zellen.....	76
Abb. 4.23: Auswirkung von verschiedenen Supplementen auf die Vitalität von Sf9-Zellen.....	77
Abb. 4.24: EGFP-Ausbeute in Sf9-Zellen bei Zugabe ausgewählter Supplemente.....	78
Abb. 4.25: EGFP-Ausbeute in Sf9-Zellen bei einer Fütterung zum Zeitpunkt der Infektion und verschiedenen Erntezeitpunkten.....	79
Abb. 4.26: EGFP-Ausbeute in Sf9-Zellen bei einer Fütterung während des Wachstums und verschiedenen Erntezeitpunkten.....	80
Abb. 4.27: EGFP-Produktion in Sf9-Zellen im Wave-Bioreaktor und im Schüttelkolben.....	81

Abb. 4.28: EGFP-Produktion in Sf9-Zellen im Wave-Bioreaktor und im Schüttelkolben bei einer Fütterung zum Zeitpunkt der Infektion.....	82
Abb. 4.29: EGFP-Produktion in Sf9-Zellen im Wave-Bioreaktor und im Schüttelkolben bei einer Fütterung während des Wachstums.....	84
Abb. 4.30: Vergleich der EGFP-Produktion in Sf9-Zellen im Wave-Bioreaktor - ohne Fütterung, Fütterung zum Zeitpunkt der Infektion, Fütterung während des Wachstums.....	85
Abb. 4.31: Auswirkungen einer zeitlichen Verschiebung der Proteinproduktion auf die Ausbeute bei verschiedenen Erntezeitpunkten. ..	89
Abb. 4.32: Wachstum von High Five-Zellen bei einer Fütterung mit Glucose und Yeastolate Ultrafiltrate.....	91
Abb. 4.33: Wachstum von High Five-Zellen und Glucosekonzentration im Medium	91
Abb. 4.34: Aminosäurekonzentration im Medium von High Five-Zellen während des Wachstums.....	92
Abb. 4.35: Wachstum von High Five-Zellen bei einer Fütterung mit Glucose, Asparagin und Glutamin	94
Abb. 4.36: Wachstum von High Five-Zellen bei einer Zugabe von Alanin und Ammonium	95
Abb. 4.37: Wachstum von High Five-Zellen bei einem Medienwechsel.....	96
Abb. 4.38: EGFP-Ausbeute in High Five-Zellen in Abhängigkeit von der Infektionszellichte.....	98
Abb. 4.39: Zelldichte von High Five-Zellen und Glucosekonzentration im Medium während der Infektion.....	99
Abb. 4.40: Aminosäurekonzentration im Medium von High Five-Zellen während der Infektionsphase.....	100
Abb. 4.41: EGFP-Ausbeute in High Five-Zellen mit und ohne Fütterung.....	102

Abb. 4.42: EGFP-Ausbeute in High Five-Zellen bei einer Zugabe von Yeastolate Ultrafiltrate	103
Abb. 4.43: EGFP-Ausbeute in High Five-Zellen bei einer Zugabe von Laktat, Alanin und Ammonium	104
Abb. 4.44: EGFP-Ausbeute in High Five-Zellen bei einem partiellen Medienwechsel	106
Abb. 4.45: EGFP-Ausbeute in High Five-Zellen bei einem partiellen Medienwechsel bei unterschiedlichen Zelldichten	107
Abb. 4.46: Einmaliger Medienwechsel im Wave-Bioreaktor	110
Abb. 4.47: Vergleich Wave-Bioreaktor mit Medienwechsel und Wave-Bioreaktor ohne Medienwechsel.....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: k_{La} -Werte im Schüttelkolben bei Berechnung nach Henzler und Schedel [36] und Maier [55]	40
Tabelle 4.2: EGFP-Ausbeute und Laktatbildung von High Five-Zellen im 500 ml Schüttelkolben	45
Tabelle 4.3: Gewähltes Füllvolumen für Versuche in Schüttelkolben	46
Tabelle 4.4: k_{La} -Werte im Wave-Bioreaktor [h^{-1}]	52
Tabelle 4.5: EGFP-Ausbeute in High Five-Zellen im Wave-Bioreaktor bei unterschiedlichen Einstellungen.....	53
Tabelle 4.6: Glucose-, Ammonium- und Aminosäurekonzentrationen beim Wachstum von Sf9-Zellen (Batch-Versuch).....	66
Tabelle 4.7: Glucose-, Ammonium- und Aminosäurekonzentrationen beim Wachstum von Sf9-Zellen bei einer Fütterung (Fed-Batch)	68
Tabelle 4.8: Glucoseverbrauch, Laktat- und Ammoniumproduktion und pH-Wert von Sf9-Zellen bei verschiedenen Zelldichten und Fütterung bei Infektion.....	72
Tabelle 4.9: Design of Experiments: EGFP-Ausbeute und Vitalität bei der Zugabe verschiedener Supplemente	75
Tabelle 4.10: Wachstum von High Five-Zellen	93
Tabelle 4.11: EGFP-Produktion in High Five-Zellen.....	101
Tabelle 4.12: Glucoseverbrauch und Änderung des pH-Werts bei einem Medienwechsel	108
Tabelle 4.13: Glucoseverbrauch und Änderung des pH-Werts bei einem Medienwechsel im Wave-Bioreaktor	112